

CAMPAGNE DEDIEE A L'EVALUATION DES EFFETS BIOLOGIQUES INDUITS PAR LA CONTAMINATION CHIMIQUE EN BAIES DE SEINE ET SOMME

SELIMANCHE 2021

—

RAPPORT FINAL

Janvier 2025

Auteurs

Aourell Mauffret¹, Farida Akcha¹, Yann Aminot¹, Nadège Bély¹, Denis Benito², Sandrine Bruzac¹, Tifanie Briaudeau², Thierry Burgeot¹, Tiphaine Chouvelon¹, Jérôme Couteau³, Yoann Godfrin¹, Karine Héas-moisan¹, Urtzi Izagirre², Pauline Le Monier¹, Romuald Le Roux¹, Kelig Mahé⁴, Catherine Munsch¹, Nathalie Olivier¹, Charles Pollono¹, Teddy Sireau¹, Bastien Thomas¹, Nathalie Wessel⁵

¹ Ifremer, RBE/CCEM, Nantes, France

² Toxem, Le Havre, France

³ CBET+ Research Group, University Of The Basque Country, Spain

⁴ Ifremer, RBE/HMMN/LRHBL, Boulogne-sur-mer, France

⁵ Ifremer, REM/BEEP/LEP, Brest, France

Version

Octobre 2024: 1ere version du rapport final (v1, pour relecture).

Janvier 2025 : version finale du rapport final (vf)

Diffusion

Publique

Citation

Aourell Mauffret, Farida Akcha, Yann Aminot, Nadège Bély, Denis Benito, Sandrine Bruzac, Tifanie Briaudeau, Thierry Burgeot, Tiphaine Chouvelon, Jérôme Couteau, Yoann Godfrin, Karine Héas-moisin, Urtzi Izagirre, Pauline Le Monier, Romuald Le Roux, Kelig Mahé, Catherine Munschy, Nathalie Olivier, Charles Pollono, Teddy Sireau, Bastien Thomas, Nathalie Wessel (2025). Campagne dédiée à l'évaluation des effets biologiques induits par la contamination chimique en Baies de Seine et Somme – SELIMANCHE 2021, Rapport (96 pages).

Conventions

Le suivi SELIMANCHE 2021 et les analyses présentées dans ce rapport ont été co-financés par les Agences de l'eau Seine Normandie (AESN) et Artois Picardie (AEAP) et 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 jusque 2023, puis sur la Convention Ifremer/AESN et AEAP à partir de 2024.

Campagnes en Mer

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

SELIMANCHE. N/O Côtes De La Manche 30/08/2021 - 08/09/2021 <https://doi.org/10.17600/18001614>

Table des matières

Résumé	5
1 Introduction – Dispositif SELI	6
1.1 La DCSMM	6
1.2 Campagnes « SELI »	6
1.3 Espèces suivies au cours des SELI	6
1.4 Analyses des SELI	7
1.5 Utilisation des seuils	7
Objectifs	12
2 Matériels et méthodes	13
2.1 Echantillonnage	13
2.1.1 Collecte et dissection des poissons plats.....	13
2.1.2 Collecte et dissection des moules	17
2.2 Analyse des biomarqueurs	19
2.2.1 Test des comètes sur érythrocytes de poissons plats et hémocytes de moules.....	19
2.2.2 Micronoyaux dans les érythrocytes de poissons plats et les hémocytes de moules	19
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 poissons	23
2.3.2 Mercure dans les muscles de poissons.....	24
2.3.3 Contaminants inorganiques dans les foies de poissons	24
2.4 Analyses des contaminants chimiques chez la moule.....	24
2.5 Analyses statistiques	24
2.5.1 Gestion des données manquantes, censurées (<LOQ) ou non validées	24
2.5.2 Comparaison aux seuils	26
2.5.3 Analyses statistiques univariées.....	26
2.5.4 Analyses multivariées et évaluation intégrée	26
3 Résultats – Réponses des biomarqueurs et bioaccumulation des contaminants chez les poissons plats en baies de Seine et Somme	27

3.1	Echantillonnage et adaptation aux conditions de terrain	27
3.2	Réponses des biomarqueurs chez les poissons plats prélevés en Baies de Seine et Somme	31
3.2.1	Biomarqueurs d'état de santé général : Intégrité des lysosomes.....	31
3.2.2	Biomarqueurs de génotoxicité : test des comètes et des micronoyaux	35
3.2.3	Biomarqueurs de neurotoxicité.....	38
3.2.4	Biomarqueurs d'exposition aux HAP : concentrations en métabolites biliaires de HAP	39
3.2.5	Histologie	42
3.3	Concentrations en contaminants	47
3.3.1	Contaminants organiques.....	47
3.3.2	Contaminants métalliques.....	53
3.4	Approche intégrée.....	59
3.4.1	Analyse multivariée	59
3.4.2	Approche par indice cumulé : CHASE	65
4	Résultats – Réponses des biomarqueurs et bioaccumulation des contaminants chez les moules en Baies de Seine et Somme.....	68
4.1	Biométrie	68
4.2	Biomarqueur d'état de santé général : biomarqueurs des lysosomes	68
4.3	Biomarqueurs de génotoxicité : tests des comètes et des micronoyaux.....	71
4.4	Biomarqueur de neurotoxicité : activité AChE	72
4.5	Analyse histologique chez la moule	72
4.5.1	Sex-ratio et stades de maturité chez la moule.....	72
4.5.2	Lésions et pathologies chez la moule	73
4.6	Approche intégrée par indice : Distance au seuil pour toutes les variables avec un seuil (CHASE)	75
5	Conclusions.....	77
	Références.....	81
Annexe 1.	MM Contaminants organiques dans les muscles de soles et flets (Ifremer, RBE/CCEM/LBCO)	88
Annexe 2.	MM Contaminants inorganiques (Ifremer, RBE/CCEM/ LBCM)	91
Annexe 3.	Complément aux analyses statistiques	92

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 (ICES en anglais)), et ainsi d'alimenter le groupe de travail ICES/BEC (Biological Effect of Contaminants) et de renseigner le descripteur 8 de la Directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin (DCSMM) qui définit le Bon Etat Ecologique comme un état où le niveau de concentration des contaminants ne provoque pas d'effets dus à la pollution. Le présent rapport concerne le volet SELIMANCHE 2021, c'est-à-dire la mise en oeuvre du dispositif SELI en Manche en 2021. Des poissons plats (n=108 soles et 40 filets) ont été collectés sur le Navire Océanographique (N/O) Côtes De La Manche du 30/08/2021 au 08/09/2021 (<https://doi.org/10.17600/18001614>). De plus, des bivalves (n= 120 moules, 15 moules/station) ont été prélevés en février 2022 à 8 stations 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 états et modes d'action des contaminants : biomarqueurs 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) ainsi que des analyses histopathologiques des gonades et du foie. Les contaminants suivis sont des contaminants organiques hydrophobes (historiques et d'intérêt émergent : PCB, PBDE, HBCDD, PFAS et pesticides organochlorés (OCP)) et des éléments traces métalliques susceptibles de s'accumuler dans les organismes et/ou de s'amplifier dans les réseaux trophiques. L'ensemble de ces analyses permet 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 proposées pour avoir une vision de plus en plus globale de la contamination chimique et de ses effets en baies de Seine et Somme en 2021.

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).

Par souci de synthèse, il est fait référence au récent rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024) pour les parties déjà détaillées dans ce dernier.

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, Chiffolleau, 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 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024). 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 (ETM, les 3 métaux toxiques, indicateurs communs d'OSPAR : Hg, Cd, Pb, et d'autres éléments : Ag, As, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Sb, Se, Sn, Tl, U, V, Zn analysés 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 passent notamment par l'acquisition et la transmission des données obtenues par la communauté scientifique 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. Elles sont décrites dans le rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024) et les principaux choix faits pour l'analyse des SELI sont :

- *Seuils et objectifs de protection.* Pour l'exercice actuel, les seuils retenus sont : (1) les seuils reconnus au niveau international avec un objectif de protection environnementale puis (2) la Background Assessment Concentration (BAC, seuils dérivés par OSPAR) 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.* Pour certains biomarqueurs ou contaminants chez certaines espèces, un seuil n'a pas encore été développé et par défaut, des seuils obtenus pour une espèce proche (*e.g.* limande et sole) sont utilisés sans pouvoir évaluer les différences inter-espèces à ce stade. 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.* Dans ce rapport, des approximations sont faites notamment pour les concentrations en contaminants dans l'attente de paramètres d'évaluation plus adaptés qui prennent en compte l'organotropisme, *e.g.* le seuil pour le mercure (NQE) se rapporte à l'organisme entier et il est comparé à une valeur mesurée dans le muscle qui est considéré proche.

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	SELIMANC HE		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 (MN)	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, 2, 3}.

Famille	Substance	Type de seuil	Seuil considéré ¹	Seuil sole (pf, poisson maigre) ²	Seuil flet (pf, poisson maigre) ²	Seuil moule (ps, tissu mou) ³
HAP	2 cycles : Naphtalène	EAC	340 µg/kg ps	↑ Non pertinent ↓ Métabolisés par le poisson → ↓ Non mesuré	↑ Non pertinent ↓ Métabolisés par le poisson → ↓ Non mesuré	340 µg/kg ps
	3 cycles : Anthracène	EAC	290 µg/kg ps			290 µg/kg ps
	3 cycles : Phénanthrène	EAC	1700 µg/kg ps			1700 µg/kg ps
	4 cycles : Benzo(a)anthracène	EAC	80 µg/kg ps			80 µg/kg ps
	4 cycles : Chrysène&triphenylène	BAC	8,1 µg/kg ps			8,1 µg/kg ps
	4 cycles : Fluoranthène	EAC	110 µg/kg ps			110 µg/kg ps
	4 cycles : Pyrène	EAC	100 µg/kg ps			100 µg/kg ps
	5 cycles : Benzo(k)fluoranthène	EAC	260 µg/kg ps			260 µg/kg ps
	5 cycles : Benzo(a)pyrène	EAC	600 µg/kg ps			600 µg/kg ps
	6 cycles : Benzo(g,h,i)perylene	EAC	110 µg/kg ps			110 µg/kg ps
6 cycles : Indéno(1,2,3-cd)pyrène	BAC _{Med}	2,9 µg/kg ps	2,9 µg/kg ps	2,9 µg/kg ps		
PCB	CB28	EAC	67 µg/kg pl	310 ng/kg pf (muscle)	1093 ng/kg pf (muscle)	5,6 µg/kg ps
	CB52	EAC	108 µg/kg pl	500 ng/kg pf (muscle)	1762 ng/kg pf (muscle)	9,0 µg/kg ps
	CB101	EAC	121 µg/kg pl	560 ng/kg pf (muscle)	1974 ng/kg pf (muscle)	1 µg/kg ps
	CB118	EAC	25 µg/kg pl	116 ng/kg pf (muscle)	408 ng/kg pf (muscle)	2,1 µg/kg ps
	CB138	EAC	317 µg/kg pl	1468 ng/kg pf (muscle)	5171 ng/kg pf (muscle)	24,5 µg/kg ps
	CB153	EAC	1 585 µg/kg pl	7338 ng/kg pf (muscle)	25856 ng/kg pf (muscle)	132,4 µg/kg ps
	CB180	EAC	469 µg/kg pl	2171 ng/kg pf (muscle)	7651 ng/kg pf (muscle)	39,2 µg/kg ps
Pesticides organochlorés	DDT	BAC(p,p'-DDE)	0,10 µg/kg pf (foie) ⁴ 0,63 µg/kg ps (moule)	9 ng/kg pf (muscle) ⁴	33 ng/kg pf (muscle) ⁴	0,63 µg/kg ps
	HCH	EAC(lindane)	1,1 µg/kg pf (entier) 11 µg/kg pf (foie)	102 ng/kg pf (muscle)	359 ng/kg pf (muscle)	1,1 µg/kg pf (entier) ⁵
Polybromodiphényléthers	PBDE (Σ 28, 47, 99, 100, 153 et 154)	NQE(hh)	0,0085 µg/kg pf (muscle)	0,0085 µg/kg pf (muscle)	0,0085 µg/kg pf (muscle)	Non applicable
	BDE28	FEQG	2400 µg/kg pl	11 112 ng/kg pf (muscle)	39 151 ng/kg pf (muscle)	200,5 µg/kg ps
	BDE47	FEQG	880 µg/kg pl	4072 ng/kg pf (muscle)	14 355 ng/kg pf (muscle)	73,5 µg/kg ps
	BDE99	FEQG	20 µg/kg pl	93 ng/kg pf (muscle)	326 ng/kg pf (muscle)	1,7 µg/kg ps
	BDE100	FEQG	20 µg/kg pl	93 ng/kg pf (muscle)	326 ng/kg pf (muscle)	1,7 µg/kg ps
	BDE153	FEQG	80 µg/kg pl	370 ng/kg pf (muscle)	1305 ng/kg pf (muscle)	6,7 µg/kg ps
	BDE154	FEQG	80 µg/kg pl	370 ng/kg pf (muscle)	1305 ng/kg pf (muscle)	6,7 µg/kg ps
PFAS	PFOS	QS(sec.pois.)	33 µg/kg pf (entier)	33 µg/kg pf (entier)	33 µg/kg pf (entier)	201 µg/kg ps
	PFHxS	MPC	0,2 µg/kg pf (muscle)	0,2 µg/kg pf (muscle)	0,2 µg/kg pf (muscle)	
	PFOS	MPC	2 µg/kg pf (muscle)	2 µg/kg pf (muscle)	2 µg/kg pf (muscle)	
	PFOA	MPC	0,2 µg/kg pf (muscle)	0,2 µg/kg pf (muscle)	0,2 µg/kg pf (muscle)	
	PFNA	MPC	0,5 µg/kg pf (muscle)	0,5 µg/kg pf (muscle)	0,5 µg/kg pf (muscle)	
Métaux	Mercure (Hg)	NQE(sec.pois.)	0,02 mg/kg pf (entier)	0,02 mg/kg pf (entier)	0,02 mg/kg pf (entier)	0,122 mg/kg ps (entier)
	Cadmium (Cd)	MPC	1,0 (foie-bivalves) ; 0,05 (muscle) mg/kg pf	1,0 mg/kg pf (foie)	1,0 mg/kg pf (foie)	6098 µg/kg ps
	Plomb (Pb)	MPC	1,5 (foie-bivalves) ; 0,3 (muscle) mg/kg pf	1,5 mg/kg pf (foie)	1,5 mg/kg pf (foie)	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.

² Le « seuil sole (poisson maigre) » et le « seuil flet (poisson maigre) » est le seuil dérivé pour chaque espèce, 2 poissons maigres, 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 (**0,46 % pf** dans le *muscle* de sole et **1,63% pf** dans le *muscle* de flet, données SELIMANCHE 21) ; 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**.

³ 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).

⁴ Le BAC du *p,p'*-DDE pour les poissons a été élaboré en utilisant des concentrations hépatiques présentant une teneur « élevée » en lipides hépatiques et s'applique uniquement à des concentrations musculaires ou hépatiques où le poids lipidique typique des tissus de l'espèce est ≥ 3 %. Pour SELIMANCHE 2021, il est donné à titre indicatif car il n'est pas directement applicable pour les poissons « maigres ».

⁵ L'EAC du lindane pour les bivalves est non compatible avec LOQ actuelles (EAC<3*LOQ)

EAC, FEQG et **BAC** : Environmental Assessment Criteria, Federal Environmental Quality Guideline (seuils du Canadian Environmental Protection Act, 1999utilisés 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

L'objectif des campagnes SELI est d'évaluer :

1. Les réponses biologiques observées chez les organismes marins (poissons plats, bivalves),
2. Le niveau d'imprégnation de ces organismes marins à la contamination chimique,
3. La relation entre réponses biologiques et exposition à un stress chimique.

2 Matériels et méthodes

2.1 Echantillonnage

2.1.1 Collecte et dissection des poissons plats

La campagne de pêche de poissons a eu lieu du 30 Août au 8 Septembre 2021 sur le Navire Océanographique (N/O) Côte de la Manche. Les espèces de poissons sélectionnées étaient : la sole commune, *Solea solea* et le flet, *Platichthys flesus*. Un chalut à perche – chalut déployé lors des campagnes Orhago (Observation des Ressources HALieutiques benthiques du GOLfe de Gascogne, <https://doi.org/10.18142/23>) – a été utilisé. La durée des traits de chalutage était de 20 min maximum (voir moins lorsque les fonds étaient vaseux) pour augmenter les chances de récupérer le poisson vivant. La zone de pêche prospectée a couvert les 5 stations visées : Z1, Z5, Z6 en baie de Seine et BS1 et BS2 en baie de Somme (**Figure 1, Tableau 3**). Cent huit (108) soles et 40 flets ont été collectés.

Théoriquement, un seul sexe (les mâles) était ciblé pour limiter l'influence de facteurs biotiques confondants sur les réponses des marqueurs sélectionnés, notamment pendant la période de reproduction / ponte. 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 et ciblant des individus de moins de 3 ans, n'ont pas mis en avant de différences des réponses entre mâles et femelles. 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.

La Commission Nationale Flotte Côtière (CNFC), qui a octroyé les jours de mer pour la campagne SELIMANCHE, a demandé « de prévenir la communauté scientifique susceptible d'être intéressée par de tels échantillons afin de minimiser l'impact du chalutage scientifique pour une seule campagne de prélèvement ne visant que 2 espèces de téléostéens ». Dans cet effort, l'échantillonnage a été optimisé en prélevant des organismes présents dans les traits pour différents projets :

- L'évaluation des niveaux et profils de contaminants d'intérêt émergent (composés per- et polyfluoroalkylés -PFAS, retardateurs de flamme alternatifs) dans les réseaux trophiques du bar commun (*Dicentrarchus labrax*) et de la sole commune (*Solea solea*) et détermination du facteur de bioamplification trophique (TMF) des contaminants d'intérêt émergent détectés. Responsable : Yann Aminot, Ifremer Nantes/CCEM. => Prélèvements effectués : soles, gobies, bivalves, crabes.
- Des prélèvements supplémentaires, au large de l'estuaire de la Seine, ont été faits dans le cadre du projet TERATROPH (Univ. Nantes & Ifremer Nantes/CCEM) et notamment dans le cadre de la thèse de Julie Rétif, intitulée « Distribution des terres rares dans les réseaux trophiques des écosystèmes estuariens » et soutenue en Juin 2024. L'objectif de la thèse et du projet étaient d'évaluer les concentrations en Terres Rares (REE) dans les différents compartiments du milieu estuarien (sédiment/eau/biote), puis de comparer deux estuaires majeurs métropolitains (Loire vs Seine). Responsable : Nicolas Briant, Ifremer Nantes/CCEM. => Prélèvements effectués : soles, vives, crépidules.
- Développement d'un protocole de mesure de la longueur des télomères pour l'évaluation des effets génotoxiques de la contamination chimique. Responsable : Farida Akcha, Ifremer Nantes/CCEM. => Prélèvements effectués : soles juvéniles et adultes.
- Suivi des ratios isotopiques du carbone et de l'azote (traceurs trophiques), de la densité énergétique et des teneurs en certains nutriments (oligo-éléments) dans différentes espèces proies de phoques gris et veaux marins en Baie de Somme et Baie de Seine, en soutien aux projets concernant l'écologie

alimentaire de ces mammifères marins en Manche. Responsable : Tiphaine Chouvelon, Observatoire Pelagis, UAR La Rochelle Université/CNRS. => Prélèvements effectués : plies, flets, limandes, soles poles, petites soles jaunes, barbues, turbots, arnoglosses, tacauds, dragonnets, grandes vives, petites vives, lançons, calamars.

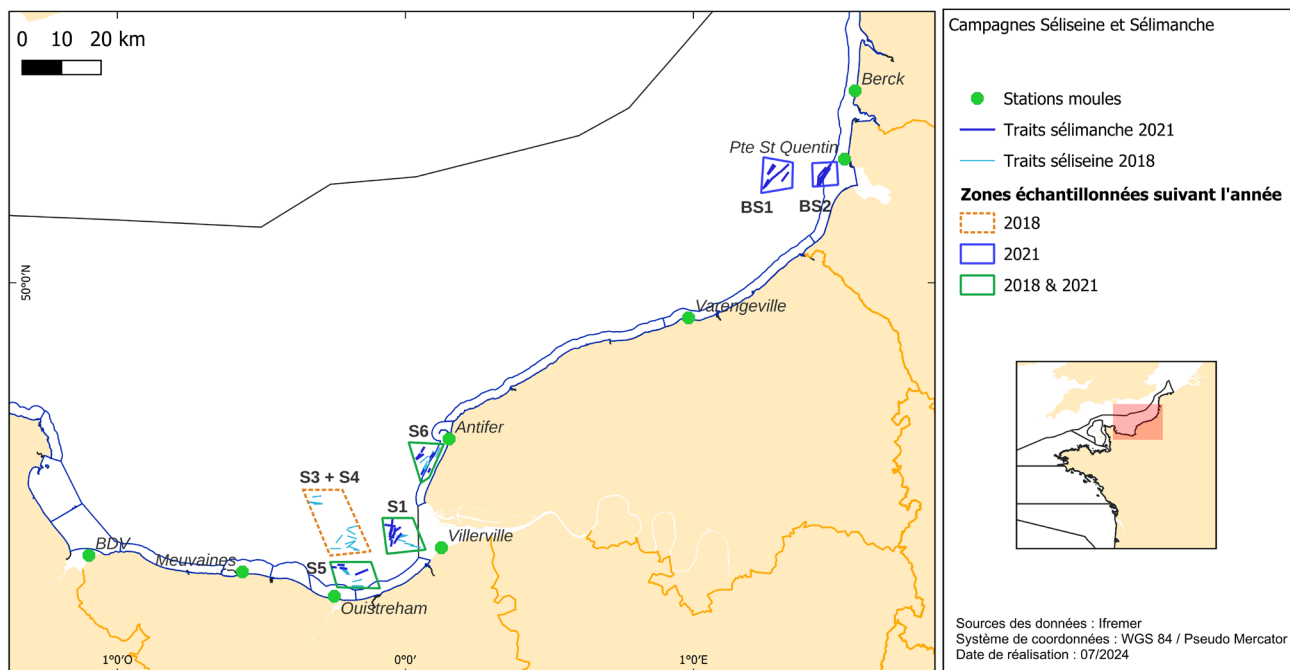


Figure 1 – Localisation des 5 stations d'échantillonnage de poissons plats (soles et flets), des 8 stations d'échantillonnage de moules de la campagne SELIMANCHE 2021. En Baie de Seine, les stations poissons sont notées de S1 à S6 sur la figure et correspondent aux stations Z1 à Z6 dans le texte.

Tableau 3 – Nombre d'individus prélevés par station et utilisés pour l'analyse des paramètres biologiques (Biomarqueurs) et des contaminants chimiques (Organiques et Inorganiques dans le cadre de la campagne SELIMANCHE 2021. Des précisions sur les conditions de prélèvement sont indiqués en commentaires.

Station	Date	Latitude	Longitude	Nb	Biomarqueurs ¹		Contam. orga.		Contam. inorga.		Commentaires
					Traits chalut	N Sole (M/F)	N Flet (M/F)	N Sole (M/F)	N Flet (M/F)	N Sole (M/F)	
Z1	31/8/2021 7/9/2021	49,4765	-0,0632	7	20 (8/12)	20 (14/6)	5 (4/1)	5 (5/0)	5 (4/1)	5 (5/0)	Une quarantaine de soles a été pêchée en 3 traits. Les 4 derniers traits ont été effectués pour atteindre 20 flets. Chargement de sable sur le dernier trait 14h-14h12. Points de la zone à vérifier. Les points Est de la zone dans CINNA donnaient dans le port du Havre. Zones prospectées : milieu Nord de la zone.
Z5	5/9/2021	49,3372	-0,3449	4	20 (5/15)	0	5 (2/3)	0	5 (2/3)	0	Les trois 1 ^{er} traits (2 dans le NE de la zone puis 1 dans le NO) étaient pleins de sable/coquilles écrasées. Des soles ont néanmoins été prélevées (notamment 8 en 1 trait dans NE de la zone mais avec bcp de coquilles). Changement de zone vers l'Est, devant la Dives (plutôt que devant l'Orne) => chalut propre et 15 soles dans la gamme de taille.
Z6	6/9/2021	49,6464	0,01029	6	20 (9/11)	0	0	0	5 (3/2)	0	Le premier trait a été ouvert à la mer car trop plein de vase. Les 20 soles à la taille ont été pêchées en 2 traits (traits n°2 et 3). NO de la zone : soles et pas de vase, NE de la zone : vase/coquilles, milieu/Sud : pas de soles, chaussette du chalut enlevée.
BS1 (large)	1/9/2021 2/9/2021	50,1473	1,1638	7	25 (5/20)	0	5 (2/3)	0	15 (3/12)	0	Deux des 7 traits étaient pleins de sable (les derniers du 1/9/2021). Pour avoir 20 soles à la taille et avec otolithes : cinq soles ont été disséquées en plus. Le 1/9/2021 : les otolithes n'avaient pas pu être prélevés entiers chez 2 soles + 4 soles du 1/9/2021 faisaient <22cm.
BS2 (côte)	2/9/2021 3/9/2021	50,1497	1,3663	10	23 (5/18)	20 (16/4)	5 (3/2)	5 (5/0)	10 (5/5)	5 (5/0)	Les 23 soles (22-30 cm) ont été pêchées en 6 traits. Les 4 autres traits ont été effectués pour atteindre 20 flets. Pas de problème de chalut compliqué (sable, coquilles... Pour avoir 20 soles à la taille et avec otolithes : trois soles ont été disséquées en plus. Le 2/9/2021 : les otolithes n'avaient pas pu être prélevés entiers chez 1 sole + 2 soles faisaient <22cm.
Tot SELI				34	108 (32/76)	40 (30/10)	20 (17/9)	10 (10/0)	40 (17/23)	10 (10/0)	

M : mâles, F : femelles

¹ L'ensemble des poissons pêchés était destiné à l'analyse de biomarqueurs, mais certaines analyses n'ont pu être effectuées pour des raisons décrites ci-après (souvent trop peu de tissu), ce qui peut conduire à des n pour les analyses de biomarqueurs inférieurs au nombre de poisson pêchés.

Une fois pêchés et triés, 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 Ifremer/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 pour la mesure par PCR quantitative de **la longueur des télomères à Ifremer/CCEM**. Cela est réalisé dans le cadre de la mutualisation de l'effort d'échantillonnage pour le développement d'un nouveau biomarqueur, développement soutenu par d'autres projets que SELI.
 - 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 (UMR EPOC LPTC Université de Bordeaux)**.
- 3- Les individus sont sexés et les gonades sont prélevées, pesées pour le calcul du rapport gonado-somatique (**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 la mesure de **l'activité AChE à Ifremer/CCEM (Ifremer)**.
- 6- Le poisson (avec restes, *e.g.* viscères) est ensuite placé dans une feuille d'aluminium calcinée, puis conservé à -20°C jusqu'à dissection du muscle sous atmosphère contrôlée à CCEM (Ifremer/Nantes) pour **l'analyse des contaminants organiques chlorés (PCB et OCP), bromés (HBCDD et PBDE) et fluorés (PFAS) ainsi que l'analyse du Hg total dans le muscle, à Ifremer/CCEM**.
- 7- Au laboratoire (CCEM, Ifremer/Nantes), les otolithes des poissons ont été prélevés pour **l'ageage** des poissons par le **Laboratoire Ressources Halieutiques (Ifremer/Boulogne-sur-mer)** selon les procédures

internationales en vigueur (Vitale *et al.*, 2019) (Annexe 2 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024)).

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.

SELIMANCHE 2021: 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.

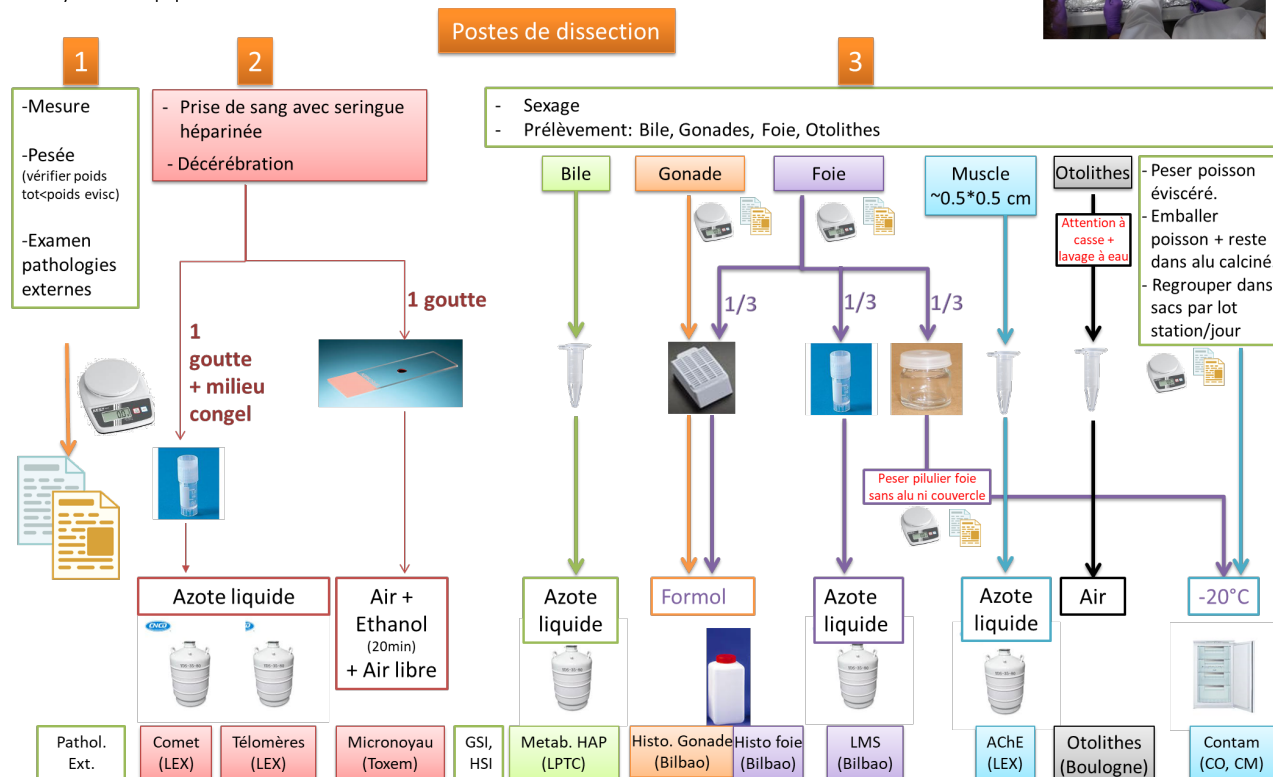
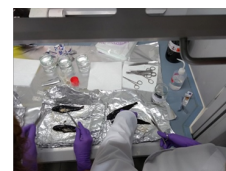


Figure 2 – Préparation des échantillons pour l'analyse de biomarqueurs et des contaminants organiques et inorganiques chez les poissons plats lors de la campagne SELIMANCHE 2021 (Septembre 2021). LEX, LBCM, LBCO : Equipes d'Ecotoxicologie, de Biogéochimie des Contaminants Métalliques et de Biogéochimie des Contaminants Organiques de l'unité Contaminants Chimiques des Ecosystèmes Marins (IFREMER/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 2022) sur les 8 stations prévues (15 moules/station, Figure 1).

- Berck : prélèvement : 25/01/2022, dissection : 26/01/2022
- Pte St Quentin : prélèvement : 25/01/2022, dissection : 26/01/2022
- Meuvaines : prélèvement : 17/02/2022, dissection : 18/02/2022
- BDV : prélèvement : 17/02/2022, dissection : 18/02/2022
- Varengeville : prélèvement : 01/03/2022, dissection : 02/03/2022
- Antifer : prélèvement : 01/03/2022, dissection : 02/03/2022
- Ouistreham : prélèvement : 01/03/2022, dissection : 02/03/2022
- Villerville : prélèvement : 01/03/2022, dissection : 02/03/2022

Les Laboratoires Environnement et Ressources IFREMER de Normandie (LERN) et de Boulogne-sur-Mer (LERBL) ont menés les prélèvements en même temps que les prélèvements du ROCCH. Les moules sont conservées à 4°C dans l'obscurité et les LER ont pu les envoyer à Nantes le jour même. Les moules ont été disséqués par IFREMER/CCEM le lendemain (+1 jour) en vue de la mesure de 4 biomarqueurs sur 15 moules par station (analyse individuelle, **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° 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- 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° afin d'arrêter le processus de fixation et de préserver la qualité du tissu jusqu'à son utilisation pour l'analyse **de lésions tissulaires et de pathologies des glandes digestives à l'University of the Basque Country**.

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 extraites de la base de données Quadrigé.

SELIMANCHE 2021/ ROCCH FEV 2022

Préparation de la paillasse : Nouvelle feuille d'aluminium 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).

Micronoyau

- 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 (boîte tupperware avec papier absorbant humide).
- Enlever l'excédent de liquide en le laissant couler de lame puis fixer avec un bain d'éthanol/acide acétique (3V/1V) pendant 20 minutes.
- Laisser sécher à température ambiante.

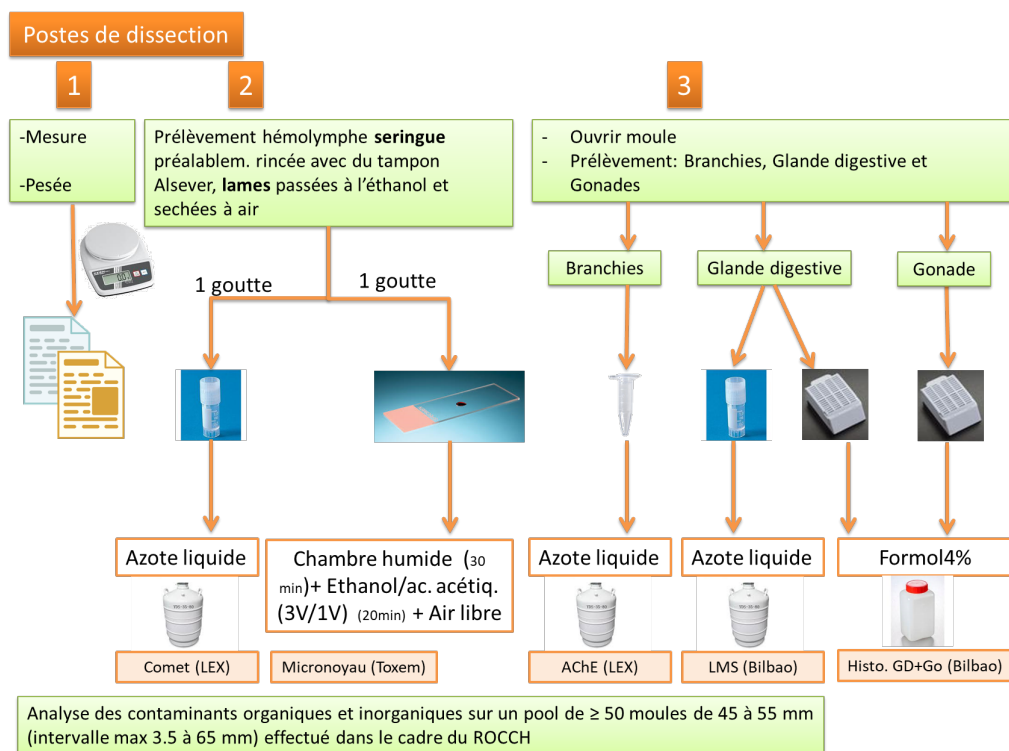


Figure 3 – Préparation des échantillons pour l'analyse de biomarqueurs chez la moule. LEX : Equipe d'Ecotoxicologie de l'unité Contaminants Chimiques des Ecosystèmes Marins (CEEM) de l'Ifremer/ Nantes. CBET+, Bilbao : groupe de Cell Biology in Environmental Toxicology + One Health de l'University of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

2.2 Analyse des biomarqueurs

2.2.1 Test des comètes sur érythrocytes de poissons plats et hémocytes de moules

Le test des comètes a été réalisé comme précédemment décrit (Akcha *et al.*, 2003, Akcha *et al.*, 2004b). La méthode est détaillée en Annexe 3 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024).

2.2.2 Micronoyaux dans les érythrocytes de poissons plats 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 ont été colorées au DAPI selon Vincent-Hubert *et al.* (2011). Pour cela, les lames ont été rincées 2 fois 3 minutes dans du tampon PBS (Phosphate buffered saline) 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 en Annexe 4 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024).

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 en Annexe 5 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024). Les analyses sont faites au LPTC à l'Université de Bordeaux.

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 en Annexe 6 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024).

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

Pour les analyses histo(patho)logiques, les échantillons de foie et gonades de poissons plats ainsi que de glandes digestives et de gonades des moules 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 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024)). Après fixation, les tissus ont été déshydratés par passage dans des bains d'éthanol (70° ; 96° ; éthanol pure) puis inclus en paraffine (Leica ASP 300S). 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 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024). 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 Poissons plats : Analyses des lésions et pathologies hépatiques

L'analyse histologique des dommages hépatiques est utilisée comme une réponse biologique intégrée de l'état de santé général des organismes dans le cadre la surveillance des effets des contaminants chimiques. La méthodologie et les critères de diagnostic des dommages hépatiques ont été établis 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 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024) avec la correspondance des deux types de classification des lésions utilisés pour cette campagne par

- 1) type de lésions (Davies and Vethaak, 2012) : 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)
- 2) type de lésions et dommages (Costa *et al.*, 2009) : 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 Poissons plats : Détermination du sexe, des stades de développement et des lésions histopathologiques de la gonade

Stade de maturité. Pour les mâles, les stades de maturité sont identifiés selon García-López *et al.* (2006) : Stade I (spermatogenèse précoce) ; Stade II (spermatogenèse) ; Stade III (spermatogenèse tardive) ; Stade IV (maturité) ; Stade V (Récupération). 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 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024).

Histopathologie. L'analyse histologique des pathologies est 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. L'analyse de l'intersex est décrite en Annexe 8 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024). 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 Poissons plats : 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 histopathologiques semi-quantitatifs sont calculés pour chaque individu :

- 1) selon la classification et les notes de gravité de chaque lésion indiquées 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-quantitative 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

Le sex-ratio et stades de développement gonadique sont déterminés chez la moule par examen histologique selon Kim *et al.* (2006), adapté par Ortiz Ortiz-Zarragoitia *et al.* (2011a).

L'analyse histo(patho)logique des échantillons de gonades est 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 sont 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 de la glande digestive 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 sont réalisées à l'aide d'un microscope optique selon Bignell *et al.* (2008). La liste des 25 différentes pathologies et parasites recherchés chez la moule est présentée en Annexe 7 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024). Pour chaque lésion et chaque parasite, la proportion d'individus présentant la pathologie (en %) est calculée pour chaque site.

Dans le cas de l'atrésie au niveau des gonades (go) femelles, un indice semi-quantitatif (ATS(go)) est calculé en 4 stades, selon la proportion d'oocytes atrétiques identifiés dans l'échantillon : (0) absence d'oocytes atrétiques, (1) 0 à 25% des oocytes affectés, (2) 25 à 50%, (3) 50 à 75% et (4) 75% à 100% des oocytes affectés.

Enfin, au niveau de la glande digestive (gd) des moules, l'analyse histologique de l'intégrité des tissus sert d'indicateur d'exposition à un stress chimique (Marigómez *et al.*, 2006, Garmendia *et al.*, 2011, Benito *et al.*, 2017). Trois indices sont calculés : l'indice cellulaire adipogranulaire (ADG), l'indice d'atrophie et l'indice semi-quantitatif d'intégrité de la glande digestive (Connective Tissue Index, CTD).

- L'indice cellulaire adipogranulaire (ADG(gd)) 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 de Kim *et al.* (2006), (Garmendia *et al.*, 2011). Il est mesuré selon la

classification de 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.

- L'indice semi-quantitatif d'intégrité de la glande digestive (Connective Tissue Index CTD(gd)) 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.

2.3 Analyses des contaminants chimiques chez les poissons plats

Les contaminants sont analysés sur une sélection de 30 ou 50 individus selon la famille de contaminants :

- Les 30 premiers individus sélectionnés pour l'analyse de contaminants organiques et ETM sont d'âges similaires (2 ans préférentiellement + individus de 1 an pour arriver à 5 individus d'une espèce par station) et avec des indices de condition similaires (RGS, RHS et Fulton). Les soles de 2 ans sont sélectionnées, ce n'est pas l'âge majoritairement observé pendant SELIMANCHE 2021 mais c'est l'âge le plus retrouvé à l'échelle des campagnes SELILOIRE2020 et SELIMANCHE 2021, il a donc été choisi pour faciliter les comparaisons entre campagnes. Cette sélection correspond à :
 - o 20 soles (11 mâles (10 de 2 ans et 1 de 1 an) et 9 femelles (7 de 2 ans et 2 de 1 an))
 - o 10 flets (10 mâles, 6 de 2 ans et 4 de 1 an).
- Les 20 individus supplémentaires sélectionnés sont des soles présentant une gamme d'âge plus large que la 1ère sélection pour tester l'effet de l'âge sur les concentrations en ETM chez les soles :
 - o 20 soles (14 femelles de 1 à 5 ans et 6 mâles de 1 à 13 ans), prélevées sur BS1 (11 soles), BS2 (4 soles) et Z6 (6 soles) qui sont les 3 stations présentant une gamme d'âge particulièrement étendue.

Ainsi, le muscle de 50 poissons (40 soles et 10 flets) a été disséqué sous atmosphère contrôlée pour l'analyse du Hg, et l'analyse de contaminants organiques pour 30 de ces poissons (20 soles et 10 flets). Les ETM (hors Hg) ont été analysés dans le foie des 50 poissons pour lesquels les concentrations en Hg ont été mesurées dans le muscle.

2.3.1 Contaminants organiques dans les muscles de poissons

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 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024) et les QA/QC mises à jour en Annexe 1 de ce rapport.

2.3.2 Mercure dans les muscles de poissons

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 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024).

2.3.3 Contaminants inorganiques dans les foies de poissons

Les contaminants inorganiques (éléments traces métalliques, ETM) recherchés dans les foies de poissons incluent des éléments non-essentiels pour les bivalves et les poissons et/ou ayant une toxicité particulièrement élevée chez les bivalves et les poissons : le cadmium (Cd) et le plomb (Pb) (les deux autres indicateurs communs d'OSPAR avec le Hg), 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 (au total, 19 éléments qui viennent s'ajouter au Hg dans le muscle : Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Tl, U, V, Zn) 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/LSAAliments/LSA-INS-0084 (ex ANSES CIME 08) et détaillée Annexe 10 du rapport SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024) et les QA/QC mises à jour en Annexe 2.

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 2022 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 manquantes, censurées (<LOQ) ou non validées

Données manquantes. Le pourcentage de matière sèche du muscle de poisson a été mesuré dans 30 individus pour lesquels les contaminants organiques ont été analysés. Pour les 20 soles supplémentaires pour lesquelles le Hg a aussi été analysé, le pourcentage de matière sèche du muscle a été estimée par la médiane des 20 données soles disponibles (*i.e.* 22,1 %, pour info : moyenne = 21,8 %).

Le pourcentage de matière lipidique dans le muscle de poisson a été déterminé pour 29 des 30 individus pour lesquels des contaminants organiques lipophiles ont été analysés. La valeur manquante pour la sole S3BS2 a été estimée par la médiane des 19 données soles disponible (*i.e.* 2,1 %, pour info : moyenne = 2,1 %).

Données censurées. Le traitement des valeurs inférieures à la limite de quantification (< LOQ) dépend du déterminant et de la question posée :

- Pour les contaminants organiques :

- Pour les comparaisons aux seuils, les valeurs <LOQ sont remplacées par la LOQ pour évaluation conservatrice de la qualité du milieu marin (*i.e.* <LOQ = LOQ)
- Pour les évaluations spatiales et temporelles ainsi que les analyses multivariées, les valeurs <LOQ sont remplacées par la LOQ/2 qui est une valeur centrale dans l'intervalle des valeurs possibles (*i.e.* <LOQ = LOQ/2)
- Pour le calcul des ratios de concentrations ou profil, les valeurs <LOQ sont remplacées par 0 (*i.e.* <LOQ = 0) pour éviter un poids important des substances non quantifiées dans la somme totale.
- Pour les ETM, les valeurs estimées des concentrations proches de la limite de quantification (< LOQ) et avec des taux de récupération des matériaux de référence utilisés (CRM) satisfaisants (*i.e.* compris entre 70 et 130%, soit un écart de moins de 30% par rapport à la valeur certifiée) sont représentées (*i.e.* <LOQ = valeur estimée).
- Pour les masses des gonades des poissons inférieures à la limite de précision de la balance (< 0,10 g) sont remplacées par 0,05 g (*i.e.* = LOQ/2).

Qualification et sélection des données.

- Les données de cassures de brins de l'ADN mesurées par le test des comètes sont acquises via la lecture de lames dont l'état ne permet pas de suspecter un éventuel problème de conditionnement de l'échantillon (du prélèvement de sang à sa dilution dans du milieu de congélation pour stockage dans l'azote liquide). Une forte proportion de noyaux très endommagés voir de type apoptotique et un très fort bruit de fond sont défavorables à l'analyse.
- Les données de micronoyaux viennent de lames clairement lisibles.
- Les données AChE sont utilisées si les triplicats analytiques sont validés.
- Les concentrations en métabolites biliaires de HAP répondent à des normes de contrôle/qualité décrite dans Le Dû-Lacoste (2008).
- Les données de stabilité de la membrane lysosomale sont validées si la structure générale tissulaire est conservée durant le traitement des échantillons, assurant ainsi sa qualité. Les paramètres structuraux des lysosomes sont seulement mesurés dans les échantillons montrant suffisamment de contraste dans la coloration, assurant ainsi une mesure précise.
- Les données des analyses histopathologiques sont validées si la structure générale tissulaire est conservée durant le traitement des échantillons, assurant ainsi sa qualité.
- Pour les contaminants, les procédures d'assurance qualité et de contrôle qualité usuelles ont été suivies pour chaque série d'analyse. Elles comprenaient l'analyse d'échantillons de contrôle qualité (référence interne et/ou matériel de référence certifié (CRM), en Annexe 1 et Annexe 2), des blancs de procédures, la quantification par étalonnage interne, l'étalonnage à 5 à 6 niveaux de concentration, le suivi des rendements d'extraction, et la participation à des tests de comparaison interlaboratoires pour le milieu marin.
- Pour les ETM, les éléments retenus ont des CRM satisfaisants et des valeurs majoritairement proches ou supérieures à la LOQ. Les CRM pour As et Se ne sont pas satisfaisants. Les concentrations estimées pour Cr, Sn et Sb sont majoritairement <LOQ (28, 43 et 42 échantillons <LOQ sur 50 échantillons, LOQ de 0,10, 0,11 et 0,005 mg. kg⁻¹ poids sec (ps) pour Cr, Sn et Sb respectivement). Les valeurs estimées pour As, Cr, Sb, Se et Sn ne sont donc pas représentées dans ce rapport.

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). 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

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.

Certaines données sont log-transformées pour rapprocher leur distribution d'une loi normale (principalement des données de type concentrations en contaminants ou en AChE).

Dans un premier temps, les réponses de chaque biomarqueur et les concentrations en chaque contaminant (ou somme de concentrations de contaminants d'une même famille) sont illustrées séparément. Pour les poissons, la variabilité spatiale et entre espèces (sole et flet) des réponses est évaluée sur les individus de moins de 3 ans. Pour les soles, les individus de 4 (n=2 femelles et 1 mâle), 5 (n=2 femelles), 6 (n=1 mâle), 11 (n=1 mâle) et 13 (n=1 mâle) ans ne sont pas pris en compte dans les analyses spatiales et inter-espèces car trop peu nombreux et réparties sur plusieurs stations. L'approche privilégiée est l'analyse de variance paramétrique (ANOVA type II) suivie d'un test post hoc de Tukey. Cette approche est appliquée quand les conditions de normalité (test de Shapiro-Wilk) et d'homoscédasticité (test de Levene) sont vérifiées ($p > 0,05$) ou en limite d'application (p value proche de 0,05).

Quand les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité sont loin des conditions d'application d'une approche paramétrique même après transformation des données, l'analyse de variance est menée selon une approche non paramétrique : test de Kruskal Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn avec correction de Bonferroni (ou de Holm).

Pour comparer les occurrences (histopathologies), 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* 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.

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 baies de Seine et Somme

3.1 Echantillonnage et adaptation aux conditions de terrain

Cent quarante-huit (148) poissons plats ont été prélevés, 108 soles et 40 flets.

Plan d'échantillonnage

Cinq stations ont été prospectées (Figure 1). Vingt (20) à 25 soles ont été prélevées par station : Z1, Z5 et Z6 en baie de Seine, puis BS1 et BS2 en baie de Somme (Tableau 3). Vingt (20) flets ont été prélevés sur les 2 stations les plus côtières dans chacune des baies de Seine et Somme : Z1 et BS2 respectivement (Tableau 3). Aucun flet n'a été chaluté dans les stations plus au large des 2 baies.

Taille, âge

Parmi les 148 individus prélevés, l'âge a pu être estimé pour 132 d'entre eux ; les otolithes de 16 individus n'ont pas pu être prélevés ou étaient trop endommagés (cassés) pour être analysés. Les soles prélevées avaient une taille comprise entre 20,5 et 31,0 cm et un âge compris entre 1 et 13 ans (Figure 4). La majorité des soles (78 %) était âgée de 2 ou 3 ans (27 individus de 2 et 47 individus de 3 ans = 74/95 soles). Les flets prélevés avaient une taille comprise entre 22,0 et 37,0 cm et un âge compris entre 0 et 3 ans (Figure 4). La majorité des flets (86 %) était âgée de 1 ou 2 ans (17 individus de 1 et 15 individus de 2 ans = 32/37 flets). Les soles pêchées étaient dans la gamme d'âge prévue selon les recommandations d'OSPAR (25 cm environ pour un âge de 2-3 ans (OSPAR, 2012)) alors que les flets étaient une année plus jeune. Par rapport à la Loire, les soles de SELIMANCHE étaient en majorité une année plus âgées que les soles prélevées lors de la campagne SELILOIRE 2020 (Mauffret *et al.*, 2024).

Stade de développement des gonades

Les soles prélevées étaient majoritairement des femelles (32 mâles, 76 femelles). Les flets prélevés étaient majoritairement des mâles (30 mâles, 10 femelles). En Loire, lors de la campagne SELILOIRE 2020, le sexe ratio des soles prélevées était plus équilibré (64 mâles, 65 femelles).

Un examen histologique des gonades a été réalisé pour calculer le sexe-ratio et déterminer les stades de développement gonadal chez les poissons plats. Les proportions de chaque sexe et chaque stade sont présentés par espèce et par site dans le **Tableau 4**. Chez la sole, 96,1 % des femelles étaient en stade de prévitellogénèse et 56,3 % des mâles étaient en stade de spermatogénèse précoce. Dans le cas du flet, 88,9 % des femelles étaient en stade de pré-vitellogénèse et 85,7 % des mâles étaient immatures. La large majorité des individus est donc 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. La reproduction correspond en effet à un état physiologique qui s'accompagne de nombreux changements au niveau moléculaire, cellulaire et tissulaire. Ces changements modifient le métabolisme des individus et peuvent ainsi interférer avec certains marqueurs biologiques sélectionnés dans le cadre de cette étude, comme par exemple les biomarqueurs enzymatiques qui ont un rôle clef dans le métabolisme de nombreux composés endogènes. Au niveau chimique, le processus de ponte permet également à certaines espèces d'éliminer une partie de la fraction contaminante

liée à l'exposition à des substances chimiques hydrophobes. Ces substances peuvent en effet être bioaccumulées dans les lipides dont sont riches les produits de la ponte.

Indices de condition

Les rapports gonado-somatiques (RGS) et hépato-somatiques (RHS) permettent aussi 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. Chez des soles en période de repos sexuel, le RGS et le RHS moyen ne semblent pas dépasser 1 à 2 % et 1 %, respectivement (Deniel, 1981, Deniel and Tassel, 1985, Le Bec, 1985). Les RGS des soles sont tous <2 %, et les RHS de la plupart des soles sont < 1,2 % (sauf 17/108 soles : 1,2-1,8 %) (**Figure 4**). Les RGS des flets sont dans le même ordre de grandeur que ceux des soles, mais les RHS des flets sont supérieurs à ceux des soles, ils ont des foies proportionnellement plus gros que les soles et le seuil de 1 % n'est pas applicable pour les flets.

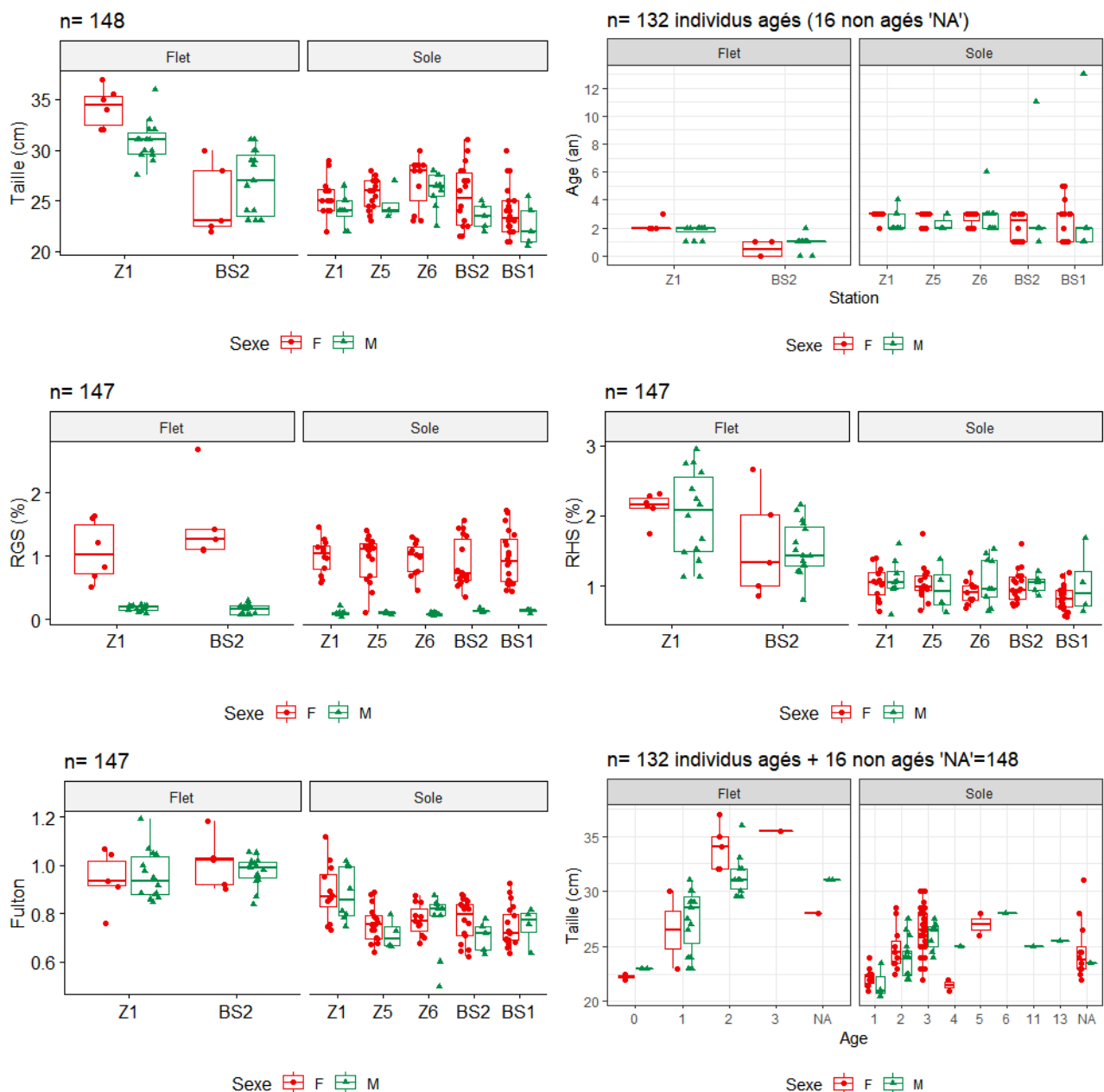


Figure 4 – Biométrie des soles et flets prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021.

Tableau 4 – Sexe ratio et proportion des stades de développement gonadique (%) identifiés histologiquement chez les soles et les flets échantillonnés lors de la campagne SELIMANCHE 2021 (stade femelle : 1: croissance, 2: vitellogénèse précoce ; Stade male 0: Immature; 1: Spermatogénèse précoce; 2: Spermatogénèse ; 3: Spermatogénèse tardive)

Stations	Sex Ratio (M:F)	(Female)	n	1	2	ND	(Male)	n	0	1	2	3	4	ND
Sole		Sole					Sole							
Z1	1:1.5	Z1	12	100,0	0,0	0,0	Z1	8	0,0	62,5	37,5	0,0	0,0	0,0
Z5	1:3.0	Z5	15	100,0	0,0	0,0	Z5	5	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Z6	1:1.2	Z6	11	100,0	0,0	0,0	Z6	9	0,0	66,7	22,2	0,0	0,0	11,1
BS1	1:4.0	BS1	20	95,0	5,0	0,0	BS1	5	0,0	40,0	40,0	20,0	0,0	0,0
BS2	1:3.6	BS2	18	88,9	5,6	5,6	BS2	5	20,0	0,0	0,0	40,0	20,0	20,0
Flet		Flet					Flet							
Z1	1:0.4	Z1	6	100,0	0,0	0,0	Z1	14	92,9	0,0	0,0	0,0	0,0	7,1
BS2	1:0.2	BS2	3	66,7	33,3	0,0	BS2	14	81,3	6,3	0,0	0,0	0,0	12,5

Variabilité spatiale

La taille, les indices de condition et le stade de maturité des gonades peuvent être des facteurs influençant les biomarqueurs analysés et les niveaux en contaminants. Leur variabilité est discutée ci-dessous pour évaluer la possibilité qu'ils constituent des facteurs confondants à l'analyse des réponses biologiques visées. Les individus ≥ 4 ans (uniquement des soles) sont trop peu nombreux pour être inclus dans cette analyse : 2 soles F et 1 M de 4 ans, 2 soles F de 5 ans, 1 sole M de 6 ans, 1 sole M de 11 ans et 1 sole M de 13 ans.

La taille des soles varie en fonction de l'âge (comme attendu), de la station et légèrement du sexe (**Figure 4, Tableau 5**). Les individus (≤ 3 ans) ont tendance à être plus grands (2 cm) et plus âgés (1 an) aux stations en baie de Seine qu'en baie de Somme (Seine : $25,8 \pm 2,0$ cm et $2,7 \pm 0,5$ ans, Somme : $24,0 \pm 2,7$ cm et $1,9 \pm 0,9$ ans, $p < 0,01$). Chez les soles mâles, les RGS, un indicateur indirect du stade de développement des gonades, sont plus faibles aux stations en baie de Seine qu'en baie de Somme pour les mâles (Seine : RGS : $0,09 \pm 0,03\%$ et Somme : $0,13 \pm 0,02\%$, $p < 0,011$). Chez les femelles, le RGS est plus faible chez les individus de 1 an que ceux de 2 ou 3 ans ($p = 0,003$), en lien avec leur possible maturité, mais ils sont similaires entre stations. Pour les individus de 3 ans et moins, les femelles sont légèrement plus grandes que les mâles ($p = 0,06$, **Tableau 5**).

La taille des flets varie en fonction de l'âge (comme attendu) et de la station (**Figure 4, Tableau 5**). Comme pour les soles, les flets pêchés en baie de Seine sont plus grands et plus âgés qu'en baie de Somme d'environ 6 cm et 1 an (Z1 : $32,0 \pm 2,6$ cm et $1,9 \pm 0,5$ ans, BS2 : $26,3 \pm 3,4$ cm et $0,8 \pm 0,5$ an, $p < 0,0001$). Les flets de baie de Seine ont des RHS, un autre indicateur indirect du stade de développement des gonades, plus élevés que ceux en baie de Somme (Seine (Z1) : RHS = $1,9 \pm 0,5$ et Somme (BS2) : RHS : $1,5 \pm 0,5\%$, $p = 0,007$, **Figure 4, Tableau 5**). Les RGS et l'indice de Fulton des flets sont similaires entre stations et/ou sexe et/ou âge.

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. Chez les soles, l'indice de Fulton est plus élevé à Z1 qu'aux autres stations en baies de Seine et Somme (**Figure 4, Tableau 5**). Chez les flets, l'indice de Fulton est similaire entre stations.

La proportion des différents stades de développement gonadique est similaire entre stations au sein de chacune des espèces (**Tableau 5**), ce qui suggère que ce facteur peut être considéré comme négligeable lors de l'étude des différences entre station dans la réponse des marqueurs chimiques et biologiques mesurés.

En résumé, les principales variables biométriques potentiellement confondantes à une analyse spatiale de la réponse des biomarqueurs et des concentrations en contaminants sont la taille et l'âge des individus qui semblent plus élevés en Seine qu'en Somme. Certains indices de conditions sont aussi différents entre

stations mais il ne semble pas y avoir de tendance commune (RGS chez les soles mâles : BS1≥BS2, Z1, Z5 ≥Z6, et RHS chez les flets : Z1>BS2).

Tableau 5 – Effet de la station, de l'âge et du sexe des individus sur leur taille et indices. Seules les p-values associées aux variables indépendantes ayant un effet significatif ($p < 0,05$) sont rapportées, autrement dit, les variables sans effet significatif ($p > 0,05$) sont testées mais non indiquées dans le tableau pour une meilleure lisibilité. Les différences significatives entre groupes selon le test post hoc de Tukey ($p < 0,05$) sont identifiées par des lettres.

Variable dépendante	Test de variance		Test post hoc	Approche ¹
	Variabiles indépendantes (=testées dans le modèle) ²	Variabiles ayant un effet significatif ($p < 0,05$) ³	Groupes différents ($p < 0,05$) ⁴	
Sole (age≤3ans⁵)				
Taille	Station*Age*Sexe	Station $p < 0,0001$	Z6 Z5 Z1 BS2 BS1 "a" "a" "ab" "ab" "b"	AOV, Tukey
		Age $p < 0,0001$	3 2 1 "a" "b" "c"	AOV, Tukey
		Sexe $p = 0,061$	F M "a" "b"	AOV, Tukey
Age	Station	Station $p = 0,0023$	Z1 Z5 Z6 BS1 BS2 "a" "a" "ab" "ab" "b"	KW, Dunn
Age	Sexe	Sexe $p = 0,0123$	F M "a" "b"	KW, Dunn
Stade gonades	Station	$p > 0,05$	NA	KW
Stade gonades	Sexe	$p > 0,05$	NA	KW
Log10(RGS) Femelle	Station*Age	Age $p = 0,003$	3 2 1 "a" "a" "b"	AOV, Tukey <i>Shapiro test: $p = 0,003$</i>
Log10(RGS) Male	Station*Age	Station $p = 0,011$	BS1 BS2 Z1 Z5 Z6 "a" "ab" "ab" "ab" "b"	AOV, Tukey <i>Levene Test : $p = 0,018$</i>
RHS	Station*Age*Sexe	$p > 0,05$	NA	AOV
Fulton	Station*Age*Sexe	Station $p = 0,00015$	Z1 Z6 BS2 BS1 Z5 "a" "b" "b" "b" "b"	AOV, Tukey
Flet				
Taille	Station*Age*Sexe	Station $p < 0,0001$	Z1 BS2 "a" "b"	AOV, Tukey <i>Levene Test : $p=0,031$</i>
		Age $p = 0,0013$	3 2 1 0 "a" "a" "b" "c"	AOV, Tukey
Age	Station	Station $p < 0,0001$	Z1 BS2 "a" "b"	KW, Dunn
Stade gonades	Station	$p > 0,05$	NA	KW
Stade gonades	Sexe	$p > 0,05$	NA	KW
Log10(RGS) Femelle	Station*Age	$p > 0,05$	NA	AOV
Log10(RGS) Male	Station*Age	$p > 0,05$	NA	AOV <i>Shapiro test: $p = 0,049$</i>
RHS	Station*Sexe	Station $p = 0,007$	Z1 BS2 "a" "b"	AOV, Tukey
Fulton	Station*Age*Sexe	$p > 0,05$	NA	AOV

¹ L'approche privilégiée est l'analyse de variance paramétrique (ANOVA type II) suivi d'un test post hoc de Tukey sur Station*Age*Sexe chez la sole et Station*Sexe chez le flet. Cette approche est appliquée quand les conditions de normalité (test de Shapiro-Wilk) et d'homoscédasticité (test de Levene) sont vérifiées ($p > 0,05$, dans ce cas les p-values de ces 2 tests ne sont pas rapportées) ou en limite d'application (p value $<$ mais proche de 0,05 ; dans ce cas, la p-value du test correspondant (Shapiro ou Levene) est alors indiquée dans le tableau). Quand les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité sont loin des conditions d'application d'une approche paramétrique même après transformation des données, e.g. log10 ($p \ll 0,05$), l'analyse de variance est menée selon une approche non paramétrique : test de Kruskal Wallis suivi d'un test post hoc de Dunn avec correction de Bonferroni sur la station et le sexe séparément.

² Modèle testé.

³ Variables indépendantes associées à une p-value significative ($p < 0,05$), les autres effets et interactions non significatifs ($p > 0,05$) ne sont pas rapportés pour la clarté du tableau, mais font partis des analyses paramétriques.

⁴ Les lettres définissent les groupes homogènes statistiquement selon le test post hoc de Tukey (si ANOVA) ou Dunn (si approche non paramétrique). Quand le test de variance est non significative ($p > 0,05$), le test post-hoc est « non applicable » = NA.

⁵ Pour les soles, les individus de 4 (n=2 femelles et 1 mâle), 5 (n=2 femelles), 6 (n=1 mâle), 11 (n=1 mâle) et 13 (n=1 mâle) ans ne sont pas pris en compte dans les analyses présentées dans ce tableau.

3.2 Réponses des biomarqueurs chez les poissons plats prélevés en Baies de Seine et Somme

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

L'intégrité des lysosomes a été estimée par l'analyse de la stabilité de la membrane lysosomale (LMS : Lysosomal Membrane Stability) et des changements au niveau de leur structure (LSC : Lysosomal Structural Changes) et de leur contenu (accumulation intracellulaire de lipides neutres).

Stabilité de la membrane lysosomale (test LMS, Lysosomal Membrane Stability)

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. Les valeurs moyennes de LP (Labilisation Period) peuvent être comparées aux valeurs de référence de BAC (Background Assessment Concentrations/Criteria ; valeur de contaminant ou de biomarqueurs mesurable dans une zone sans historique de contamination connue ; $BAC_{LP} = 20$ min) et EAC (Environmental Assessment Criteria ; niveau de réponse de la LMS au-dessus duquel un effet chronique n'est pas attendu pour les espèces marines ; $EAC_{LP} = 10$ min (Moore *et al.*, 2006, Davies and Vethaak, 2012)).

Données, seuil, sexe. Sur les 148 poissons échantillonnés lors de la campagne, 22 échantillons comportaient trop peu de tissu (foie) pour être analysés. La valeur moyenne de LP était de $9,2 \pm 3,6$ min pour l'ensemble des échantillons de soles (n = 94) et de $12,9 \pm 4,4$ min pour les flets (n = 32). Aucun effet significatif du sexe n'a été détecté sur ce paramètre pour les soles ni pour les flets (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Dans le cas présent, les valeurs moyennes de LP pour les sites BS1, BS2 et Z5 sont inférieures à la limite des 10 min suggérant l'action d'un stress environnemental. Bien que les valeurs des sites Z1 et Z6 soient supérieures à cette limite ($11,6 \pm 3,0$ min et $11,4 \pm 2,3$ min, respectivement), elles restent inférieures à la valeur de fond de 20 min (BAC). Ces résultats indiquent que les individus collectés sont soumis à un stress environnemental notamment pour les stations BS1, BS2 et Z5. Ce stress peut être d'origine anthropique (exposition à des contaminants chimiques). Certains facteurs naturels peuvent aussi expliquer des variations dans les valeurs de LP (*e.g.* manque de nourriture, changement brusque de la température). La stabilité de la membrane lysosomale est similaire entre mâles et femelles (sole et flet séparément, **Tableau 6**).

Age. Chez les flets, la valeur de LP diminue avec l'âge ($p < 0,0001$, Pearson R = -0,67, **Figure 5**) ce qui pourrait s'expliquer par une capacité de récupération plus lente chez les individus plus âgés et/ou un effet cumulé de la contamination au cours des années (Köhler *et al.*, 2002). Au contraire chez les soles prélevées pendant SELIMANCHE 21, la valeur de LP augmente avec l'âge chez les soles ; ce résultat est statistiquement significatif mais l'âge n'expliquerait que 9% de la variabilité de la stabilité de la membrane lysosomale observée ($r = 0,3$, $p = 0,007$, **Figure 5**). Chez les soles prélevées pendant SELILOIRE 20 (gamme d'âge plus large de 1 à 10 ans), la valeur du LP diminue aussi avec l'âge (Mauffret *et al.*, 2024).

Station. Chez les flets, la valeur moyenne de LP en baie de Seine (Z1 : 9,9 ± 2,8 min) est significativement inférieure à la valeur mesurée en baie de Somme (BS2 : 16,2 ± 3,4 min, **Tableau 6**). Au contraire, chez la sole, les moyennes de LP étaient plus faible en baie de Somme qu'en baie de Seine (Seine : 10,9 ± 2,8, Somme : 6,7 ± 3,1 min) et étaient significativement inférieures aux valeurs des stations en baie de Seine Z1 (11,6 ± 3,0 min) et Z6 (11,4 ± 2,3 min ; **Figure 5**).

Précédentes SELI. Lors de la campagne SELISEINE 2018, la stabilité de la membrane lysosomale avait été analysée chez des soles provenant de plusieurs sites dont les sites Z1, Z5 et Z6 qui sont en commun avec la campagne de 2021. Les valeurs obtenues pour ces sites ne différaient pas significativement des moyennes reportées ici (LP_(Z1-Sole) = 12,2 ± 2,7 min ; LP_(Z5-Sole) = 10,6 ± 2,2 min ; LP_(Z6-Sole) = 11,2 ± 2,9 min). Même si ce biomarqueur peut varier rapidement face à un stress environnemental, de l'ordre de plusieurs heures (Izagirre *et al.*, 2009), la constance de ces valeurs entre campagnes suggère une situation comparable entre 2018 et 2021.

Chez le flet, la valeur de LP à la station Z1 en 2021 était inférieure à celle de 2018 (12,5 ± 7,5 min), cette récente baisse de LP pourrait suggérer un changement des conditions environnementales en Z1.

Espèce. Concernant la comparaison entre espèces (soles et flets), les valeurs moyennes de LP enregistrées pour la sole étaient significativement inférieures à celles du flet pour BS2 mais similaires pour Z1 (**Tableau 6**).

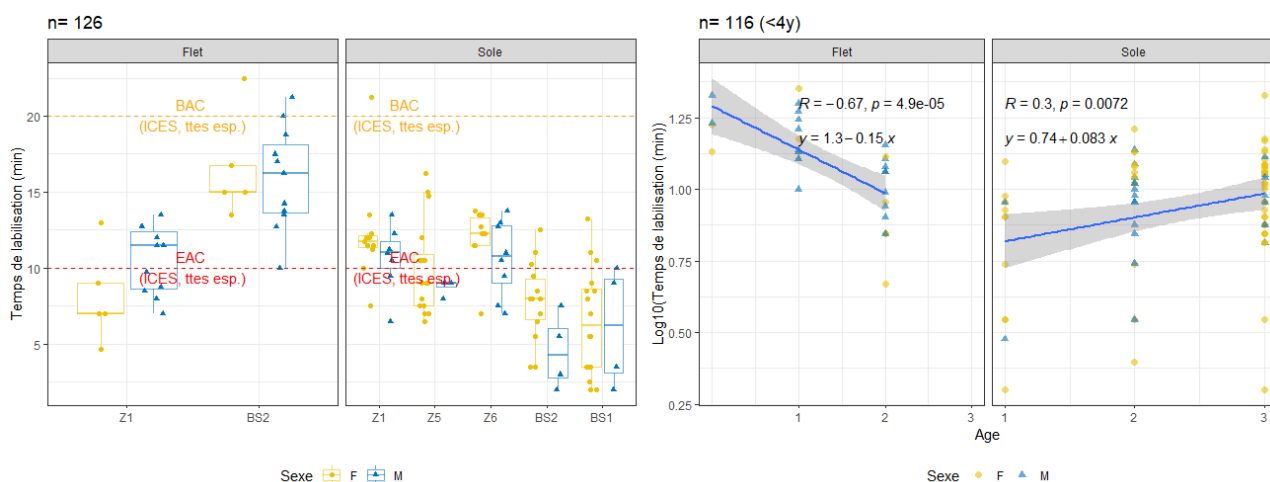


Figure 5 – Stabilité de la membrane lysosomale dans le foie de soles et flets prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021 selon la station (gauche) et l'âge (droite, coefficient de Pearson).

Tableau 6 – Effet de la station et du sexe des individus sur le temps de labilisation (min).

Variable dépendante	Test de variance	Test post hoc	Approche ¹
	Variables indépendantes (=testées dans le modèle) ²	Variables ayant un effet significatif (p < 0,05) ³	Groupes différents (p < 0,05) ⁴
Sole (age ≤ 3ans⁵)			
log10(LMS)	Station	Station p < 0,0001	Z6 Z1 Z5 BS1 BS2 "a" "a" "ab" "b" "b"
log10(LMS)	Sexe	p > 0,05	
Flet			
LMS (log)	Station*Sexe	Station p < 0,0001	BS2 Z1 "a" "b"
Sole (age ≤ 3ans⁵) + Flet			
LMS à Z1	Espèce	p > 0,05	NA
LMS à BS2	Espèce	P < 0,0001	Flet > Sole

^{1, 2, 3, 4, 5} voir description de l'approche dans la légende du **Tableau 5**

Changements structuraux des lysosomes (test LSC, Lysosomal Structural Changes)

Afin de compléter le biomarqueur basé sur la stabilité de la membrane lysosomale, les changements structuraux et de contenu des lysosomes ont été mesurés (Figure 6). Les altérations structurelles de lysosomes sont estimées par mesure de la densité volumétrique lysosomale ($Vv_{(lys)}$, en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$), le ratio Surface/Volume ($S_{(lys)}/V_{(lys)}$, en $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$, inversement proportionnel à la taille lysosomale) et la densité numérique lysosomale ($Nv_{(lys)}$, en $1/\mu\text{m}^3$). Au total, 94 soles et 38 flets ont été analysés pour ce biomarqueur. Aucun effet de sexe n'a été détecté chez la sole ni le flet (Mann-Whitney, $p > 0,05$).

Station. Chez le flet, aucune différence significative a été détectée entre les sites BS2 et Z1 (**Figure 6**, $Vv_{(lys)} = 0,0043 \pm 0,0015 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$, $S_{(lys)}/V_{(lys)} = 3,88 \pm 0,81 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$, $Nv_{(lys)} = 0,0034 \pm 0,0009 1/\mu\text{m}^3$).

Chez la sole, les individus provenant du site Z5 étaient caractérisés par une densité volumétrique lysosomale inférieure ($Vv_{(lys)} = 0,0008 \pm 0,0003 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$), un ratio Surface/Volume supérieur ($S_{(lys)}/V_{(lys)} = 7,90 \pm 0,87 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) et une densité numérique lysosomale supérieure aux autres stations ($Nv_{(lys)} = 0,0049 \pm 0,0013 1/\mu\text{m}^3$). Ces paramètres décrivent des lysosomes nombreux ($Nv_{(lys)}$) et de petite taille ($S_{(lys)}/V_{(lys)}$). À l'inverse, les individus provenant du site BS2 étaient caractérisés par une densité volumétrique lysosomale supérieure ($Vv_{(lys)} = 0,0014 \pm 0,0007 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$), un ratio Surface/Volume inférieur ($S_{(lys)}/V_{(lys)} = 5,86 \pm 1,23 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$) et une densité numérique lysosomale inférieure ($Nv_{(lys)} = 0,0033 \pm 0,0007 1/\mu\text{m}^3$). Dans ce cas, les lysosomes sont moins nombreux mais de plus grande taille.

Précédentes SELI et littérature. 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 SELIMANCHE 2021 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). En général, les valeurs de densité volumétrique obtenues pour la présente campagne étaient égales ou supérieures à des valeurs reportées pour la sole juvénile après exposition à différentes concentrations de contaminants modèles (Cd et B(a)P) en conditions de laboratoire (Briaudeau *et al.*, 2021, Briaudeau *et al.*, 2023). Les valeurs de densité numérique étaient 5 à 10 fois supérieures aux valeurs reportées chez la sole juvénile exposée à des sédiments naturellement contaminés (Briaudeau *et al.*, 2020) ou à des contaminants modèles (Briaudeau *et al.*, 2021, Briaudeau *et al.*, 2023). Les valeurs de densité volumétrique étaient également 5 à 10 fois supérieures aux valeurs reportées chez la sole juvénile exposée à des contaminants modèles (Briaudeau *et al.*, 2021, Briaudeau *et al.*, 2023) mais étaient similaires voire inférieures aux valeurs reportées après exposition à des sédiments naturellement contaminés (Briaudeau *et al.*, 2020). Ces observations suggèrent une réponse biologique à un stress environnemental sur plusieurs sites d'échantillonnage, en particulier pour les sites BS1 et BS2 pour lesquels les valeurs supérieures de $Vv_{(lys)}$ étaient enregistrées et pour les sites Z1 et Z5 pour lesquels les valeurs supérieures de $Nv_{(lys)}$ étaient enregistrées (**Figure 6**). 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 Vv et S/V chez les soles de SELIMANCHE 2021, il semblerait que les individus provenant de BS1 et BS2 soient plus affectés par un stress environnemental que ceux des autres stations en Seine. En particulier, dans le cas des individus provenant de BS2, les valeurs plus élevées de densité volumétrique (Vv) sont associées à des valeurs inférieures de S/V et Nv, suggérant une hypertrophie lysosomale avec fusion des organelles. Ce phénomène a déjà été décrit auparavant en réponse à un stress environnemental (Köhler *et al.*, 2002, Alvarado *et al.*, 2005). Ces observations sont en accord avec les résultats obtenus sur la stabilité de la membrane lysosomale montrant un état de santé général plus affecté pour les sites BS1, BS2 et Z5 pour la sole.

Espèce. Des différences entre espèces ont été détectées pour ce paramètre pour les deux sites Z1 et BS2 telles que : $Vv_{(lys)}(sole) < Vv_{(lys)}(flet)$ et $S_{(lys)}/V_{(lys)}(sole) > S_{(lys)}/V_{(lys)}(flet)$. Dans le cas de la densité numérique, $Nv_{(lys)}(sole)$ était significativement supérieur à $Nv_{(lys)}(flet)$ seulement pour le site Z1. En accord avec les observations faites précédemment sur la stabilité de la membrane lysosomale, les valeurs de biomarqueur sur la structure lysosomale peuvent varier entre espèces, ainsi que sa sensibilité.

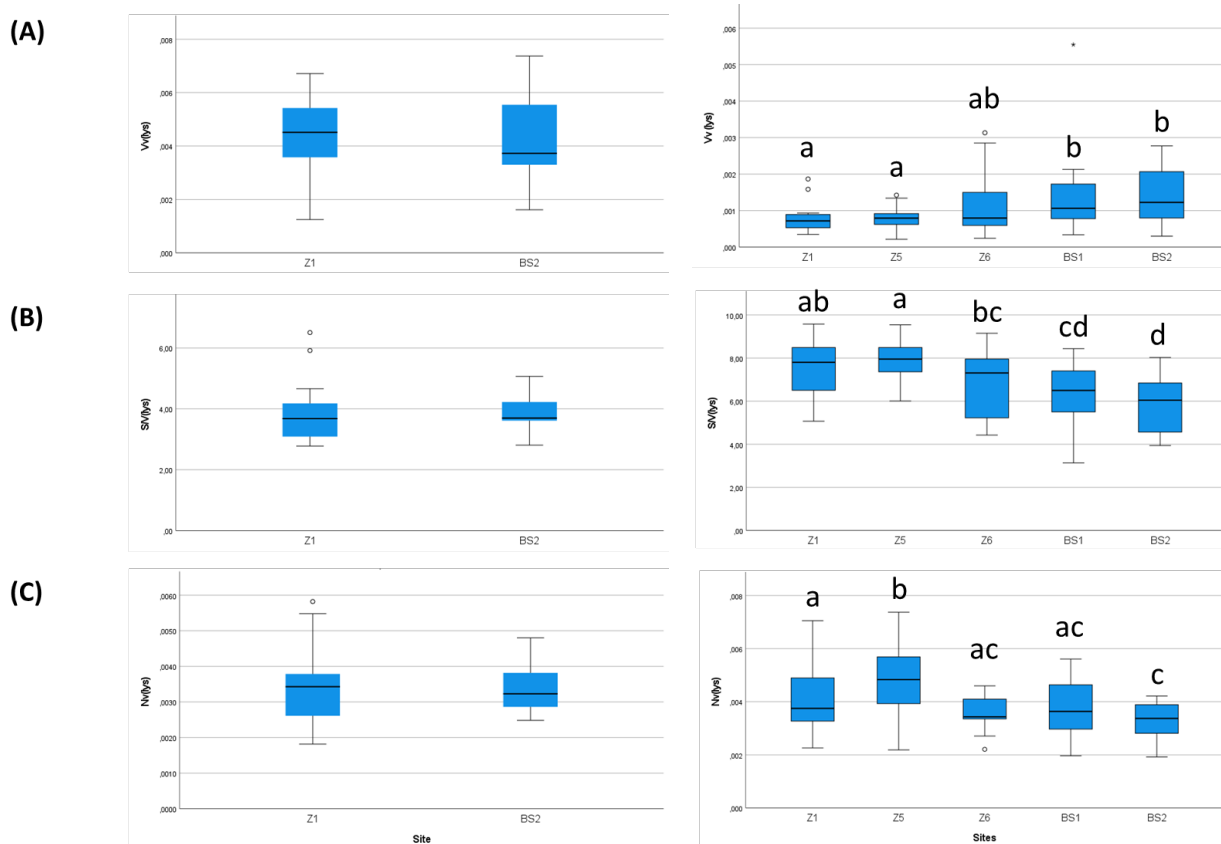


Figure 6 – Changements structuraux des lysosomes (test LSC) mesurés dans le foie de flets (gauche) et soles (droite) échantillonnés lors de la campagne SELIMANCHE 2021 : (A) densité volumétrique lysosomale ($Vv_{(lys)}$, en $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$); (B) ratio Surface/Volume ($S_{(lys)}/V_{(lys)}$, en $\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$); (C) densité numérique lysosomale ($Nv_{(lys)}$, en $1/\mu\text{m}^3$). Les différentes lettres indiquent des différences spatiales significatives (KW, Dunn, $p < 0,05$).

Accumulation intracellulaire de lipides neutres

Sexe, station, espèce. 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 considérée comme un précurseur de lésions hépatiques (Köhler *et al.*, 1992, Viarengo *et al.*, 2007). Dans le cas présent, le biomarqueur a été mesuré pour 98 soles et 37 flets au total. Aucun effet du sexe n'a été détecté pour ce paramètre (Mann-Whitney, $p > 0,05$). Chez la sole, la densité minimale Vv_{NL} est enregistrée pour le site Z5 ($Vv_{NL} = 0,0087 \pm 0,028 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$, **Figure 6**). Aucune différence spatiale n'est détectée dans le cas du flet ($Vv_{NL} = 1,02 \pm 1,17 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$). Les comparaisons inter-espèces montrent que les niveaux de Vv_{NL} étaient inférieurs chez la sole par rapport au flet pour les sites Z1 et BS2. L'accumulation moyenne de lipides neutres (Vv_{NL}) est supérieure aux valeurs reportées chez la sole cultivée (Briaudeau *et al.*, 2020, Briaudeau *et al.*, 2021, Briaudeau *et al.*, 2023).

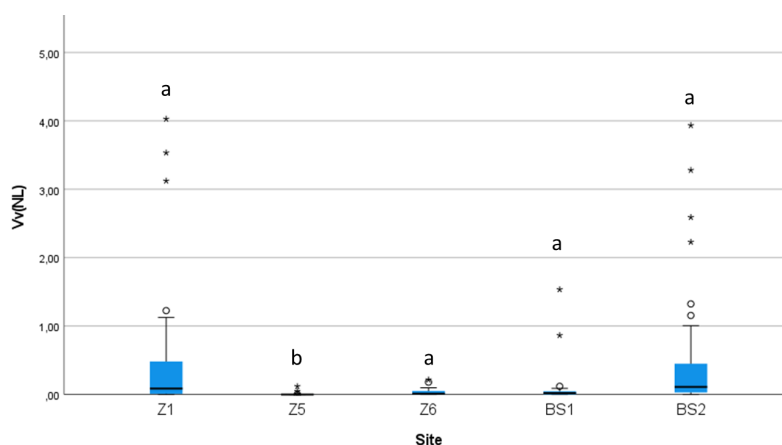


Figure 7 – Accumulation intracellulaire de lipides neutres (en $\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$) mesurée dans le foie de soles échantillonnées lors de la campagne SELIMANCHE 2021. Les différentes lettres indiquent des différences spatiales significatives (KW, Dunn, $p < 0,05$).

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. Comparativement aux micronoyaux, les cassures de brins de l'ADN peuvent être réparées et sont considérées comme un marqueur précoce d'exposition qui informe sur le stress génotoxique subi par l'organisme. Lorsqu'elles ne sont pas réparées, ces lésions peuvent avoir des conséquences sur l'expression du génome et sur la physiologie des organismes exposés. Chez les vertébrés, elles peuvent être mesurées dans les cellules sanguines par le test des comètes. Le niveau de fragmentation de chacune des cellules analysées est exprimé en pourcentage d'ADN présent dans la queue de la comète ou % Tail DNA : plus il est important et plus le nombre de cassures est grand. 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 valeurs moyenne par station variaient de 16 à 36% de cassures de brins de l'ADN (% Tail DNA correspondant au % de l'ADN dans la queue de la comète) ; elles étaient observées au niveau Est de la Baie de Seine (la zone prospectée la plus éloignée de l'estuaire) et à l'embouchure de la Seine, respectivement (Akcha *et al.*, 2003, Devier *et al.*, 2013).

Par ailleurs, les cassures de brins de l'ADN sont des lésions qui résultent d'un stress oxydatif et donc de la capacité des organismes à produire des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et à les neutraliser (niveaux de défenses antioxydantes enzymatiques et non enzymatiques). La production d'ERO au-dessus du niveau basal peut résulter de l'exposition à des substances chimiques ou de différents évènements (infection, suractivité, stress, hyperoxie,...). Il est donc difficile d'observer *in situ* des corrélations entre contamination chimique et dommages à l'ADN du fait de nombreux facteurs confondants non contrôlés. Ce type de relation (corrélations positives) a néanmoins été observée chez la limande de la Baie de Seine pour laquelle le niveau de cassures de brins de l'ADN dans les érythrocytes et les concentrations tissulaires en PCB, dioxines et furanes étaient corrélées (Akcha *et al.*, 2004a).

Données, seuil, sexe et âge. Sur les 148 poissons échantillonnés lors de la campagne, 8 soles n’ont pas pu être analysées. Le % Tail DNA varie de 18 à 66 % (moyenne : 33 %) chez les flets, et de 14 à 62 % (moyenne : 41 %) chez les soles. Ils sont tous supérieurs au BAC de 5 % ou à la valeur suggérant que les flets et soles de la Baies de Seine et Somme seraient soumis à un stress génotoxique. Les niveaux de dommage mesurés dans les flets sont deux fois plus élevés que ceux obtenus chez cette espèce aux mêmes stations au cours de la campagne SELISEINE 2018. Ils sont également plus élevés que ceux mesurés en baie de Seine depuis le début des années 2000 chez plusieurs espèces de poissons plats (15 à 34 % chez la limande dans (Akcha *et al.*, 2003), 15 à 21 % chez la limande dans (Devier *et al.*, 2013) et 5 à 25 % chez le flet dans (Burgeot *et al.*, 2017). Cette différence peut traduire une dégradation de la qualité de l’environnement ou un problème lié à la préparation ou à la conservation des échantillons. Ces échantillons ont en effet été collectés et analysés dans un contexte particulier (COVID et mobilité de personnels). Dans l’état actuel des connaissances, nous présentons ces données pour évaluer des différences spatiales ou inter-espèce mais ne les intégrons pas encore dans l’évaluation environnementale (3.4.2).

Le niveau de cassures de brins de l’ADN des cellules sanguines ne semble pas impacté par l’âge (**Figure 8**) ou le sexe (**Tableau 7**) des poissons analysés, ceci quel que soit l’espèce. Pour la sole une p-value significative est observée entre le niveau de cassures de brins de l’ADN et l’âge mais le coefficient de Pearson associé est très faible ($R = 0,25$, $p = 0,025$, **Figure 8**) expliquant donc seulement 6% de la variabilité des données.

Station. Le niveau de cassures de brins d’ADN est plus élevé en Somme (BS2) qu’en Seine (Z1) pour les flets (**Figure 8**, **Tableau 7**), mais pour les soles, il est plus élevé proche de la Seine (Z1 et Z5) qu’au large d’Antifer (Z6) et au large de la baie de Somme (**Figure 8**, **Tableau 7**).

Flet et sole. Des niveaux plus élevés de cassures de brins d’ADN chez la sole par rapport au flet avaient déjà été observés en Seine en 2018 (Mauffret *et al.*, 2021, Roubéix *et al.*, 2023). Cette différence de réponse suggère que les seuils développés pour le flet et la limande seraient peu protecteurs pour la sole.

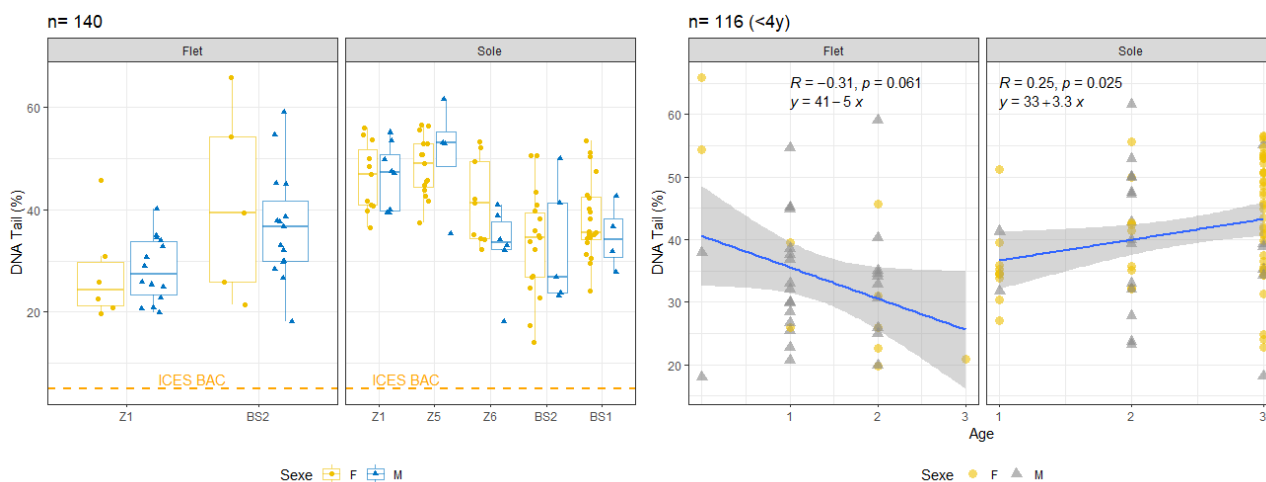


Figure 8 – Niveau de cassures de brins de l’ADN (%DNA Tail) mesuré par le test des comètes dans les érythrocytes de soles et flets prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021 selon la station (gauche) et l’âge (droite, coefficient de Pearson).

Tableau 7 – Effet de la station et du sexe des individus sur le niveau de cassures de brins de l'ADN (% d'ADN dans la queue de la comète).

Variable dépendante	Test de variance		Test post hoc	Approche ¹
	Variables indépendantes (=testées dans le modèle) ²	Variables ayant un effet significatif ($p < 0,05$) ³	Groupes différents ($p < 0,05$) ⁴	
Sole (age≤3ans⁵)				
DNA tail (%)	Sexe*Station	Station : $p < 0,0001$	Z5 Z1 Z6 BS1 BS2 "a" "a" "b" "b" "b"	ANOVA+Tukey
Flet				
DNA tail (%)	Sexe*Station	Station : $p = 0,003$	BS2 Z1 "a" "b"	ANOVA +Tukey
Sole (age≤3ans⁵) + Flet				
DNA tail (%) à Z1	Espèce	$P < 0,0001$	Sole > Flet	ANOVA +Tukey
DNA tail (%) à BS2	Espèce	$P = 0,35$	NA	ANOVA +Tukey

^{1, 2, 3, 4, 5} voir description de l'approche dans la légende du Tableau 5

3.2.2.2 Test des micronoyaux

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 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. 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)).

Chez les 148 poissons de la campagne SELIMANCHE 21, l'occurrence des micronoyaux varie de 0 à 0,6 micronoyaux/1000 cellules avec 141 poissons ne présentant pas de micronoyau (95 %).

Flet et sole : seuils. L'occurrence des micronoyaux chez les flets et soles en Seine et Somme est donc majoritairement inférieure à ces valeurs, ce qui suggère que la fréquence de cellules micronucléées chez les soles et flets de Seine et Somme sont de l'ordre des valeurs de fond.

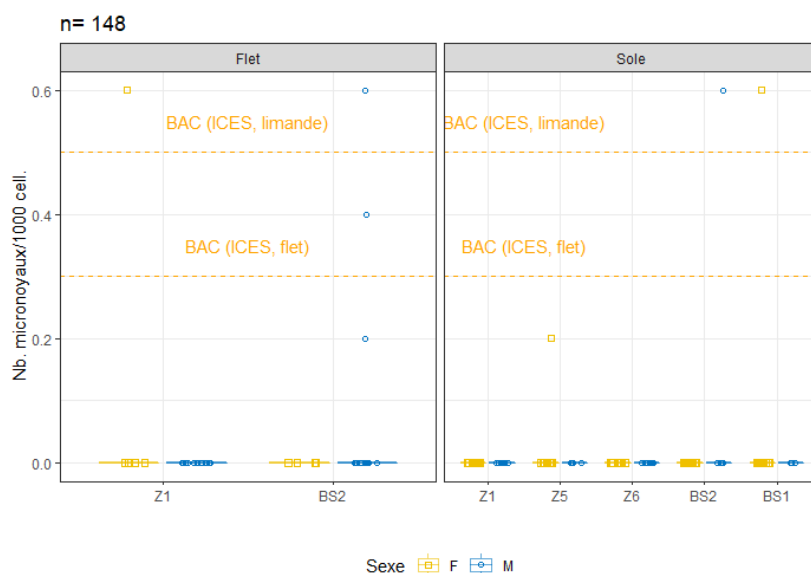


Figure 9 – Fréquence de cellules micronucléées (MN, ‰) dans les érythrocytes de soles et flets prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021 selon la station.

3.2.3 Biomarqueurs de neurotoxicité

L'enzyme AChE joue un rôle clef dans la transmission nerveuse. Elle a pour rôle d'hydrolyser un neurotransmetteur, l'acétylcholine, présent dans les récepteurs cholinergiques et permet ainsi de limiter le temps de la contraction musculaire. 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. 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 (Bocquéné *et al.*, 1993). 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). Selon les données 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).

Données. Sur les 148 poissons échantillonnés lors de la campagne, l'activité de l'enzyme AChE a été mesurée chez 135 individus (3 individus non analysés (pas assez d'échantillons) et 10 individus pour lesquels les données ont été qualifiées à « douteuses »). L'activité varie de 4 à 34 nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹ chez la sole et de 8 à 138 nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹ chez le flet. Ces données sont plus faibles que les données obtenues lors de la campagne SELISEINE 2018 pendant laquelle l'activité moyenne chez les soles, flets et limandes prélevés en Baie de Seine lors de la campagne était de 102 nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹ (min-max : 11-173), 112 nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹ (min-max : 55-756), 103 nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹ (min-max : 20-238), respectivement. Ces données sont aussi plus faibles que les données acquises en 2008 et 2009 en baie de Seine chez le flet et la limande (les moyennes par station allaient de 185 à 430 nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹ chez le flet et 182 à 231 nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹ chez la limande). Dans l'état actuelle des connaissances, nous présentons ces données mais ne les intégrons pas encore dans l'évaluation environnementale (3.4.2).

Seuil, sexe, âge. L'activité AChE chez le flet et la sole est inférieure à l'EAC pour toutes les stations analysées, suggérant que les soles subissent un stress neurotoxique. Pour les 2 espèces, elle est similaire entre mâles et femelles et ne varie pas avec l'âge entre 0 et 3 ans (**Figure 10**).

Station. Chez la sole, l'activité de l'AChE est inférieure (possiblement plus altérée) à BS2, elle est intermédiaire à l'embouchure de la Seine (Z1) et au large d'Antifer (Z6), et est enfin plus élevée au large de Ouistreham (Z5) et la baie de Somme (BS1, **Tableau 8**). Chez le flet, l'activité de l'AChE est similaire entre Seine (Z1) et Somme (BS2).

Espèce. A Z1 et BS2, où flets et soles ont été prélevés, l'activité de l'AChE est plus élevée chez les flets que chez les soles, comme suggéré par les travaux précédents (Roubeix *et al.*, 2023).

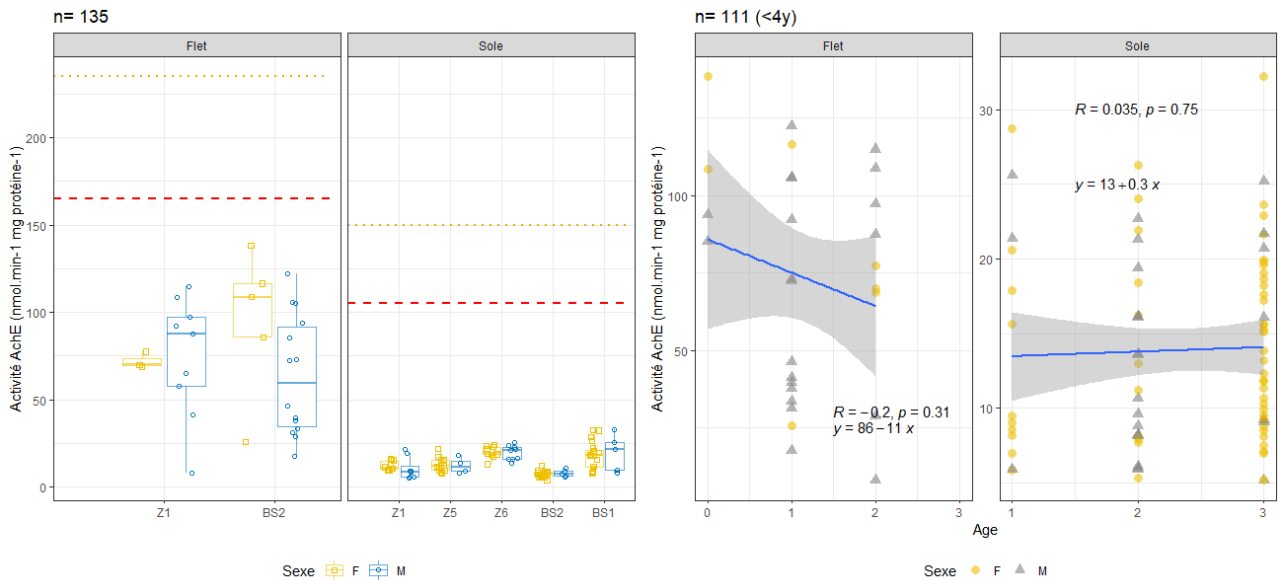


Figure 10 – Activité acétylcholine estérase (AChE) dans le muscle de soles et filets prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021 selon la station (gauche) et l'âge (droite, coefficient de Pearson). Sur les 2 panels de gauche, les lignes rouge et orange indiquent l'EAC et le BAC, respectivement. Pour le filet, les seuils sont développés pour cette espèce et pour la sole, les seuils développés pour la limande sont utilisés (Tableau 1).

Tableau 8 – Effet de la station et du sexe des individus sur l'activité AChE (nmol min⁻¹ mg protéine⁻¹).

Variable dépendante	Test de variance Variables indépendantes (=testées dans le modèle) ²	Variables ayant effet significatif (p < 0,05) ³	Test post hoc un Groupes différents (p < 0,05) ⁴	Approche ¹
Sole (age≤3ans⁵)				
AchE (log)	Station*Sexe	Station : p < 0,0001	Z6 BS1 Z1 Z5 BS2 "a" "a" "b" "b" "c"	ANOVA+Tukey Levene p = 0,02 Shap p = 0,02
Flet				
AchE (log)	Station*Sexe	P > 0,05	NA	AOV+Tukey Shap p = 0,004
Sole (age≤3ans⁵) + Flet				
AchE (log) à Z1	Espèce	P < 0,0001	Flet > Sole	ANOVA+Tukey Shap p = 0,001
AchE (log) à BS2	Espèce	P < 0,0001	Flet > Sole	ANOVA+Tukey

^{1, 2, 3, 4, 5} voir description de l'approche dans la légende du Tableau 5

3.2.4 Biomarqueurs d'exposition aux HAP : concentrations en métabolites biliaires 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). Chez les 148 poissons collectés, 142 échantillons de bile ont pu être analysés dont 5 étaient en limite de quantité (prise d'essai < 0,01 g).

Tableau 9 – Quantification des métabolites de HAP dans la bile de soles et flets prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021.

Métabolites	>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	9	53	80	6,3	0,3	2,9	0,3/1,0	
2 OH Naphthalène	19	120	3	13,3	1,0	51,1	1,0/3,0	
2+3 OH Phénanthrène	100	42		70,4	1,8	25,8	0,7/2,0	
1+9 OH Phénanthrène	112	30		78,9	0,5	16,0	0,2/0,5	3.7/528
4 OH Phénanthrène	21	105	16	14,8	0,2	1,5	0,2/0,5	
1 OH Pyrène	140	2		98,6	1,5	337,1 (1 supérieur à 665,7 : Z1F3)	0,5/1,5	16/483
9 OH Benzo(a)pyrène	114	26	2	80,3	1,0	152,6 (1 supérieur à 334,0 : Z1F3)	1,0/3,0	
3 OH Benzo(a)pyrène	4	48	90	2,8	10,0	37,0	10,0/30,0	

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**).

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 donc une exposition récente aux HAP et renseignent sur les capacités de détoxification des organismes.

Données et seuils. L'hydroxy-pyrène (1-OH-Pyr) est le métabolite le plus quantifié (99% des échantillons) et celui retrouvé aux niveaux les plus élevés chez les soles et flets de Seine et Somme (1 à 337 ng/g bile avec une valeur à 666 ng/g bile chez un flet de Z1 (Z1F3), 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 : 9-OH-Benzo(a)pyrène (80%) > 1+9-OH-phénanthrène (79%) > 2+3-OH-phénanthrène : 70%) > autres métabolites (1 et 2-OH-naphthalène, 4-OH-phénanthrène, 3-OH-Benzo(a)pyrène : <20%). Les analyses qui suivent dans ce présent rapport illustrent les concentrations pour les 4 métabolites de HAP majoritairement retrouvés (taux de quantification >70% ; **Figure 11**) et discutent la variabilité des 2 métabolites majoritaires (taux de quantification >80% ; **Tableau 10**). Un EAC est disponible pour les concentrations en 1-OH Pyr et pour le 1-OH phénanthrène (**Tableau 9**). En baies de Seine et Somme, les concentrations sont inférieures à l'EAC pour 1-OH pyrène et 1-OH phénanthrène.

Age et sexe. Les concentrations en 1-OH-pyrène et 9-OH-B(a)P augmentaient avec l'âge des flets et des soles ($p < 0,05$, **Figure 11**). Au contraire, les concentrations en hydroxy-phénanthrène ne variaient pas avec l'âge. Les concentrations de ces 2 derniers métabolites de HAP étaient plus élevées chez les flets males que les flets femelles, mais les concentrations en métabolites de HAP étaient similaires entre les 2 sexes pour la sole (**Tableau 10**).

Station. Les concentrations en métabolites de HAP dans la bile des flets et soles étaient plus élevées en Seine qu'en Somme. Chez les soles, elles étaient plus élevées aux stations proches des embouchures : Z1 (comparée à Z5 et Z6) et BS2 (comparée à BS1, $p < 0,05$ seulement pour le 9 OH-B(a)P).

Espèce. Les concentrations en métabolites de HAP sont plus élevées chez le flet que la sole (sauf 1 OH pyrène à BS2 : $p > 0,05$ **Tableau 10**).

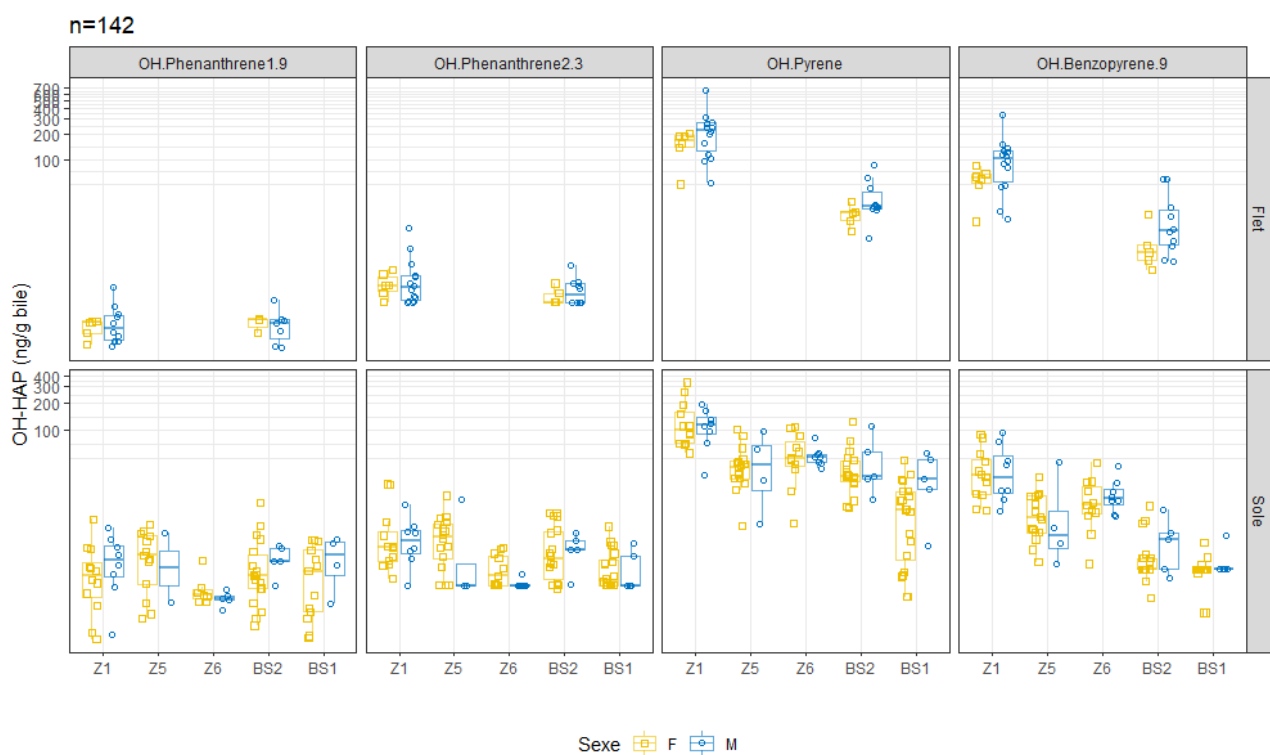
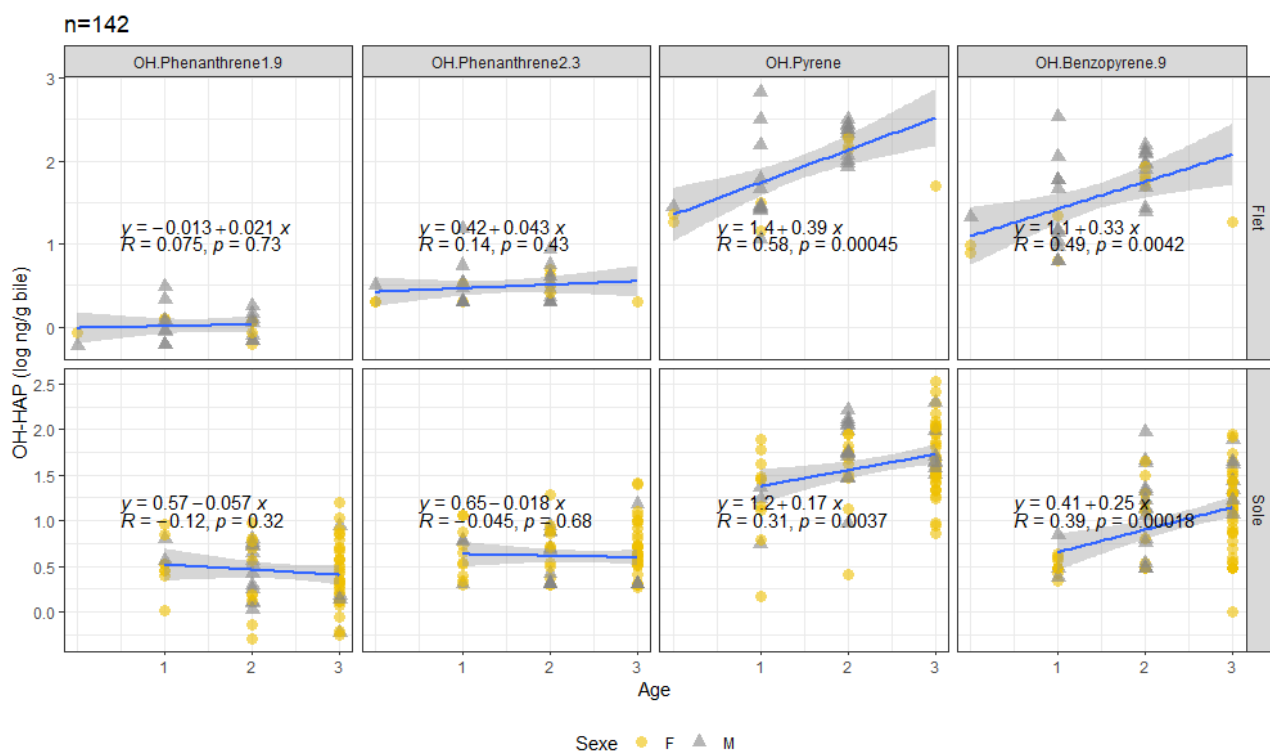


Figure 11 – Concentrations dans les 4 métabolites de HAP majoritairement retrouvés (>70 % de quantification) dans les biles de soles et fléts prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021, en fonction de la station (haut) ou de l'âge (bas).

Tableau 10 – Effet de la station et du sexe des individus sur les concentrations des 2 métabolites de HAP majoritairement retrouvés (>80 % de quantification, ng.g⁻¹ bile).

Variable dépendante	Test de variance		Test post hoc	Approche ¹
	Variables indépendantes (= testées dans le modèle) ²	Variables ayant un effet significatif (p < 0,05) ³	Groupes différents (p < 0,05) ⁴	
Sole (age≤3ans⁵)				
1 OH pyrène (log)	Station*Sexe	Station : p < 0,0001	Z1 Z6 Z5 BS2 BS1 "a" "b" "b" "c" "c"	AOV + Tukey Shapiro_test: p = 0,015
9 OH Benzo(a)pyrène (log)	Station*Sexe	Station : p < 0,0001	Z1 Z6 BS2 Z5 BS1 "a" "b" "b" "b" "c"	AOV + Tukey
Flet				
1 OH pyrène (log)	Station*Sexe	Station : p < 0,0001 Sexe : p = 0,04	Z1 > BS2 M > F	AOV + Tukey
9 OH Benzo(a)pyrène (log)	Station*Sexe	Station : p < 0,0001 Sexe : p = 0,04	Z1 > BS2 M > F	AOV + Tukey
Sole (age≤3ans⁵) + Flet				
1 OH pyrène (log) à Z1	Espèce	P = 0,015	Flet > Sole	AOV + Tukey
9 OH B(a)P (log) à Z1	Espèce	P = 0,001	Flet > Sole	AOV + Tukey
1 OH pyrène (log) à BS2	Espèce	P = 0,102	NA	AOV + Tukey
9 OH B(a)P (log) à BS2	Espèce	P < 0,0001	Flet > Sole	AOV + Tukey Shapiro_test: p = 0,005

^{1, 2, 3, 4, 5} voir description de l'approche dans la légende du **Tableau 5**

3.2.5 Histologie

3.2.5.1 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 60 mâles analysés (29 flets et 31 soles) prélevés en Seine et Somme en 2021 ne présentait d'intersex. L'analyse de l'intersex renseigne des effets à haut niveau biologique qui résultent de mécanismes biologiques complexes apparaissant en cascade 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).

3.2.5.2 Pathologies hépatiques chez les poissons plats

La présence de tumeurs hépatiques et de lésions associées est reconnue comme indicatrice d'une exposition longue à des contaminants chimiques cancérigènes tels que des HAPs, PCBs et leur métabolites (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 différait selon le site mais était souvent supérieur à 3 ans. La contribution de l'apparition des tumeurs hépatiques sur la mortalité des poissons plats n'a pas été montrée 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 145 des 148 individus prélevés ; trop peu de foie avait pu être prélevé pour 3 soles.

Lésions observées au niveau du foie

Station. La liste et la proportion (en %) de chaque lésion hépatique identifiée sont similaires entre les différentes stations (**Tableau 11**). Aucune différence spatiale n'a été identifiée entre prévalence.

Espèce. Chez le flet, les lésions les plus communément détectées étaient des centres de melanomacrophages observés chez 23 flets (/40), des nécroses (12/40) et la vacuolisation lipidique des hépatocytes (15/40, **Tableau 11**). Chez la sole, les lésions les plus couramment détectées étaient aussi des centres de melanomacrophages observés chez 95 soles (/104) ainsi que des cas d'infiltration lymphocytaire (37/105), qui correspondent à une activation du système immunitaire en réponse à une infection potentielle récente ou en cours. Dans le cas des centres de melanomacrophages, des facteurs tel que la contamination chimique et l'âge peuvent aussi expliquer leur apparition (Zorita and Cuevas, 2014). Dans le cas présent, la lésion a été identifiée à forte prévalence chez des individus jeunes (majoritairement ≤ 3 ans), suggérant que leur apparition pourrait être due à la contamination chimique.

Les foyers d'altération cellulaire sont des lésions pré-néoplasiques considérées précurseurs du développement de tumeurs bénignes ou malignes (Simpson *et al.*, 2000). Ils ont été identifiés chez 7 individus (/144) : 3 flets et 3 soles âgés de 0 à 2 ans et prélevés à Z1 et BS2, les stations les plus proches des embouchures, puis 1 sole de 3 ans à Z6.

Tableau 11 – Prévalence (en %) des pathologies hépatiques identifiées chez les flets et soles prélevés lors de la campagne SELIMANCHE 2021. La prévalence de chaque pathologie était similaire entre les 5 stations analysées selon un test z-score ($p < 0,05$).

Hepatic alterations	Flet				Sole			
	Z1 n = 20	BS2 n = 20	Z1 n = 19	Z5 n = 20	Z6 n = 19	BS2 n = 23	BS1 n = 23	
<i>Circulatory disturbances</i>								
Haemorrhage	0,0	0,0	21,1	15,0	5,3	13,0	31,8	
Hyperaemia	0,0	10,0	26,3	15,0	10,5	43,5	40,9	
<i>Inflammatory responses</i>								
Melanomacrophage Centres (MMCs)	70,0	45,0	100,0	100,0	94,7	82,6	82,6	
Lymphocytic infiltration	0,0	5,0	52,6	10,0	31,8	34,8	50,0	
<i>Regressive changes</i>								
Necrosis	15,0	45,0	57,9	55,0	26,3	30,4	40,9	
<i>Progressive changes</i>								
Fat Vacuolation of hepatocytes	15,0	60,0	0,0	5,0	15,8	8,7	17,4	
Hydropic Vacuolation of epithelial cells of bile duct	0,0	25,0	23,1	8,3	14,3	0,0	10,0	
Concentric periductal fibrosis of bile duct	8,3	25,0	7,8	0,0	21,4	0,0	10,0	
<i>Pre-neoplastic lesions</i>								
Foci of Cellular Alteration	10,0	10,0	5,26	0,0	5,26	4,35	0,0	
<i>Neoplastic lesions</i>								
	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	

Indice histopathologique hépatique

Un indice histopathologique hépatique est calculé pour chaque espèce et chaque site d'échantillonnage. Cet indice intègre l'importance pathologique de chaque lésion observée et son degré de dissémination dans l'échantillon.

Données, âge, sexe, station. Chez le flet, l'indice histopathologique varie de 0 à 26. Il semble diminuer avec l'âge (entre 0 et 3 ans, **Figure 12**). L'indice histopathologique était similaire chez les flets de Z1 et BS2 (moyenne \pm erreur standard : $5,00 \pm 1,44$ et $8,90 \pm 1,63$, respectivement), et entre mâle et femelle **Tableau 12**.

Chez la sole, l'indice histopathologique varie de 0 à 34. Il ne semble impacté ni par l'âge (jusque 3 ans, **Figure 12**) ni par le sexe (**Tableau 12**). L'indice histopathologique était plus élevé chez les soles de Z1 que de BS2

moyenne \pm erreur standard : $174 \pm 2,6$ et $9,06 \pm 1,2$, respectivement), les 3 autres stations ont une position intermédiaire entre Z1 et BS2.

Espèce. L'indice histopathologique hépatique était *ca.* 3,4 fois plus élevé chez la sole que le flet à Z1, mais il était similaire à BS2 (**Tableau 12**). Cette différence entre espèces a aussi été mentionnée dans d'autres études, à des niveaux moléculaire et sub-cellulaire : cassures de brins d'ADN, apparition de micronucléi et activité enzymatique (Burgeot *et al.*, 2017, Roubeix *et al.*, 2023). Cette dernière étude suggérait une meilleure adaptation du flet à des concentrations plus élevées de composés chimiques terrestres, liée à sa position plus en amont dans l'estuaire (Roubeix *et al.*, 2023).

Littérature. Les valeurs d'indice les plus basses enregistrées pour cette campagne sont comparables aux valeurs reportées chez la sole juvénile provenant d'un estuaire précédemment contaminé et actuellement en phase de récupération (Briaudeau *et al.*, 2019). En comparaison, les valeurs enregistrées pour le site Z1 sont comparables aux niveaux reportés chez la sole après exposition en laboratoire à des sédiments naturellement contaminés (Briaudeau *et al.*, 2020) ou à des contaminants modèles (Briaudeau *et al.*, 2021, Briaudeau *et al.*, 2023).

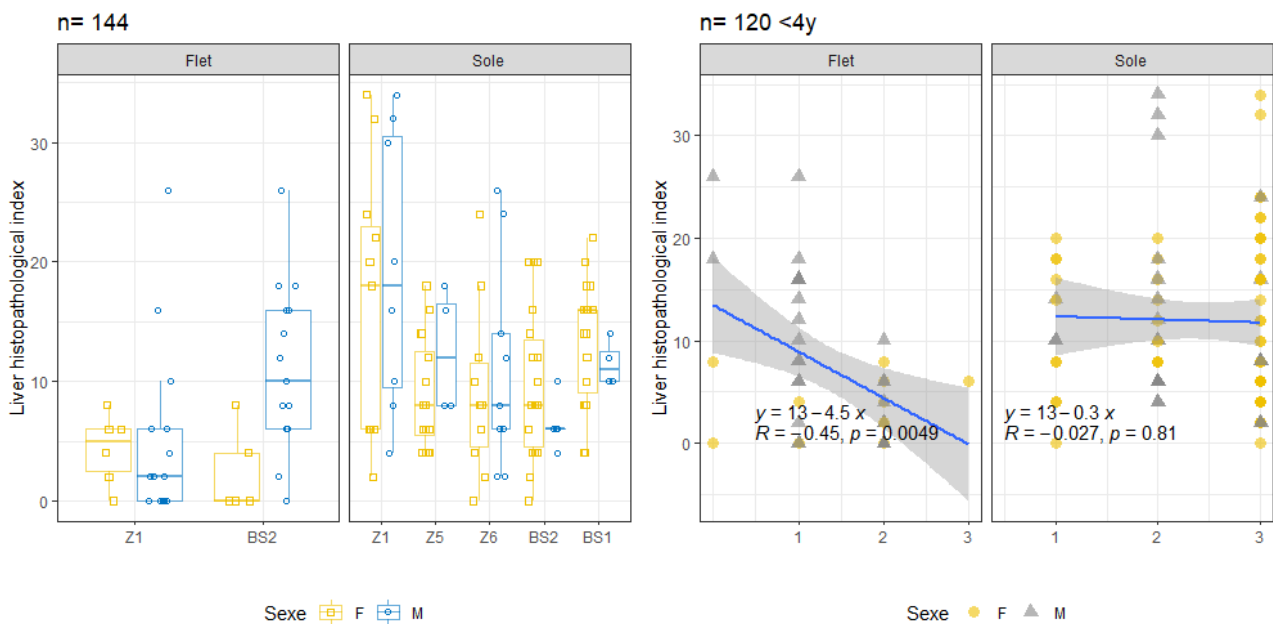


Figure 12 – Indice histopathologique hépatique calculé selon Bernet *et al.* (1999) et Costa *et al.* (2009) chez les flets et soles prélevées en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021, en fonction de la station (gauche) ou de l'âge (droite).

Tableau 12 – Effet de la station et du sexe des individus sur l'indice histopathologique hépatique.

Variable dépendante	Test de variance		Test post hoc	Approche ¹
	Variables indépendantes (=testées dans le modèle) ²	Variables ayant un effet significatif (p < 0,05) ³		
Sole (age≤3ans⁵)				
Indice histopatho. hép.	Station	P = 0,03	Z1 BS1 Z5 Z6 BS2 "a" "ab" "ab" "ab" "b"	KW + Dunn
Indice histopatho. hép.	Sexe	P > 0,05	P > 0,05	KW + Dunn
Flet				
Indice histopatho. hép.	Station	P = 0,04	P > 0,05	KW + Dunn
Indice histopatho. hép.	Station	P > 0,05	P > 0,05	KW + Dunn
Sole (age≤3ans⁵) + Flet				
Indice histopatho. hép. à Z1	Espèce	P < 0,001	Sole > Flet	KW + Dunn
Indice histopatho. hép. à BS2	Espèce	P > 0,05	NA	KW + Dunn

^{1, 2, 3, 4, 5} voir description de l'approche dans la légende du **Tableau 5**

3.2.5.3 Pathologies des gonades chez les poissons

Les prévalences des lésions au niveau des gonades ont pu être analysées pour 105 soles (76 femelles et 29 males) et 38 flets (11 femelles et 27 males). La liste et la proportion (en %) de chaque lésion identifiée au niveau des gonades pour chaque sexe est présentée dans les **Tableau 13** et **Tableau 14**. Aucune différence spatiale n'a été identifiée entre prévalence (test du Z-score). Dans le cas des femelles, les cas d'accumulation de lipides dans les ovocytes sont plus fréquemment observés chez les soles de Seine que chez les soles de Somme, et ils ne sont pas observés chez les flets (de Seine et de Somme). 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).

Indice histopathologique des gonades

Données, âge, sexe, station. Chez le flet, l'indice histopathologique varie de 0 à 8 chez les femelles et 0 à 12 chez les males. Il ne semble pas évoluer avec l'âge (entre 0 et 3 ans, **Tableau 13**). L'indice histopathologique était similaire chez les flets de Z1 et BS2 et entre mâle et femelle (**Figure 13** et **Tableau 15**).

Chez la sole, l'indice histopathologique varie de 0 à 24 chez les femelles et 0 à 10 chez les mâles, il est en moyenne *ca.* 2 fois plus élevé chez les femelles que les males (**Figure 13** et **Tableau 15**). Il ne semble pas évoluer avec l'âge (jusque 3 ans, **Figure 13**) et est similaire entre stations (**Tableau 15**). Ces valeurs sont comparables à des niveaux reportés chez la sole sauvage provenant d'un estuaire précédemment contaminé et actuellement en phase de récupération (Briaudeau *et al.*, 2019).

Espèce. À Z1, l'indice histopathologique des gonades est *ca.* 3 fois plus élevé chez la sole que le flet, mais ils étaient similaires à BS2 (**Tableau 15**). Ce résultat est en accord avec les observations faites pour le foie.

Tableau 13 – Prévalence (en %) des pathologies de la gonade identifiées chez les flets et soles mâles prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021.

Gonad alterations (chez les mâles)	Flet				Sole			
	Z1	BS2	Z1	Z5	Z6	BS2	BS1	
n	14	13	8	4	8	4	5	
<i>Circulatory disturbances</i>								
Haemorrhage	0	0	0	25	13	0	0	
Hyperaemia	0	0	13	0	0	50	40	
<i>Inflammatory responses</i>								
Melanomacrophage Centres (MMCs)	7	15	50	0	25	25	40	
Granulomatous	0	0	0	0	0	0	0	
Lymphocytic infiltration	0	23	0	0	13	25	0	
<i>Regressive changes</i>								
Necrosis	21	31	13	25	0	25	0	
Intersex	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Neoplastic lesions</i>								
	0	0	0	0	0	0	0	

Tableau 14 – Prévalence (en %) des pathologies de la gonade identifiées chez les flets et soles femelles prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021.

Gonad alterations (chez les femelles)	Flet				Sole			
	Z1	BS2	Z1	Z5	Z6	BS2	BS1	
n	6	5	12	16	11	17	20	
<i>Circulatory disturbances</i>								
Haemorrhage	0	20	8	6	27	18	15	
Hyperaemia	0	0	8	0	9	24	15	
<i>Inflammatory responses</i>								
Melanomacrophage Centres (MMCs)	17	0	8	0	0	12	5	
Granulomatous	0	0	0	0	0	0	0	
Lymphocytic infiltration	0	0	8	0	18	12	25	
<i>Regressive changes</i>								
Lipid in oocytes	0	0	58	63	73	35	35	
Necrosis	17	40	25	19	27	41	25	
Atresia	17	20	42	31	18	18	20	
Intersex	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Neoplastic lesions</i>								
	0	0	0	0	0	0	0	

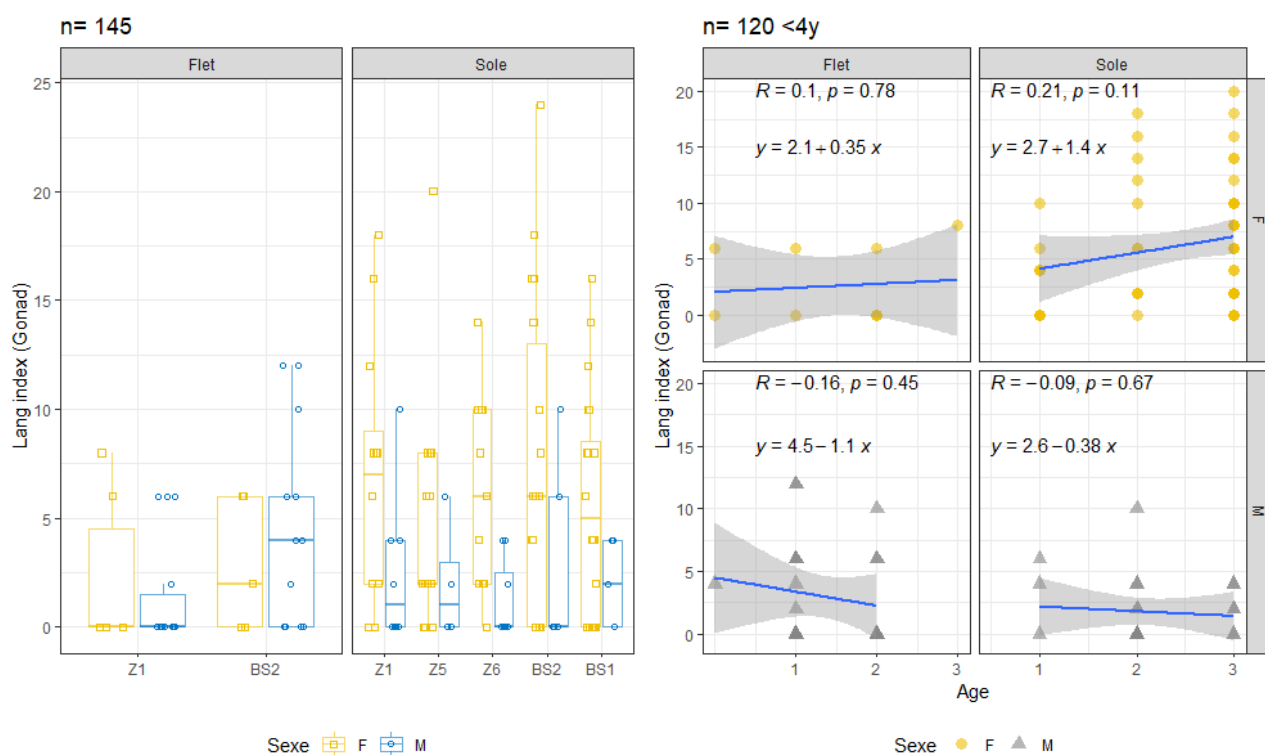


Figure 13 – Indice histopathologique pour la gonade calculé selon (Bernet et al., 1999) et Costa et al. (2009) chez les flets et soles prélevées en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021, en fonction de la station (gauche) ou de l'âge (droite).

Tableau 15 – Effet de la station et du sexe des individus sur l'indice histopathologique de Lang pour la gonade.

Variable dépendante	Test de variance		Test post hoc		Approche ¹
	Variables indépendantes (=testées dans le modèle) ²	Variables ayant un effet significatif ($p < 0,05$) ³	Groupes différents ($p < 0,05$) ⁴		
Sole (age≤3ans⁵)					
Indice histopatho. Gon.	Station	$P > 0,05$	$P > 0,05$		KW + Dunn
Indice histopatho. Gon.	Sexe	$P < 0,001$	Fem > Male		KW + Dunn
Flet					
Indice histopatho. Gon.	Station	$P > 0,05$	$P > 0,05$		KW + Dunn
Indice histopatho. Gon.	Station	$P > 0,05$	$P > 0,05$		KW + Dunn
Sole (age≤3ans⁵) + Flet					
Indice histopatho. Gon. à Z1	Espèce	$P < 0,01$	Sole > Flet		KW + Dunn
Indice histopatho. Gon. à BS2	Espèce	$P > 0,05$	NA		KW + Dunn

^{1, 2, 3, 4, 5} voir description de l'approche dans la légende du Tableau 5

3.3 Concentrations en contaminants

3.3.1 Contaminants organiques

Les analyses des contaminants organiques ont été réalisées dans le muscle de 30 poissons (5 individus par station et espèce : 5 soles et 5 flets à Z1 et BS2, ainsi que 5 soles à BS1 et 5 soles à Z5) à CCEM (Ifremer/Nantes). Les 30 individus sélectionnés étaient majoritairement des mâles (21 mâles/30) de 2 ans (23 individus de 2 ans/30) mais des femelles et des individus de 1 an ont aussi été analysés pour s'ajuster aux prélèvements de terrain. Les effets de l'âge et du sexe sur les niveaux de contamination organique ont été considérés négligeables pour des individus entre 1 et 2 ans.

Parmi les 56 substances appartenant à 5 familles (PCB, OCP, HBCDD, PBDE, PFAS), la moitié (28/56) sont retrouvés à des niveaux > LOQ dans plus de 90% des échantillons (>27/30) : la majorité des PCB : CB-28, CB-52, CB-77, CB-101, CB-105, CB-118, CB-123, CB-126, CB-138, CB-153, CB-156, CB-157, CB-167, CB-169, CB-180, CB-189 ; 2 métabolites du DDT : *p,p'*-DDE et *p,p'*-DDD, la dieldrine ; 2 PBDE : BDE-100 et BDE-154 et 7 PFAS : PFOS, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, PFTeDA. A l'inverse, 13 substances sont observées chez aucun ou 1 individu (β -HBCDD, γ -HBCDD, CB-81, CB-114, Aldrin, Isodrin, Endrin, PFBS, PFHpS, PFDS, PFHxA, PFHpA, *i.e.* <5% de quantification) et 8 sont observés dans moins de 50% des échantillons (α -HBCDD, *o,p'*-DDT, β -HCH, δ -HCH, PBDE 99, PBDE 153, PBDE 183, PFHxS).

Pour un poisson avec un taux de lipide < 3 % (pf) comme la sole et le flet et pour les substances lipophiles (PCB, OCP, PBDE, HBCDD), la comparaison au seuil se fait en pf. Dans ce cas, les seuils du **Tableau 2** sont convertis en pf avec le taux d'humidité moyen de l'espèce, donc les valeurs converties dépendent de l'espèce.

PCB

Les 7 PCB indicateurs (les 6 indicateurs + le dioxin-like (DL) CB-118) ont été quantifiés individuellement dans la grande majorité des échantillons analysés, à des concentrations moyennes comprises entre 92 pg/g pf pour le CB-28 et 5406 pg/g pf pour le CB-153. Les concentrations en Σ 7PCB varient de 0,59 à 87,86 ng/g pf (et 0,50 à 77,21 ng/g pf pour la Σ 6PCB considérée dans le seuil sanitaire : CB-28, -52, -101, -138, -153 and -180). Les concentrations les plus élevées déterminées en Z1 sont du même ordre de grandeur que les seuils sanitaires fixés par la Commission Européenne pour la consommation humaine (75 ng/g pf).

Parmi les congénères de type non dioxine, les EAC (en pf) sont dépassés pour plusieurs congénères en Seine (Z1 et Z5 chez la sole et Z1 chez le flet). Pour le CB-118, le seul congénère de type dioxine parmi les 7 congénères indicateurs communs, 100 % des individus (sole et flet) présentent des concentrations supérieures à l'EAC sauf à BS1 où 2 soles/5 présentent des concentrations supérieures à l'EAC (Figure 14).

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 58 % de la somme des 18 congénères (indicateurs et DL), heptachlorés (CB-180, 8 %) et pentachlorés (CB-101 et -118, 11 % et 14 %). 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 $4,1 \pm 1,1$.

Pesticides organochlorés (OCP)

Parmi les OCP recherchés, les *p,p'*-DDE et *p,p'*-DDD sont les isomères majoritaires (quantifiés dans 100 % des échantillons), à des concentrations moyennes de 260 et 49 pg/g pf respectivement. La dieldrine est quantifiée dans tous les échantillons également, à une concentration moyenne de $21,4 \pm 8,0$ et $120,4 \pm 65,8$ pg/g pf chez la sole et le flet, respectivement. Les isomères de l'HCH présentant les fréquences de quantification les plus élevées sont les alpha et gamma (80 % et 70 % des échantillons respectivement) ; les isomères beta et delta présentent des fréquences de détection de 37 % et 20 % respectivement (Figure 14).

Le profil des différents isomères de DDT montre la prédominance du *p,p'*-DDE (81 ± 10 % de la somme des isomères en moyenne) suivi du *p,p'*-DDD (12 ± 5 %).

Le ratio (*p,p'*-DDE+*p,p'*-DDD)/ Σ 5DDT, utilisé comme traceur du degré de dégradation du DDT, est en moyenne de $0,93 \pm 0,06$, indiquant clairement une origine ancienne (> 0,5). Le rapport *o,p'*-DDT/*p,p'*-DDT, utilisé comme traceur de l'origine du DDT, est en moyenne de $0,16 \pm 0,03$ (n = 10 individus pour lesquels les 2 congénères sont >LOQ (*i.e.* les 10 flets)), indiquant le DDT technique (dans lequel le *p,p'*-DDT est majoritaire) comme source de la contamination. Les profils en HCH indiquent que le lindane, interdit en 2008, est à l'origine de la contamination ($\alpha/\gamma < 1$, n=19).

PBDE

Les BDE-28, -49, -100 et -154 sont quantifiés dans plus de 80% des échantillons. Les concentrations moyennes par congénère sont comprises entre 1,3 pg g⁻¹ pf (BDE-28) et 40 pg g⁻¹ pf (BDE-47). Les concentrations de la somme des 8 congénères recherchés (BDE-28, -47, -49, -99, -100, -153, -154, -183) varient entre 1,3 pg g⁻¹ pf avec seulement 2 congénères quantifiés (ou 4,36 pg g⁻¹ pf lorsque la valeur LOQ/2 est imputée aux concentrations <LOQ, sole en BS1 (S24)) et 367 pg g⁻¹ pf (flet en Z1 (F20)). La somme des 6 congénères de la NQE (BDE-28, -47, -99, -100, -153, -154) dépasse le seuil de 8,1 pg g⁻¹ pf, basé sur la santé humaine, dans les muscles de 9 soles/10 en Seine et tous les flets (Z1 et BS2). Par contre, la NQE n'est pas dépassée chez les soles en Somme. Les concentrations en congénères individuels de PBDE sont tous inférieurs aux seuils FEQG (**Tableau 2**).

Les profils moyens en congénères de PBDE montrent la prédominance du BDE-47. Le BDE-47 et le BDE-100 comptent en moyenne respectivement pour 42 % et 29 % de la somme des congénères. Comme rapporté sur les soles de SELILORE 2017 et SELISEINE 2018 (Mauffret *et al.*, 2019, Mauffret *et al.*, 2021), une contribution relativement importante du BDE-154 est observée ici (30 %), plus importante chez la sole (39 ± 14 %) que chez le flet (12 ± 3 %) suggérant que la sole aurait de meilleures capacités métaboliques que le flet (Stapleton *et al.*, 2004).

HBCDD

Les 3 isomères majoritaires de l'HBCDD ont été recherchés. L'isomère α a été quantifié dans 43 % des échantillons à des concentrations comprises entre 0,9 (sole en Z5 (S7)) et 23,8 pg/g pf (flet en Z1 (F11)). Il n'est pas quantifié dans les soles de Z1 ou de BS1. Les 2 autres isomères recherchés (β et γ) sont quantifiés dans 0 et 1 (Z1F20) des 30 échantillons analysés. En se basant seulement sur les concentrations en α-HBCDD, les concentrations sont 3 à 4 ordres de grandeurs inférieures à la NQE.

PFAS

Le PFOS, le PFNA, le PFDA, le PFUnDA et le PFTTrDA sont retrouvés dans 100 % des échantillons. Les PFDoDA et PFTeDA sont retrouvés dans 97 % des échantillons, et le PFOA est >LOQ dans 73 % des échantillons (**Figure 14**). Le PFOS est quantifié dans tous les échantillons à des concentrations comprises entre 134 (BS1, soles) et 1392 pg g⁻¹ pf (BS2, soles). Il est le PFAS majoritaire, composant en moyenne 67% de la somme des 15 PFAS analysés. Ces concentrations sont inférieures à l'EQS du PFOS de 9,1 ng g⁻¹ pf et la QE (empoisonnement secondaire) de 33 000 ng g⁻¹ pf (**Figure 14**). Les concentrations en PFCA quantifiés à plus de 50% sont comprises entre 6,6 pg g⁻¹ pf (PFOA, 8 C, en BS1, soles) et 1107 pg g⁻¹ pf (PFDA, 10 C, BS2, soles). A l'exception d'une sole de BS2, les concentrations en PFOS, PFOA, PFNA et PFHxS sont inférieures aux seuils sanitaires appliqués depuis Janvier 2023 aux poissons (**Tableau 2**). La sole BS2S6 présentait des concentrations en PFNA de 0,59 ng g⁻¹ pf, soit un dépassement du seuil fixé à 0,5 ng g⁻¹ pf et des concentrations en somme des 4 PFAS inclus dans le seuil (PFHxS, PFOS, PFOA, PFNA) de 0,2004 ng g⁻¹ pf, soit un dépassement du seuil fixé à 0,2000 ng g⁻¹ pf.

Les concentrations sont du même ordre de grandeur que celles observées en Seine en 2018. Des différences significatives (p = 0,0004 pour PFOS et < 0,0001 pour Σ PFCA, test de Kruskal-Wallis) ont toutefois été observées sur les soles en zone 1, avec des concentrations 3 à 4 fois inférieures en 2021 par rapport à 2018. Pour les flets de Z1 et les soles de Z5, cette différence n'est pas observée.

Différences entre espèces et stations de SELIMANCHE 2021

Pour les contaminants hydrophobes PCB, DDT, PBDE, les analyses ont été menées en poids lipidique sur un congénère de fort taux de quantification, considéré comme représentatif de chaque famille (**Figure 14** et **Tableau 17**). Ces substances sont en effet corrélées entre elles au sein de chaque famille avec un coefficient

de Pearson > 0,8 sauf pour les PCB : CB-77, CB-126 et CB-169 : $r \geq 0,64$, pour les DDT : p,p'-DDE et p,p'-DDT : $r = 0,69$ et sauf pour les PBDE entre BDE-47 et BDE-154, $r = 0,76$ (**Figure 31**).

Pour les contaminants lipophiles (PCB, DDT, PBDE), les concentrations sont plus élevées chez le flet que la sole, et en Seine qu'en Somme (**Tableau 17**). Pour ces substances, il est donc probable que la source principale de contamination de la Manche (coté France) soit en Seine (**Figure 31**).

Pour la dieldrine, l'effet de l'espèce dépend de la station : les flets de Seine et les soles de Z5 sont plus contaminés que les soles de BS1, et les groupes Flet_BS2, Sole_Z1, Sole_BS2 présentent des concentrations intermédiaires. Les données suggèrent que la dieldrine viendrait d'une source plus diffuse sur l'ensemble des côtes de la Manche que les PCB, DDT et PBDE.

Pour les PFAS, les analyses ont été menées en poids humide avec le PFOS comme représentant des acides sulfoniques et le PFNA et PFTeDA comme représentant des acides carboxyliques. Le PFNA est relativement bien corrélé aux autres acides carboxyliques quantifiés dans les 30 échantillons analysés ($p \geq 0,74$), et le PFTeDA, légèrement moins ($p \geq 0,46$, sans compter le PFOA quantifiés dans 22/30 échantillons, **Figure 31**). Les concentrations en PFAS semblent similaires entre sole et flet **Tableau 17**. Les concentrations en PFOS sont aussi similaires en Seine et Somme, les concentrations en PFNA semblent plus élevées en Seine qu'en Somme et, inversement, les concentrations en PFTeDA semblent plus élevées en Somme qu'en Seine.

Tableau 16 - Teneurs en lipides (% pf) et concentrations (moyenne, min-max (avec les <LOQ), n>LOQ/ntot, pg/g pf) en contaminants organiques dans les muscles de soles et flets prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021 (n = 5/couple Espèce*Station, données <LOQ substituées par LOQ/2).

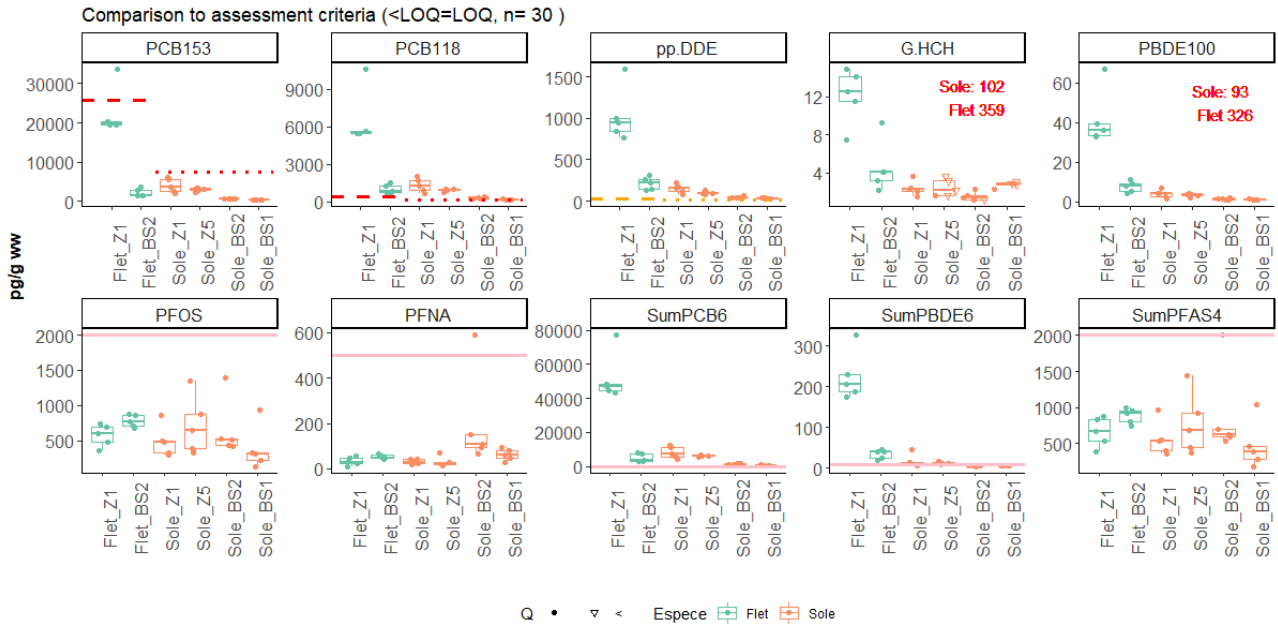
	Lipides (%)	Σ 7CB ^a	p,p'-DDE	Dieldrine	α HCH	BDE-100	α -HBCDD	PFOS	Σ 7PFCA ^b
Sole									
Z1	0,5 0,44-0,62 5/5	9 460 4 554-14 210 c	140 77-215 5/5	24,8 15,1-34,7 5/5	0,38 0,22-0,59 4/5	3,7 1,4-6,6 5/5	<LOQ 2,8-3,4 0/5	492,3 302,2-857,3 5/5	178,7 148,2-219,5 c
Z5	0,4 0,28-0,44 5/5	7 139 5 995-7 903 c	98 83-129 5/5	24,8 12,7-37,2 5/5	0,28 0,12-0,62 3/5	3,3 1,9-4,2 5/5	1,1 0,7-1,7 3/5	717,8 332,9-1348,2 5/5	203,9 102,0-392,6 c
BS2	0,5 0,40-0,55 4/4	1 709 1 579-2 041 c	45 38-60 5/5	21,1 16,6-28,7 5/5	0,36 0,27-0,60 5/5	1,2 0,8-1,7 5/5	1,5-2,1 0,7-2,1 2/5	655,4 417,8-1394,7 5/5	777,1 314,0-2284,4 c
BS1	0,5 0,38-0,76 5/5	733,3 603-1039 c	30 24-38 5/5	14,9 9,6-28,9 5/5	0,37 0,15-0,70 2/5	0,9 0,7-1,1 5/5	<LOQ 0,5-0,8 0/5	386,2 133,7-935,4 5/5	204,8 115,9-309,0 c
Flet									
Z1	1,9 1,50-2,36 5/5	58 832 49 369-87 853 c	1029 769-1591 5/5	176,3 119,3-232,3 5/5	2,57 1,06-3,59 5/5	41,7 33,0-67,0 5/5	13,7 8,3-23,8 5/5	572,6 354,5-732,1 5/5	297,4 149,2-416,4 c
BS2	1,4 0,99-2,21 5/5	5942,1 9191-37325 c	216 135-316 5/5	64,7 46,2-91,0 5/5	1,53 0,52-3,60 5/5	7,4 4,0-11,4 5/5	1,2 0,64-2,1 4/5	774,5 673,4-869,0 5/5	283,0 219,6-325,8 c

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

^b : PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTeDA, PFTeDA

^c : n>LOQ/ntot : non pertinent pour les sommes. Les 2 sommes du tableau sont basées sur des substances majoritairement quantifiées : 1) Pour la somme des PCB, tous les congénères sont quantifiés dans tous les échantillons sauf CB-28 et CB-52 qui sont <LOQ (pour la sole numéro 23 de la station BS1 : BS1S23), 2) Pour la somme des 7 PFCA, PFOA (>LOQ : 22/30), PFDoDA et PFTeDA (29/30), les 4 autres substances sont >LOQ dans les 30 échantillons.

A



B

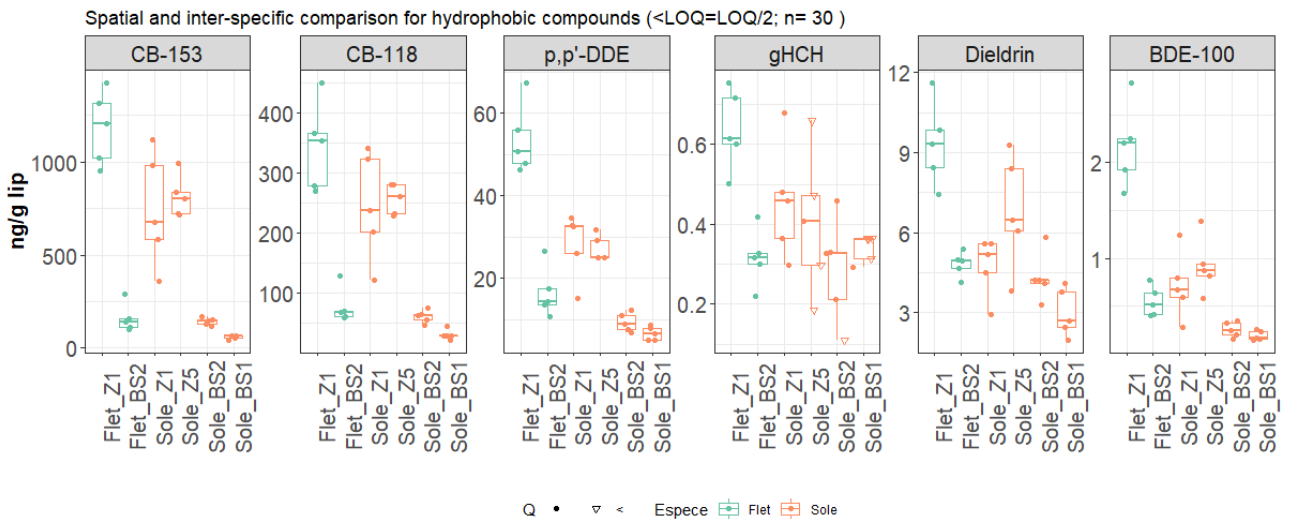


Figure 14 – Concentrations en contaminants organiques dans les muscles de flets et soles de 1 et 2 ans prélevées en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021, A : en poids humide pour comparaison aux seuils (rouge : seuil santé environnementale (hachuré : flet, pointillé : sole), orange : BAC, rose : seuil santé humaine), B : en poids lipidique pour comparaison spatiale et entre espèce.

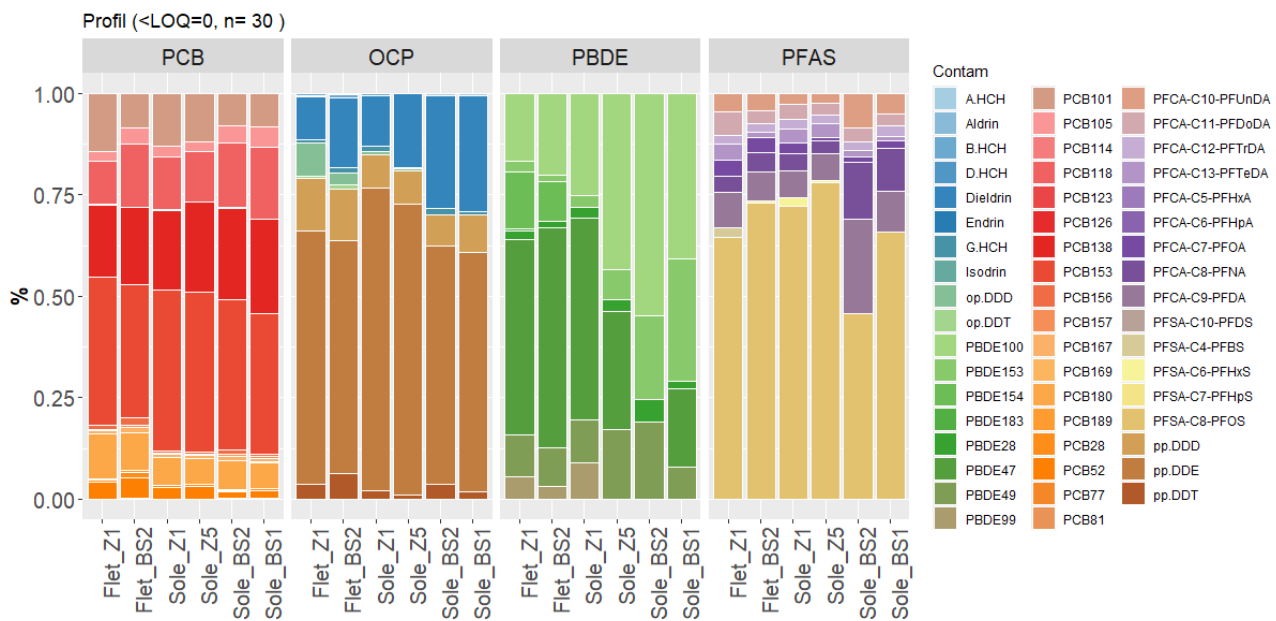


Figure 15 – Profil de contamination dans les muscles de filets et soles de 1 et 2 ans prélevées en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021 pour les principales familles de contaminants organiques quantifiées.

Tableau 17 – Effet de l'espèce, la station et leur interaction sur les concentrations en contaminants organiques (sélection de 6 substances quantifiées dans 100% des échantillons, effets testés : Espèce*Station, <LOQ=LOQ/2).

Variable dépendante	Test de variance		Test post hoc	Approche ¹
	Variables indépendantes (=testées dans le modèle) ²	Variables ayant un effet significatif (p < 0,05) ³	Groupes différents (p < 0,05) ⁴	
CB-118 (log lip)	Espèce*Station	Espèce : P = 0,024 Station : P < 0,0001	Flet > Sole Z1 Z5 BS2 BS1 "a" "a" "b" "c"	AOV + Tukey
p,p'-DDE (log lip)	Espèce*Station Station	Espèce : P < 0,0001 Station : P < 0,0001	Flet > Sole Z1 Z5 BS2 BS1 "a" "a" "b" "c"	AOV + Tukey
Dieldrin (log lip) ⁵	Espèce*Station	Espèce : P = 0,002 Station : P < 0,0001 Espèce_Station : P = 0,02	Flet > Sole Z1 Z5 BS2 BS1 "a" "a" "ab" "b" Flet_Z1 Sole_Z5 Flet_BS2 Sole_Z1 Sole_BS2 Sole_BS1 "a" "ab" "b" "bc" "bc" "c"	AOV + Tukey
BDE-100 (log lip)	Espèce*Station Station	Espèce : P < 0,0001 Station : P < 0,0001	Flet > Sole Z1 Z5 BS2 BS1 "a" "a" "b" "b"	AOV + Tukey
PFOS (log ww)	Espèce*Station	P > 0,05	NA	AOV + Tukey
PFNA (log ww) ⁶	Espèce*Station	Station : P < 0,001	BS2 BS1 Z1 Z5 "a" "ab" "bc" "c"	AOV + Tukey
PFTeDA (log ww) ⁶	Espèce*Station	Station : P < 0,001	Z5 Z1 BS2 BS1 "a" "a" "b" "c"	AOV + Tukey

^{1, 2, 3, 4} voir description de l'approche dans la légende du Tableau 5

⁵ Dieldrine : l'interaction Espèce*Station est légèrement significative, les effets principaux sont donc rapportés à titre indicatif mais l'effet à considérer est l'interaction.

⁶ PFNA : 1 outlier à BS2 retiré pour l'ANOVA (BS2S6, Figure 14) pour ne pas déséquilibrer l'analyse et rester dans les conditions d'application des tests. Mais avec ou sans l'outlier la conclusion est la même : les poissons de la station BS2 présentent aussi des concentrations supérieures aux 3 autres stations.

3.3.2 Contaminants métalliques

Parmi les ETM recherchés, certains sont essentiels pour le vivant (oligoéléments *e.g.* Cu, Fe, 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 chez les organismes testés (*e.g.* 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 SELIMANCHE 2021, 10 flets (1-2 ans) et 40 soles (29 individus de 1-2 ans sur l'ensemble des stations + 9 individus de BS1 entre 3 et 13 ans, et 2 individus de BS2 de 3 et 11 ans) ont été analysés pour leurs concentrations en Hg dans le muscle, et en 19 éléments traces dans le foie (Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Sn, Tl, U, V, Zn). Sur ces 20 éléments recherchés, seuls ceux présentant des critères analytiquement corrects sont ici représentés, décrits et testés statistiquement (*i.e.* taux de récupération satisfaisants par rapport aux CRM, et plus de 50% des concentrations estimées >LOQ ; voir ci-dessus « Analyses statistiques, gestion de données censurées »), à savoir : Hg dans le muscle, et Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Tl, U, V et Zn dans le foie (soient 15 éléments).

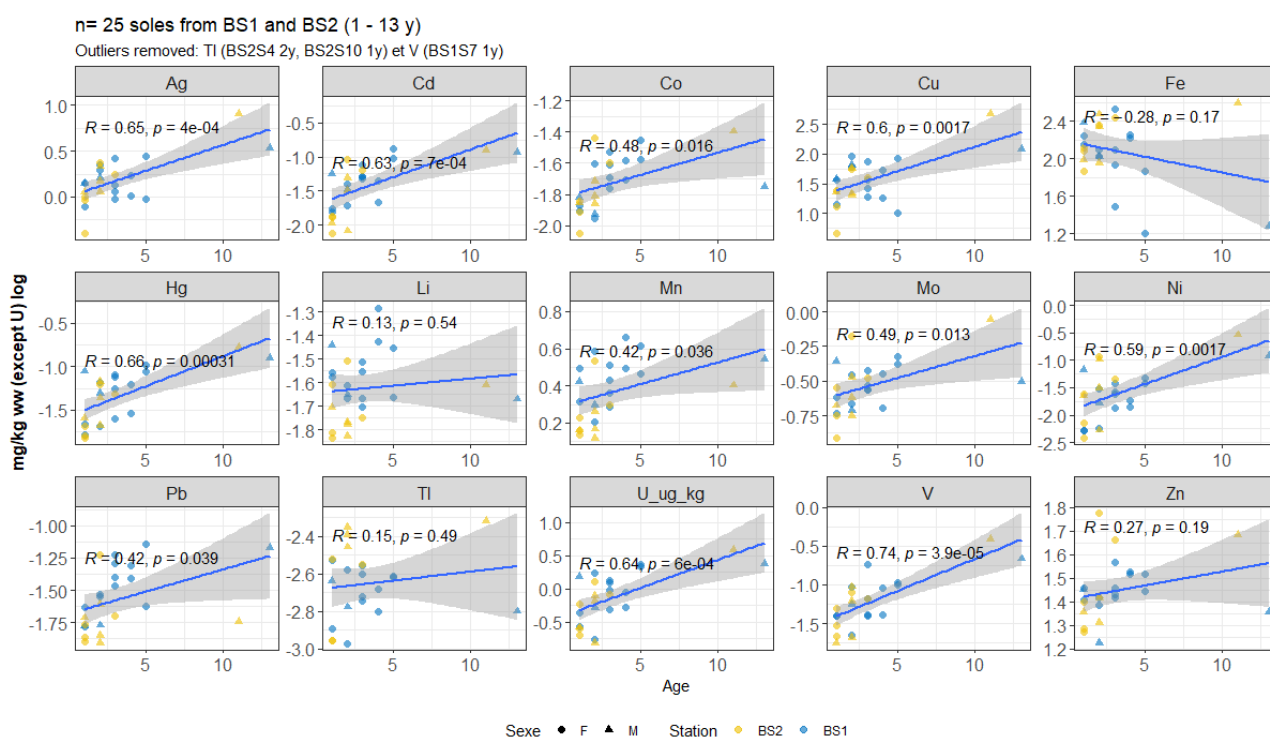


Figure 16 – Concentrations en ETM mesurées dans le muscle (Hg) ou le foie (autres éléments) de soles prélevées en baie de Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021 en fonction de A : l'âge des soles âgées 1 à 13 ans (Pearson corrélation).

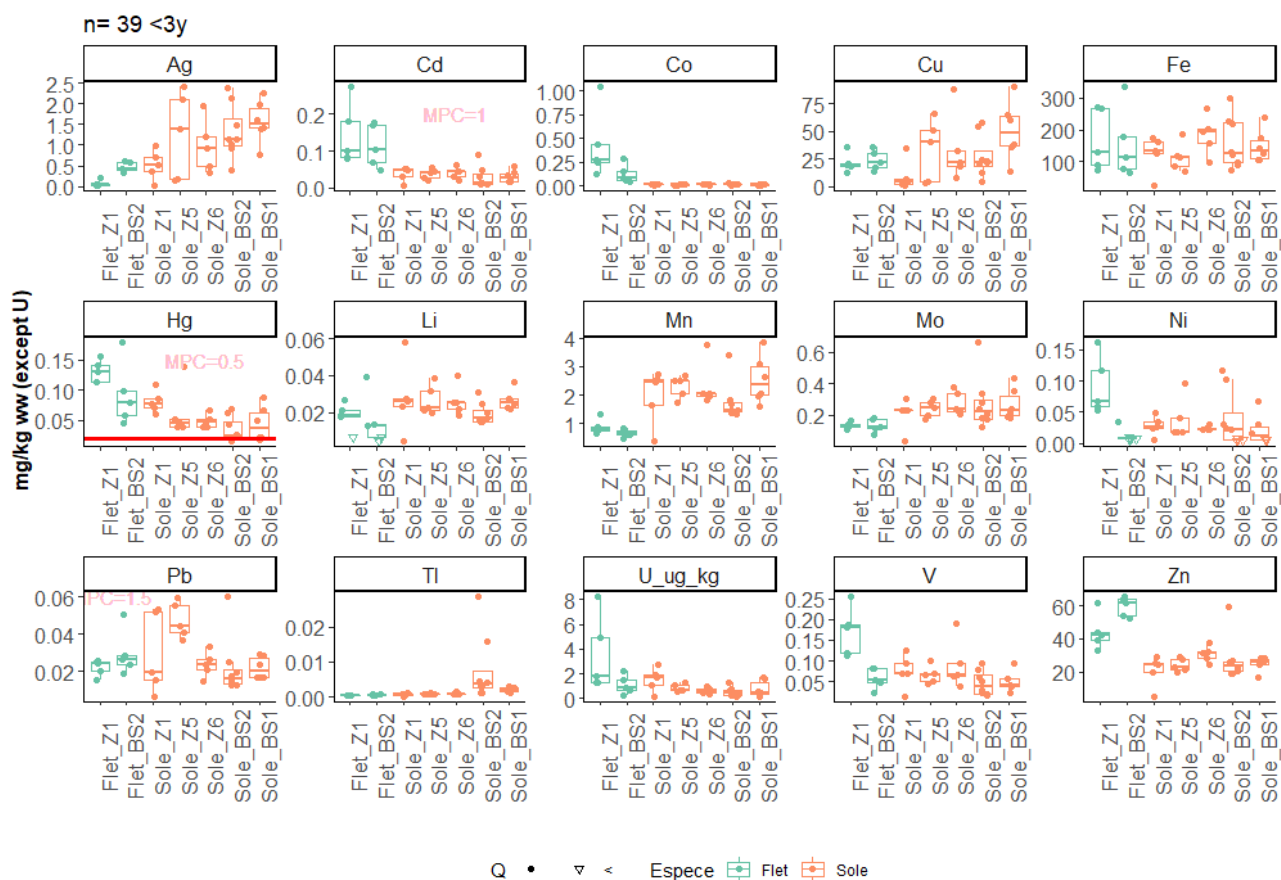


Figure 17 – Concentrations en ETM mesurées dans le muscle (Hg) ou le foie (autres éléments) de flets et soles prélevés en baies de Seine et Somme lors de la campagne SELIMANCHE 2021, en fonction de la station pour les individus de 1 et 2 ans. Ligne rouge : seuil santé environnementale (NQEsec. pois. pour le Hg) ; Valeur roses : seuil santé humaine (MPC Cd et Pb , indiquées sur le top droit pour ne pas écraser la figure).

Tableau 18 – Effet de l'espèce, la station et leur interaction sur les concentrations en éléments traces métalliques pour les individus de 1 et 2 ans (n = 39).

Variable dépendante	Test de variance		Test post hoc Groupes différents (p < 0,05) ⁴	Approche ¹
	Variables indépendantes (=testées dans le modèle) ²	Variables ayant un effet significatif (p < 0,05) ³		
Ag (log ww)	Espèce*Station	Espèce : p < 0,0001 Station : p < 0,0001	Sole > Flet BS1 BS2 Z5 Z6 Z1 "a" "a" "ab" "ab" "b"	AOV + Tukey Shap p = 0,03 ⁶
Cd (log ww)	Espèce*Station	Espèce : p < 0,0001	Flet > Sole	AOV + Tukey
Co (log ww) ⁵	Espèce*Station	Espèce : p < 0,0001 Espèce_Station : p = 0,02	Flet > Sole Flet_Z1 Flet_BS2 Sole_Z6 Sole_Z5 Sole_BS2 Sole_BS1 Sole_Z1 "a" "a" "b" "b" "b" "b" "b"	AOV + Tukey
Cu (log ww)	Espèce*Station	Station : p = 0,02	BS1 Z6 BS2 Z5 Z1 "a" "ab" "ab" "ab" "b"	AOV + Tukey
Fe (log ww)	Espèce*Station	P > 0,05	NA	AOV + Tukey
Hg (log ww)	Espèce*Station	Espèce : p = 0,0005 Station : p = 0,01	Flet > Sole ns ⁷	AOV + Tukey Lev p=0,041
Li (log ww)	Espèce*Station	P > 0,05	NA	AOV + Tukey Shap p = 0,005 ⁶
Mn (log ww)	Espèce*Station	Espèce : p < 0,0001	Sole > Flet	AOV + Tukey Shap p = 0,001 ⁶
Mo (log ww)	Espèce*Station	Espèce : p = 0,03	Sole > Flet	AOV + Tukey Shap p = 0,02 ⁶
Ni (log ww)	Espèce*Station	Espèce_Station : p = 0,02	Flet_Z1 Sole_Z5 Sole_Z6 Sole_Z1 Sole_BS2 Sole_BS1 Flet_BS2 "a" "ab" "ab" "ab" "ab" "ab" "b"	AOV + Tukey
Pb (log ww)	Espèce*Station	Station : p = 0,02	Z5 BS1 Z1 BS2 "a" "ab" "ab" "b"	AOV + Tukey
Tl (log ww) ⁵	Espèce*Station	Espèce : p = 0,0001 Station : p = 0,001 Espèce_Station : p = 0,005	Sole > Flet BS2 BS1 Z6 Z5 Z1 "a" "a" "ab" "b" "b" Sole_BS2 Sole_BS1 Sole_Z6 Sole_Z5 Sole_Z1 Flet_BS2 Flet_Z1 "a" "ab" "bc" "bc" "bc" "c"	AOV + Tukey Shap p = 0,002 ⁶
U (log ww)	Espèce*Station	Espèce : p = 0,02	Flet > Sole	AOV + Tukey
V (log ww) ⁵	Espèce*Station	Espèce : p = 0,02 ⁷ Station : p = 0,02 ⁷	NA NA	AOV + Tukey
Zn (log ww)	Espèce*Station	Espèce : p < 0,0001	Flet > Sole	AOV + Tukey Shap p = 0,002 ⁶

^{1, 2, 3, 4} voir description de l'approche dans la légende du **Tableau 5**

⁵ Co, Tl et V : 1 outlier Co (Z1F10), 2 outliers Tl (BS2S4 et BS2S10) et 1 outlier V (BS1S7) retirés pour l'ANOVA (**Figure 14**) pour ne pas déséquilibrer l'analyse et rester dans les conditions d'application des tests. 1) Pour Co : les effets observés diffèrent pour Flet_BS2 qui devient similaire à Flet_Z1 (sans outlier : « a », « a », avec l'outlier « a », « b ») 2) Pour Tl : les effets observés sont les mêmes avec ou sans outlier, 3) Pour V, avec l'outlier l'ANOVA est non significative (p < 0,05) et sans l'outlier, les effets « Espèce » et « Station » deviennent significatifs avec 0,01 < p < 0,05 indiqué dans le tableau.

⁶ Les effets significatifs observés avec test shapiro p < 0,05 sont similaires aux groupes observés avec les tests non paramétriques, avec quelques différences sans impact sur les conclusions discutées

⁷ Dans certains cas (effet station pour Hg et U), les ANOVA donnent l'effet station avec un p-value significatifs (proche de 0,05) mais les tests post hoc de Tukey ne trouvent pas de différences entre stations (non significatifs : ns).

Variabilité des concentrations en fonction de l'âge

L'effet potentiel de l'âge sur les concentrations en ETM mesurées a pu être évalué chez les soles de Somme seulement (stations BS1 et BS2, avec des âges variant entre 1 et 13 ans, N= 25 sur les 50 poissons analysés au total). Pour 4 des 15 éléments finalement retenus (i.e. Fe, Li, Tl et Zn), les relations entre concentrations

mesurées et âges des soles sont non-significatives ($p > 0,05$; **Figure 16**). Cependant, une relation significative et positive est observée entre les concentrations et l'âge pour tous les autres ETM à commencer par le Hg mesuré dans le muscle (Pearson $R = 0,66$, $p = 0,0003$) mais aussi Ag, Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, U et V mesurés dans le foie (tous $p < 0,05$; **Figure 16**). Ces relations confirment ainsi la nécessité de limiter la gamme d'âges considérée lors de comparaisons ultérieures. Néanmoins, les concentrations en ETM sont similaires chez les soles de 1 et 2 ans ($p > 0,05$ pour tous les éléments aux stations où cela a pu être testé, i.e. BS1 et BS2). La gamme d'âge des flets analysés ne permettait pas de tester l'effet de l'âge sur les concentrations en ETM. Dans l'attente de plus de données pour le tester plus spécifiquement, nous avons considéré que l'effet de l'âge observé chez la sole pouvait dans une certaine mesure être étendu au flet. Ainsi la variabilité spatiale et interspécifique des concentrations en ETM (15 éléments sélectionnés) dans la suite du rapport est effectuée sur les individus de 1 et 2 ans.

Différences entre espèces et stations de SELIMANCHE 2021

Les différences de concentrations entre espèces et entre stations ont été testées en ne considérant que les individus âgés de 1 et 2 ans ($N = 39$ sur les 50 poissons analysés au total, **Figure 17**, **Tableau 18**).

En termes de différences entre espèces, le flet présente des concentrations significativement plus élevées que la sole pour Hg dans le muscle, Cd, Co, U et Zn dans le foie et, inversement, des concentrations significativement plus faibles que la sole pour Ag, Mn et Mo et Tl pour toutes les stations analysées (*i.e.* indépendamment de l'effet « station »). Les concentrations en Cu, Fe, Li, Pb et V semblent similaires chez le flet et la sole (**Tableau 18**).

En termes de différences entre stations, les concentrations sont plus élevées chez les poissons de Somme que de Seine pour Ag, Cu et Tl pour le flet et la sole (*i.e.* indépendamment de l'effet « espèce »). Pour Hg, V et Pb, les concentrations sont à l'inverse plus élevées chez les poissons de Seine que de Somme, ce qui est surtout observé chez le flet pour Hg et V, alors que cela concerne la sole pour le Pb. Enfin, quelle que soit l'espèce, les concentrations en Cd, Co, Fe, Li, Mn, Mo, U et Zn dans le muscle des poissons semblent similaires sur les différentes stations analysées en baies de Seine et Somme (*i.e.* aucun effet station, **Tableau 18**).

Pour le Ni, l'effet de l'espèce dépend de la station (interaction espèce_station significative) avec les concentrations en Ni qui sont les plus élevées chez les flets de Z1 et les plus faibles chez les flets de BS2 avec les soles de Seine et Somme qui présentent des concentrations intermédiaires. Autrement dit, les flets de Somme sont plus contaminés en Ni que les flets de Seine ; cette différence Seine/Somme n'est pas retrouvée chez les soles. Pour Co et Tl, un effet de l'interaction espèce_station est détecté mais les différences observées reviennent aux effets principaux : une différence entre espèce (Flet > Sole pour Co, Sole > Flet pour Tl) et un effet station Somme>Seine pour Tl qui est discuté ci-dessus ; ces interactions ne sont donc pas discutées dans ce rapport en dehors des effets principaux ci-dessus.

Certaines de ces différences entre espèces avaient déjà été observées en 2018 en Baie de Seine (Z1 ; *e.g.* sole > flet pour Ag ; flet > sole pour Cd, Hg et Zn).

Ainsi, comme observé sur SELISEINE 2018, peu de différences entre stations sont observées, et aucune des deux espèces ne présente des concentrations systématiquement plus élevées ou plus faibles par rapport à l'autre pour l'ensemble des ETM ciblés. Aussi, les différences interspécifiques significatives observées pour certains éléments sont relativement constantes, suggérant un effet espèce plus important que l'effet station, en tout cas à l'échelle spatiale considérée, et des mécanismes de régulation des différents ETM propres aux différentes espèces (*i.e.* mise en place de ces mécanismes à l'échelle de l'espèce ; (Phillips and Rainbow, 1989)).

En termes de comparaison avec les seuils européens existants pour les poissons, les concentrations en Hg, Cd et Pb mesurées chez les soles et les flets sont toutes inférieures aux seuils sanitaires respectifs à ces 3

éléments mesurés dans le muscle (Hg) ou le foie (Cd et Pb, **Figure 17**; valeurs des seuils reportées dans le **Tableau 2**). Par contre, la NQE Hg (0,020 mg/kg pf) est dépassée pour tous les flets (N = 10) analysés pour ce métal dans le muscle, et pour 37 individus de soles sur les 40 analysés (**Figure 17**).

Différences entre années et entre estuaires, au regard des résultats obtenus sur les précédentes SELI

Des comparaisons peuvent désormais être réalisées sur les résultats obtenus pour les ETM sur les différentes campagnes SELI :

- Comparaison des résultats obtenus chez la sole (**Figure 18**) entre les campagnes SELILOIRE 2017 et 2020 en baies de Loire et de Vilaine, et SELISEINE/SELIMANCHE en baie de Seine (2018 et 2021) et/ou baie de Somme (2021).
- Comparaison des résultats obtenus chez le flet (**Figure 19**) entre les campagnes SELISEINE en baie de Seine (2018 et 2021) et/ou baie de Somme (2021).

Pour une espèce donnée, ces comparaisons ont évidemment pu être réalisées pour les ETM communs à toutes les campagnes uniquement (soient 5 éléments pour les soles, et 11 éléments pour les flets ; **Figure 18**). Aussi, seuls les individus de classes d'âges et/ou de tailles similaires aux 3 campagnes ont été considérés pour cette comparaison (*i.e.* âges 1 à 3 ans maximum, et/ou tailles totales inférieures à 35 cm quand l'âge n'était pas disponible, cas de SELILOIRE 2017).

Soles. D'une manière générale, les soles collectées en baies de Seine et/ou Somme en 2018 et 2021 ont des concentrations en Hg dans le muscle significativement plus élevées que celles prélevées en embouchures de la Loire et de la Vilaine 2017 et 2020, surtout celles de Seine en 2021 (**Figure 18**). A l'inverse, les soles collectées en embouchure de la Vilaine, en particulier, en 2017 et 2020, présentent toujours les concentrations en Hg dans le muscle les plus faibles par rapport à toutes les autres zones et années (**Figure 18**). Pour le Pb dans le foie, ce sont les soles collectées en embouchure de la Loire qui présentent systématiquement les concentrations les plus élevées, notamment celles collectées en 2017 (**Figure 18**). Les poissons de Loire sont en effet encore régulièrement documentés pour présenter des concentrations en Pb plus importantes que ceux issus d'autres estuaires (e.g. Schnitzler *et al.*, 2011, Kerambrun *et al.*, 2013, Lebigre *et al.*, 2022). Ceci est probablement lié à la contamination historique de la Loire par le Pb, due à la localisation d'une usine produisant des additifs au Pb pour les essences automobiles dans cet estuaire fermée au début des années 2000 suite à l'interdiction de ces additifs (Claisse, 1989, Couture *et al.*, 2010), bien que les tendances à long terme indiquent une décroissance des concentrations mesurées dans les organismes ligériens (Briant *et al.*, 2024). Pour Cd et Cu, seules les soles de Loire de 2017 présentent des concentrations moyennes dans leurs foies significativement plus élevées par rapport à toutes les autres zones et années. Enfin pour Zn, les concentrations mesurées dans les foies de soles apparaissent relativement similaires, toutes zones et années confondues (**Figure 18**).

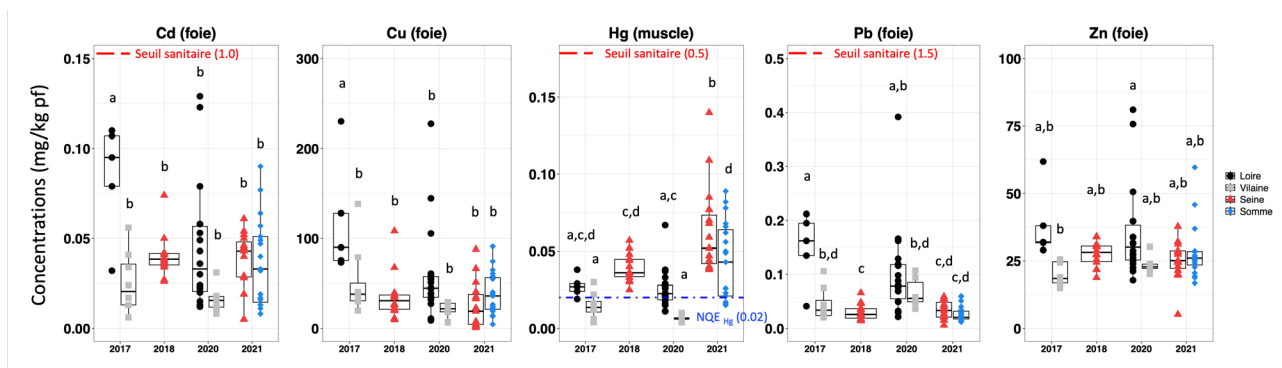


Figure 18 – Concentrations en ETM (mg/kg poids frais) mesurées dans le muscle (Hg) ou le foie (autres éléments) des soles issues de différentes campagnes i) SELILOIRE 2017 (n=5 pools d'individus pour les stations L1 et L2 en embouchure

de la Loire, n=8 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), 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), et iv) SELIMANCHE 2021 en baies de Seine et Somme (n=15 individus pour les stations Z1, Z5 et Z6 en embouchure de la Seine, n=19 individus pour les stations BS1 et BS2 en embouchure de la Somme). Seuls les ETM et âges ou tailles (1 à 3 ans, et/ou inférieures à 35 cm) en commun entre les quatre campagnes ont été pris en compte. Les seuils sanitaires existant pour Cd, Hg et Pb sont indiqués en rouge, et le seuil environnemental (NQE) pour le Hg en bleu. Les éléments sont présentés de gauche à droite par ordre alphabétique. Des lettres similaires indiquent que les groupes ne sont pas significativement différents entre eux (i.e. $p < 0,05$) selon les tests post-hoc de comparaison deux à deux avec correction de Holm, suivant le test non-paramétrique comparaison multiple de Kruskal-Wallis.

Flets. Les flets collectés en embouchure de la Seine en 2021 ont tendance à montrer des concentrations significativement plus élevées en plusieurs ETM par rapport à ceux collectés en 2018, et par rapport à ceux collectés en baie de Somme (Figure 19), notamment pour Co et V, et dans une moindre mesure Cd, Fe, et Hg (i.e. différence avec les flets de 2018 uniquement). En 2021, les flets de Seine n'avaient été collectés qu'en station Z1 la plus proche de l'embouchure, alors qu'en 2018 les individus avaient été collectés sur la station Z5 également, plus éloignée, ce qui pourrait en partie expliquer ces différences. Les flets collectés en embouchure de la Somme montrent quant à eux des concentrations significativement plus élevées en Zn uniquement et plus faible en Mn, par rapport à ceux collectés en Seine en 2018 et 2021 (Figure 19). Ce schéma n'ayant pas été retrouvé chez les soles pour le Zn, il est peu probable que cela soit lié à une contamination particulière de la Somme par rapport à la Seine.

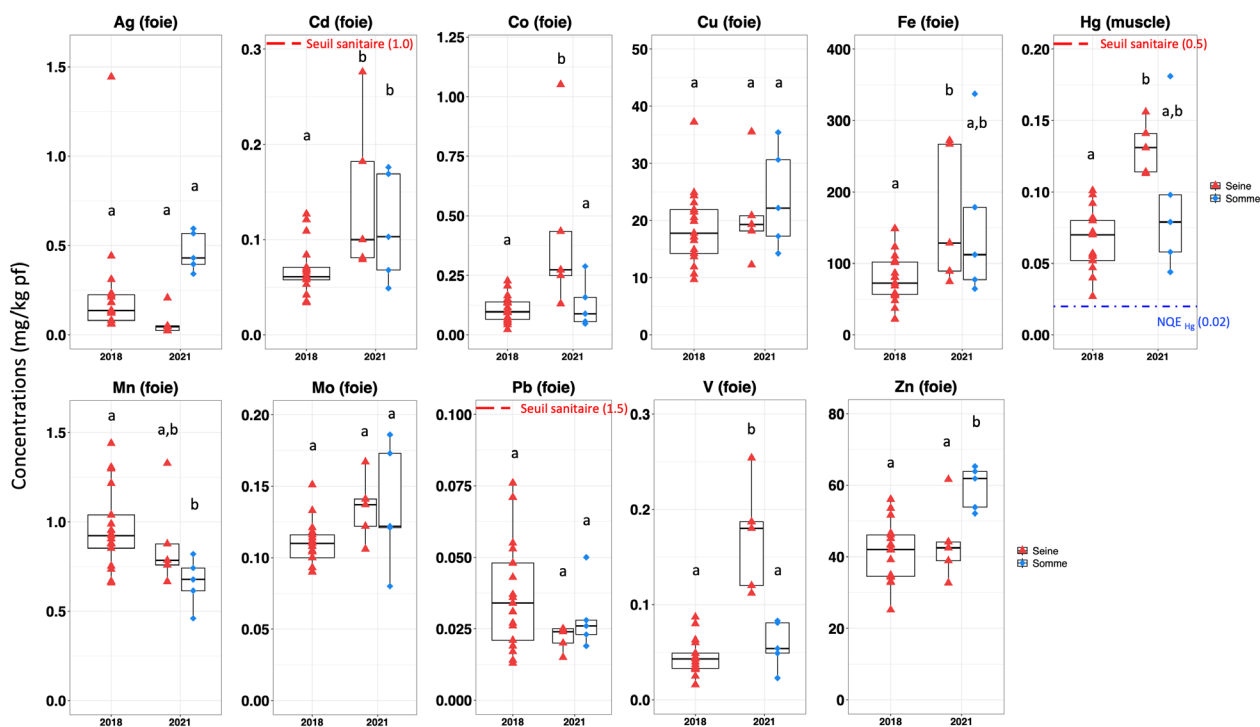


Figure 19 – Concentrations en ETM (mg/kg poids frais) mesurées dans le muscle (Hg) ou le foie (autres éléments) des flets issues de différentes campagnes i) SELISEINE 2018 (stations Z1 et Z5 en embouchure de Seine, n=16 individus), et ii) SELIMANCHE 2021 en baies de Seine et Somme (n=5 individus pour la station Z1 en embouchure de la Seine, n=5 individus pour la station BS2 en embouchure de la Somme). Seuls les ETM et âges (1-2 ans dans tous les cas) en commun entre les deux campagnes ont été pris en compte. Les seuils sanitaires existant pour Cd, Hg et Pb sont indiqués en rouge, et le seuil environnemental (NQE) pour le Hg en bleu. Les éléments sont présentés de gauche à droite par ordre alphabétique. Des lettres similaires indiquent que les groupes ne sont pas significativement différents entre eux (i.e. $p < 0,05$) selon les tests post-hoc de comparaison deux à deux avec correction de Holm, suivant le test non-paramétrique comparaison multiple de Kruskal-Wallis.

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 SELIMANCHE 2021, seuls 22 individus n'ont pas de donnée manquante pour l'ensemble des biomarqueurs, contaminants organiques et éléments traces métalliques (N = 22 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 variables individuelles sont préférées aux sommes qui peuvent masquer des variabilités des composés individuels et posent le souci de l'intégration de données censurées (<LOQ) dans la somme. Les données de concentrations sont log-transformées puis les données sont 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 à dire d'expert comme fausses ou douteuses sont retirées de l'analyse.

3.4.1.1 Analyse en Composante Principale (ACP)

Dans un premier temps, 3 ACP ont été réalisées, selon le type de variable (biomarqueurs « bio », contaminants organiques « orga » et éléments traces « ETM »). L'objectif est d'observer la répartition des données et les liens entre variables.

1- Jeu de données « Bio » : N = 136 individus de 0 à 3 ans (37 flets (10 F et 27 M) et 99 soles (72 F et 27 M)).

Le jeu de données comprend les soles et flets de 3 ans et moins. De plus, d'après la relation taille âge des soles et flets de la zone Seine et Somme (**Figure 4**), les individus de moins de 25 cm sont très probablement âgés de moins de 3 ans, nous avons donc conservés pour l'ACP les individus de <25 cm parmi les individus non agés. Douze biomarqueurs sont représentés : 2 métabolites de HAP (OH-pyrène, OH9BaP), 2 biomarqueurs de génotoxicité (cassure de brins d'ADN (Comet), fréquence de micronoyaux (MN)), 1 biomarqueur de neurotoxicité (AChE), 5 marqueurs d'intégrité des lysosomes (LMS, Vv, S/V, Nv, Vv(NL)) et 2 indices histologiques (Lang Index pour les gonades et le foie). Les données manquantes sont remplacées par la médiane, *i.e.* sur les 136 individus :

AChE : 13, COMET_Tail : 8, GON_Lang.Index : 3, LIV_Indiv.Index : 4, LMS : 20, MN.1000.C : 0, S.V, Vv et Nv : 15, Vv.NL : 12, OH9BaP et OHPyr : 15,

Une ACP avec flet et sole ensemble ($n = 136$) est largement marquée par un effet station ($r^2 = 0,44$, $p = 0,001$) et espèce ($r^2 = 0,36$, $p = 0,001$), et de manière moins forte par un effet de l'âge et du sexe ($r^2 = 0,19$ et $0,10$, respectivement). Pour la section « ACP », ces coefficients de corrélation et p-value correspondent à l'analyse d'ajustement des 4 variables (station, espèce, âge et sexe) sur l'ACP. Ces coefficients rendent compte du bon ajustement du modèle et expriment la part de l'ACP explicable par ces 4 facteurs. Deux ACP (une par espèce) ont donc été effectuées pour délier l'effet station de l'effet de l'espèce (**Figure 20**).

Pour les flets, il y a une claire distinction entre Seine (Z1) et Somme (BS2, $r^2 = 0,38$, $p = 0,001$) sur la distribution des biomarqueurs. Les réponses chez les individus de Seine sont plus altérées pour les concentrations en métabolites de HAP, l'inhibition de l'activité de l'AChE et la stabilité de la membrane lysosomale (LMS, ces 2 derniers biomarqueurs répondent au stress par une inhibition ou une diminution du

temps de labilisation) ; les individus de Somme montrent des réponses plus altérées qu'en Seine pour les cassures de brins d'ADN et les indices histologiques.

Pour les soles, il y a aussi une claire distinction entre Seine (Z1, Z5, Z6) et Somme (BS2, BS1, $r^2 = 0,44$ pour effet « station » et $0,33$ pour effet « Zone », $p = 0,001$) avec des réponses chez les individus de Seine plus altérées pour les concentrations en métabolites de HAP, les cassures de brins d'ADN, et les indices histologiques alors que les individus de Somme montrent des réponses plus altérées qu'en Seine pour l'inhibition de l'activité de l'ACHé (neurotoxicité). La fréquence de micronoyaux n'est pas bien représentée sur les axes 1 et 2 de l'ACP (abscisses $\leq 0,2$) et l'ACHé est peu représentée sur l'axe 1 de l'ACP sole (abscisse = $0,15$, Tableau 24).

2- Jeu de données « Orga » : N = 30 individus de 1 et 2 ans, 10 flets (10 mâles, 4 et 6 de 1 et 2 ans, resp.) et 20 soles (9 F (2 et 7 de 1 et 2 ans, resp.) et 11 mâles (1 et 10 de 1 et 2 ans, resp.)). Les concentrations sont représentées en poids lipidiques pour les PCB, OCP et PBDE, et en poids humide pour les PFAS (pas de donnée manquante). Pour une meilleure lisibilité des ACP, 15 contaminants organiques sont sélectionnés pour la suite des analyses.

- Parmi les PCB, tous les congénères sont corrélés entre eux (**Figure 31**), **3** PCB sont sélectionnés : le CB-153 (6 atomes de chlore, non coplanaire) a été sélectionné comme représentant majoritaire des PCB non dioxine-like les plus chlorés, le CB-28 pour représenter les PCB moins chlorés (3 atomes de chlore, non coplanaire) et le CB-118 (5 atomes de chlore, planaire) a été pris comme représentant majoritaire des PCB de type dioxine.
- Parmi les OCP, **3** substances sont retenues : la dieldrine et le *p,p'*-DDE sont utilisés (quantifiés dans 100% des échantillons) et le gamma-HCH est utilisé comme représentant HCH le plus quantifié (70%) des HCH.
- Parmi les PBDE, tous les congénères sont corrélés entre eux (**Figure 31**), les **3** congénères les plus quantifiés (> LOQ) sont conservés, *i.e.* le penta-BDE : BDE-100 (100%), hexa-BDE : BDE-154 (100%) et le tetra-BDE : BDE-49 (87%).
- Les congénères de HBCDD sont quantifiés dans moins de 50% des échantillons et donc non retenu pour l'ACP. Par exemple le α -HBCDD qui est le congénère le plus quantifié, est supérieur à la LOQ dans 13/30 échantillons.
- Parmi les PFAS retenus sont ceux quantifiés dans 100% des échantillons et le PFOA (>LOQ dans 29/30), et parmi les **6** moins corrélés entre eux : PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA (**Figure 31**).

Sur l'ACP avec flet et sole ensemble ($n = 30$), l'effet station est plus important que l'effet espèce sur cet ACP (Espèce : $r^2 = 0,14$, $p = 0,01$, Station : $r^2 = 0,55$, $p = 0,001$). Pour les contaminants organiques, nous détaillerons donc plus l'ACP avec les 2 espèces ensemble : l'axe 1 représente 55% de la variabilité en concentrations des 15 contaminants organiques représentés. Cet axe est fortement corrélé aux concentrations en PCB, OCP et PBDE et anti-corrélés au PFNA avec dans l'ordre : flets de Seine > soles de Seine (Z1 et Z5 semblent similaires) > flets et soles de Somme. Les PFAS sont mieux corrélés à l'axe 2 que l'axe1. L'axe 2 représente 26% des données permet de distribuer les individus selon leur concentration en PFAS mais un gradient entre station n'est pas détecté, le sexe, l'âge et l'espèce ne permette pas non plus d'identifier une explication de la variabilité des PFAS sur l'axe 2 **Figure 20**).

3- Jeu de données « ETM » : N = 44 individus de 1 à 3 ans, principalement des mâles (10 Flets (M) et 34 soles (19 F et 15 M)). Les concentrations en 14 ETM sont représentées en poids sec : Ag, Cd, Co, Cu, Fe, Li, Mn, Ni, Pb, Tl, U, V et Zn dans le foie, et Hg dans le muscle (aucune valeur manquante).

Une ACP avec flet et sole ensemble (n = 44, < 4 ans) est largement marquée par un effet espèce ($r^2 = 0,46$, $p < 0,001$) puis station ($r^2 = 0,29$, $p = 0,002$), et de manière moins forte par un effet de l'âge et du sexe, $r^2 = 0,14$ ($p=0,008$) et $0,14$ ($p=0,004$), respectivement. Deux ACP (une par espèce) ont été donc effectuées pour délier l'effet station de l'effet de l'espèce (**Figure 20**).

Pour les flets, l'axe 1 explique 52% de la variabilité des données. Onze des 14 ETM sont positivement corrélés avec des abscisses $> 0,5$ indiquant qu'ils sont bien représentés par cet axe : Li, Ni, V, Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo, Ag, Cd, Tl, Pb, U, Hg (**Tableau 26**). Les flets se distribuent en Seine et Somme sur l'axe 2, avec notamment des concentrations en Cu, Zn, Ag et Pb plus élevée en Somme et des concentrations en Ni plus élevées en Seine (**Tableau 26**). L'effet « Station » pour les flets est moins significatif que l'effet « Station » sur les biomarqueurs ($r^2 = 0,46$, $p = 0,009$). De la même manière pour les soles, 11 des 14 ETM sont bien représentés sur l'axe 1 (abscisses $< -0,5$, **Tableau 26**) qui explique 41% de la variabilité en ETM. Par contre, l'effet Zone se retrouve sur l'axe 2 avec notamment des concentrations en Cu, Mo, Ag et Tl plus élevées en Somme et des concentrations en Pb plus élevées en Seine.

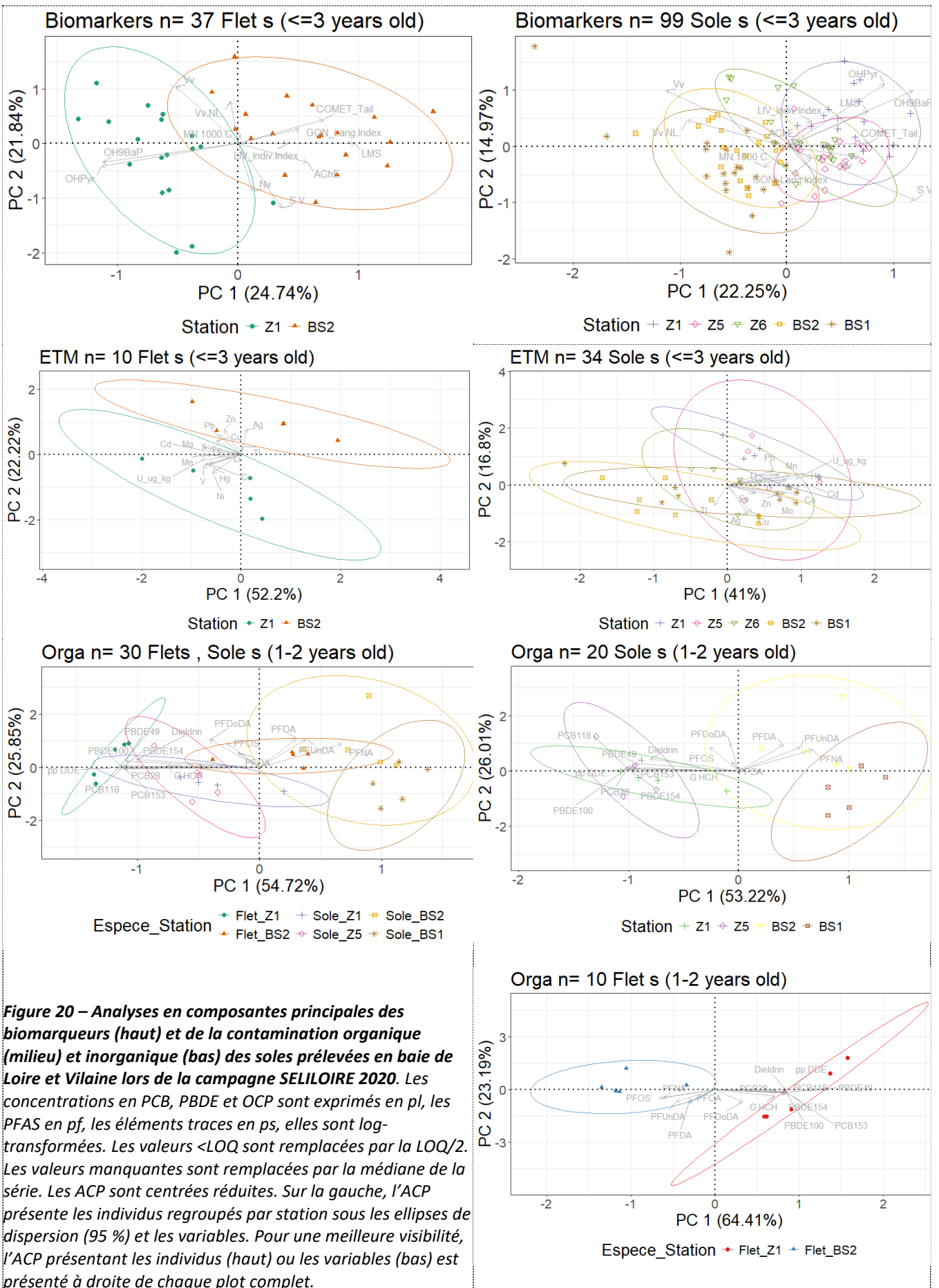


Figure 20 – Analyses en composantes principales des biomarqueurs (haut) et de la contamination organique (milieu) et inorganique (bas) des soles prélevées en baie de Loire et Vilaine lors de la campagne SELILOIRE 2020. Les concentrations en PCB, PBDE et OCP sont exprimés en pl, les PFAS en pf, les éléments traces en ps, elles sont log-transformées. Les valeurs <LOQ sont remplacées par la LOQ/2. 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 « biomarqueurs » et « contaminants » doivent être composées des mêmes individus et pour éviter trop de données manquantes, elles se basent sur les 30 individus pour lesquels les données de contaminants organiques étaient disponibles et par conséquent, les données de contaminants inorganiques et de biomarqueurs sauf problème analytique pour lesquels les valeurs manquantes sont remplacées par la médiane (*i.e.* 1 AChE, 1 Comet, 1 LIV_Index.Index, 5 LMS, 3 Nv, 3 S.V, 3 Vv, 2 Vv.NL.).

L'analyse se fait en 2 étapes : 1) sélection des variables à inclure au modèle. 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 faut aussi que le nombre de variables soit inférieur au nombre d'individus ; 2) analyse du modèle sélectionné.

1. Sélection de variables. Pour évaluer la multicollinéarité entre les variables du modèle, le facteur d'inflation de la variance (variance inflation factor (VIF)) est utilisé. Il n'y a pas de consensus sur la valeur du VIF au-delà de laquelle on doit considérer qu'il y a multicollinéarité, mais 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. Trois modèles sont discutés ici :

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

- Biomarqueurs = variables à expliquer : **AChE** (activité enzymatique de l'acétylcholine estérase), **LMS** (stabilité de la membrane lysosomale), **S.V.** (ratio surface/volume des lysosomes), **Nv** (densité numérique lysosomale), les indices histologiques (**GON_Lang.Index** et **LIV_Indiv.Index**), et les concentrations en métabolites de HAP (**OH9BaP**, **OHYPyr**). L'occurrence de micronoyaux n'est pas retenue pour la RDA partielle car les 30 individus représentés ne présentent pas de micronoyaux. Les variables Vv et Nv(NL) ne sont pas retenues car leur distribution est loin de la normalité et elles sont corrélées à S.V (Pearson $r = -0,87, -0,52$, respectivement, **Figure 31**).

- Contaminants = variables explicatives :

* Les 15 métaux : **Ag + Cd + Co + Cu + Fe + Hg + Li + Mn + Mo + Ni + Pb + Tl + U + V + Zn**.

* Les contaminants hydrophobes sont corrélés entre eux (**Figure 20, Figure 31**). Neuf représentants, un par famille de substances ou groupe de substances corrélés est utilisé : **PCB153 + pp.DDE + Dieldrin + PBDE100 + PFOS + PFOA + PFDA + PFNA + PFDoDA**.

- Caractéristiques biologiques des individus = covariables : **Taille, RGS et Fulton**. 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.

Pour ce modèle, 26 des 27 variables explicatives ou covariables sont > 10 indiquant une forte multicollinéarité entre les données. Ce modèle n'explique pas la variabilité de la réponse des biomarqueurs par les contaminants chimiques ($p = 0,79$).

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). Une sélection progressive (« Both » : Forward selection et Backward selection) des variables est faite entre un modèle non contraint (sans variable explicative) et un modèle avec les 24 contaminants et 3 covariables du modèle 1, jusqu'à ce que l'AIC ne diminue plus. Cette méthode donne un modèle expliqué par **Mn + Cu + PFDODA + U + Zn + Fe** (sans covariable). Les VIF des 6 variables sont <3 dans le modèle 2, indiquant que les variables explicatives ne sont pas colinéaires et apportent chacune une information indépendante. Ce modèle 2 explique significativement 29% (r^2 ajusté) de la variabilité de la réponse des biomarqueurs ($p = 0,001$). Un effet « espèce » est détecté sur ce modèle ($p = 0,04$ *) mais pas d'effet « Station » ($p = 0,60$) (**Figure 21**).

Modèle 3. Les variables explicatives peuvent aussi être les ordonnées des individus sur les ACP correspondantes : ACP avec les contaminants (hydrophobes + PFAS : CB-28, CB-118, CB-153, pp' -DDE, Dieldrin, BDE-49, BDE-100, BDE-154, le ratio BDE-99/BDE-100, PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, PUnDA, PFDODA), ACP avec les métaux non essentiels (Ag, Cd, Hg, Pb, U), ACP métaux essentiels (Co, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Tl, V, Zn). **Les coordonnées des individus sur 2 premiers axes de chacune de ces 3 ACP (i.e. 6 axes)** sont utilisées comme variables explicatives des réponses des biomarqueurs. Dans ce modèle 3, les 6 variables (6 axes) ont un VIF <10. Ce modèle 3 explique 9% (r^2 ajusté) de la variabilité de la réponse des biomarqueurs ($p = 0,16$).

2. Résultats/Discussion. Les analyses type RDA sont des analyses statistiques qui permettent d'étudier les relations entre variables utiles pour identifier des corrélations linéaires même si ces dernières n'informent pas sur les liens de causalité. La relation entre les réponses des biomarqueurs et les niveaux en contaminants suivis est significative sur le modèle sélectionné par l'AIC ($p < 0,05$, modèle 2). Ce modèle 2 suggère une relation entre certains métaux essentiels (Cu et Mn) et un PFAS (PFDODA) et la réponse des biomarqueurs, notamment les indices histologiques. Néanmoins, les modèles 1 (à dire d'expert) et 3 (expliqué par les axes des ACP de groupes de contaminants) ne montrent pas de relation significative entre la contamination des flets et soles de 1 et 2 ans dans la baie de Seine et Somme et la réponse des biomarqueurs recherchés. Le fait que la relation « biomarqueurs » et « contaminants » ne soit pas constante entre les 3 modèles testés suggère que ce lien n'est pas fort. Plusieurs hypothèses peuvent être suggérées pour expliquer que le lien observé ne soit pas observé de manière forte : *i*) La RDA recherche des relations linéaires entre variables, or les liens biomarqueurs-contaminants s'observent plus souvent par d'autres types de relations, e.g. relations sigmoïdales, et pas systématiquement de manière monotone *ii*) le nombre d'individus dans la RDA ($n = 30$) et la gamme de réponses sont peut-être trop limités pour mettre en avant un lien entre ces deux réponses (e.g. peut-être que des relations plus significatives pourraient être observées avec un gradient plus marqué) *iii*) la stratégie d'échantillonnage est définie pour limiter l'importance des facteurs confondants les plus connus et maîtrisables (age, saison, statut reproducteur...) et les facteurs confondants mesurables ont été pris en compte comme covariables dans les RDA ; il semble malgré tout qu'une part de la variabilité vienne de facteurs non tracés. Les biomarqueurs retenus dans la RDA sont principalement des biomarqueurs de santé générale. Aussi, 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. Notre analyse illustre la difficulté d'établir des relations statistiques sur des données de terrain, même si nous avons limité au maximum du possible les facteurs confondants (âge, indice de conditions).

All n= 30 Flets, Sole s (1-2 years old)

AIC selection: 6 contam, r2adj=0.30, r2=0.44, 6/6 VIF<10, p=0.001***

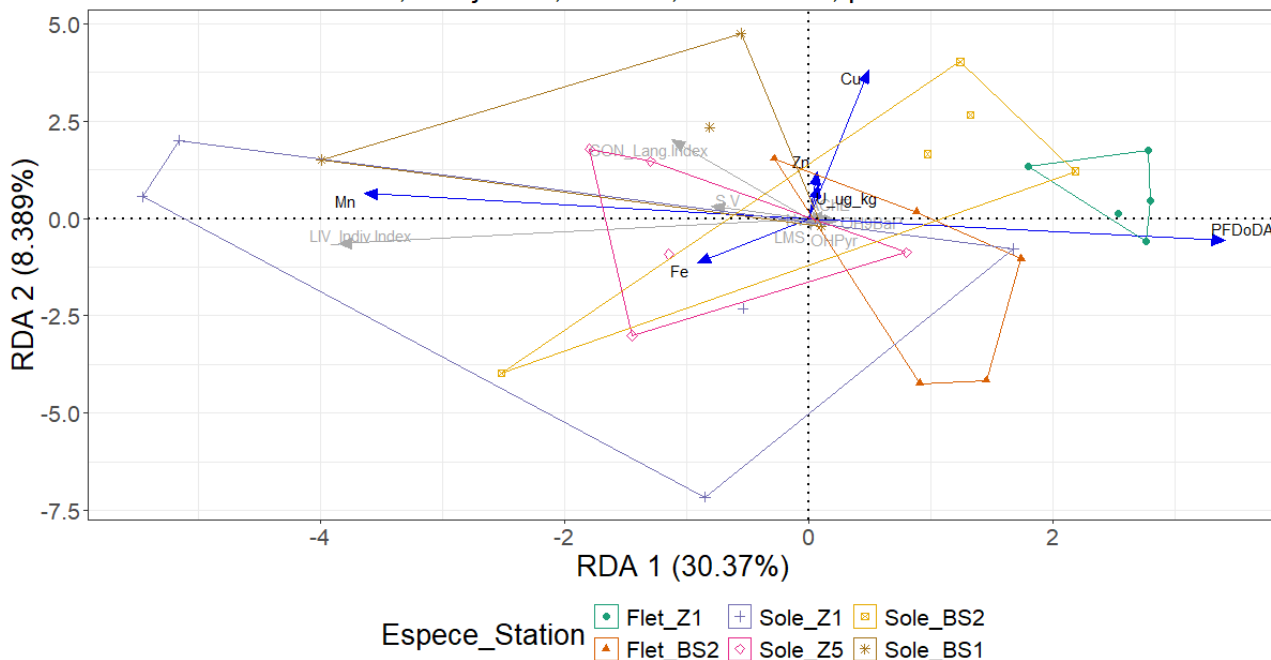


Figure 21 – Analyse de redondance (RDA) partielle représentant la modélisation de l’effet des concentrations en contaminants sur les réponses des biomarqueurs selon un modèle de sélection des variables par le critère d’AIC (modèle 2). Les individus sont des flets et soles de 1 et 2 ans prélevés en baies de Seine (Z1 et Z5) et Somme (BS1 et BS2) lors de la campagne SELIMANCHE 2021 (n = 30). Lors de la sélection des variables : les concentrations en PCB, PBDE et OCP sont exprimées en pl, les PFAS en pf, les éléments traces en ps. Les valeurs <LOQ sont remplacées par la LOQ/2. Les valeurs manquantes sont remplacées par la médiane de la variable. Les concentrations sont log-transformées. Les variables sont centrées-réduites. Le plot représente un cadrage de type 2 (scaling 2) : les angles entre variables sont proportionnels à leur corrélation.

3.4.2 Approche par indice cumulé : CHASE

Les résultats de la campagne SELIMANCHE 2021 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 ≥ 10 : « 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). Seuls les paramètres pour lesquels des seuils ont été développés peuvent être considérés dans cette approche.

Pour les biomarqueurs, Les valeurs de LMS sont particulièrement faibles comparées à l'EAC (indication d'une altération) et ont donc un poids important dans l'indice CHASE à toutes les stations et particulièrement pour les soles en Somme (**Tableau 1**). Les concentrations en métabolites de HAP (OH-pyrène et OH-phénanthrène) sont systématiquement inférieures à l'EAC (EAC disponibles sont développés sur des données obtenues sur la morue, **Tableau 1**). Les données de cassures de brins d'ADN et d'inhibition de l'ACHé ne sont pas incorporées à ce stade dans l'indice CHASE, il est nécessaire de comprendre l'évolution de leurs niveaux entre les différentes campagnes avant de les intégrer. De manière cumulée (CS), les 5 des 7 couples espece_station sont classées en zones « Zone sans problème » de bonne qualité selon l'approche CHASE sur les biomarqueurs. Pour les 2 cas restants, les soles en Somme sont en « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée (**Figure 22**).

Pour les contaminants, les 2 stations en Somme sont moins « déclassées » que celles de Seine pour chaque espèce séparément. La qualité de l'environnement au regard de la santé environnementale est classée de « Zone à problème » ayant une qualité modérée (Soles de Seine et Somme, et Flets de Somme) à une qualité faible (Flets en Z1), principalement lié au fait que les concentrations en CB-118 soient 1,1 à 8 fois supérieures à l'EAC et les concentrations en Hg soient 2 à 5 fois supérieures à la NQE.

La qualité de l'environnement au regard de la santé humaine est en « Zone sans problème » de bonne qualité (Soles en Somme et en Z5) à « Zone à problème » ayant une qualité faible (flets et soles en Z1) principalement lié au fait que les concentrations en somme de PBDE sont en moyenne 26 supérieures à la NQE.

Tableau 19 – Valeur des indices CS chez les poissons des différentes stations. Les « n » indiquent le nombre de paramètres pris en compte dans le calcul. Les couleurs des cellules sont liées à la classification CHASE : **vert** : CS = 0,5 < 1 : « Zone sans problème » de bonne qualité, **orange** : CS = 1 < 5 : « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée, **rouge** : CS = 5 < 10 : « Zone à problème » ayant une qualité environnementale faible.

Station	Espèce	CS Biomarqueurs N = 4 biomarqueurs	CS Santé environnementale N = 17 contaminants	CS Santé humaine N = 8 contaminants
Seine				
Z1	Flet	0,87	8,01	9,83
Z1	Sole	0,59	4,96	1,05
Z5	Sole	0,63	3,66	0,89
Z6	Sole	0,52	NA	NA
Somme				
BS1	Sole	1,23	1,12	0,52
BS2	Flet	0,56	1,96	1,92
BS2	Sole	1,02	1,41	0,72

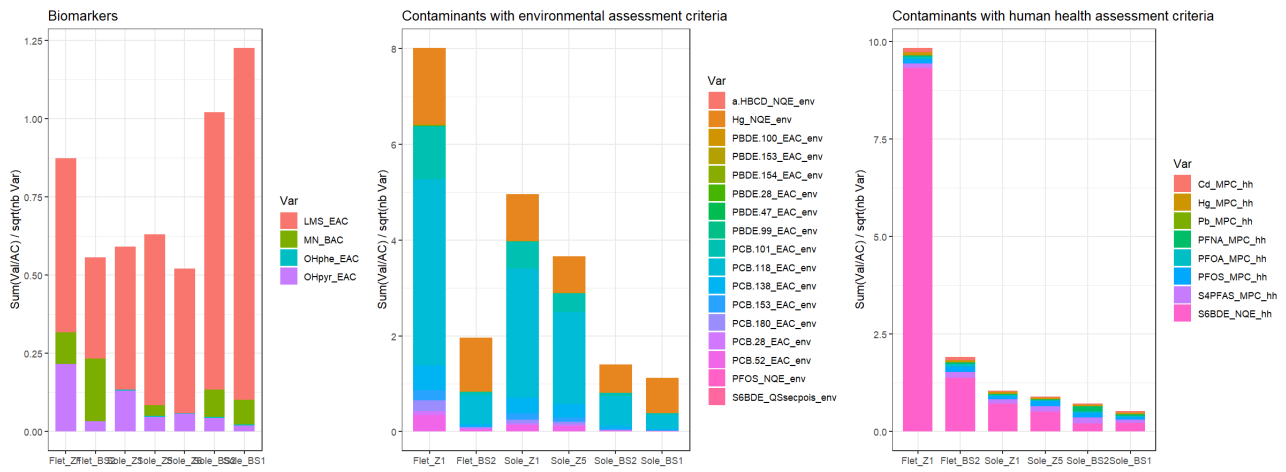


Figure 22 – Calcul de l'indice multiparamétrique CHASE pour les 7 couples Espece-station étudiés lors de la campagne SELIMANCHE 21. Les paramètres sont regroupés par type : réponses des biomarqueurs (gauche) et concentrations en contaminants comparées à des valeurs seuils liées à la santé environnementale (milieu) ou à la santé humaine (droite). Chaque biomarqueur (gauche) ou famille de contaminants (milieu et droite) est représenté par une couleur dans le diagramme empilé.

4 Résultats – Réponses des biomarqueurs et bioaccumulation des contaminants chez les moules en Baies de Seine et Somme

4.1 Biométrie

Les moules prélevées sur 8 stations ROCCH MV en baies de Somme et Seine (du nord au Sud et de l'est à l'ouest : Berck, Pte St Quentin, Varengeville, Antifer, Villerville, Ouistreham, Meuvaines, Baie des Veys (BDV)) mesuraient de 39 à 72 mm et pesaient de 5,3 à 28,6 g (poids humide avant ouverture de la moule). Les moules vers la baie de Somme (Berck et Pointe de Saint Quentin) et les moules de Ouistreham étaient parmi les plus grandes et plus grosses moules. Au contraire les moules de Varengeville et Villerville à l'embouchure de la Seine étaient parmi les plus petites et plus maigres (**Figure 23**).



Figure 23 – Taille et poids des moules *M. edulis* collectées aux 8 stations ROCCH pour l'analyse de biomarqueurs dans le cadre de la campagne SELIMANCHE en février 2022 (n = 120, n=15/station). Les lettres en haut des plots indiquent les groupes significativement différents selon une ANOVA suivi d'un test post hoc de Tukey (p < 0,05).

4.2 Biomarqueur d'état de santé général : biomarqueurs des lysosomes

Stabilité de la membrane lysosomale

La stabilité lysosomale a été analysée comme marqueur général de l'état de santé des organismes sur un total de 70 glandes digestives de moules provenant de 8 zones d'échantillonnage. La valeur moyenne de LP (Labilisation Period) était de $15,7 \pm 6,9$ min. La valeur moyenne de LP était significativement inférieure chez les femelles ($13,7 \pm 4,9$ min, n = 30) par rapport à celle chez les mâles ($17,0 \pm 7,9$ min, n = 38).

Les valeurs maximales de LP étaient enregistrées pour les sites Antifer ($22,5 \pm 4,1$ min) et Ouistreham ($25,4 \pm 7,9$ min, **Figure 24**). Pour ces sites, les valeurs moyennes du biomarqueur dépassaient la valeur de référence BAC (20 min), indicatrice de conditions environnementales sans historique de contamination. En comparaison, les valeurs moyennes les plus faibles ont été détectées pour les sites Berck en Somme ($9,9 \pm 2,8$ min) et Pointe de Saint Quentin entre la Seine et la Somme ($10,8 \pm 4,0$ min). Ces valeurs se trouvaient proche de la limite EAC (10 min) ce qui indique l'influence potentielle d'un facteur de stress d'origine environnementale ou anthropique pour ces sites.

Lors de la campagne SELISEINE 2018, la stabilité de la membrane lysosomale avait aussi été analysée chez la moule pour les sites Antifer, Meuvaines, Villerville, Ouistreham et Baie des Veys (**Tableau 20**). Les valeurs moyennes de LP ne différaient pas entre campagnes pour les sites Villerville et Baie des Veys. Les valeurs moyennes de LP pour les sites Antifer et Ouistreham étaient en-dessous de la limite BAC (20 min) en 2018 mais au-dessus en 2021, suggérant de meilleures conditions environnementales lors de la campagne en 2021 pour ces deux sites. Au contraire, les valeurs de LP à Meuvaines étaient significativement inférieures en 2021 par rapport aux valeurs mesurées en 2018. Cette diminution peut être indicatrice d'un stress récent et local.

Changements structuraux des lysosomes (test LSC : Lysosomal Structural Changes)

Les altérations structurelles de lysosomes ont pu être estimées pour les sites Berck ($n = 9$) et Pointe de Saint Quentin ($n = 9$). Aucune différence significative n'a été détectée entre ces deux sites (**Tableau 21**) ni entre mâles et femelles (Mann-Whitney, $p > 0,05$). Pour les autres sites ce biomarqueur n'a pu être mesuré dû à la présence de pigments accumulés dans les cellules digestives de ces individus ce qui interfèrent avec la mesure des paramètres structuraux des lysosomes (LSC test). Les valeurs obtenues pour les sites Berck et Pointe de Saint Quentin sont comparables aux valeurs de référence reportées par Marigomez *et al.* (2013) et aux valeurs enregistrées en laboratoire chez des individus control (Izagirre *et al.*, 2009, Blanco-Rayón *et al.*, 2019).

Accumulation intracellulaire de lipides neutres

Afin de détecter des changements potentiels dans le contenu lysosomal, l'accumulation intracellulaire de lipides neutres a été analysée sur un total de 80 moules collectées lors de la campagne SELISEINE 2021 (**Figure 24**). Les valeurs maximales étaient enregistrées pour les sites Berck et Pointe de Saint Quentin (**Figure 24**). Ces valeurs sont comparables aux valeurs de référence reportées par Garmendia *et al.* (2010) : $0,05-0,10 \mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$.

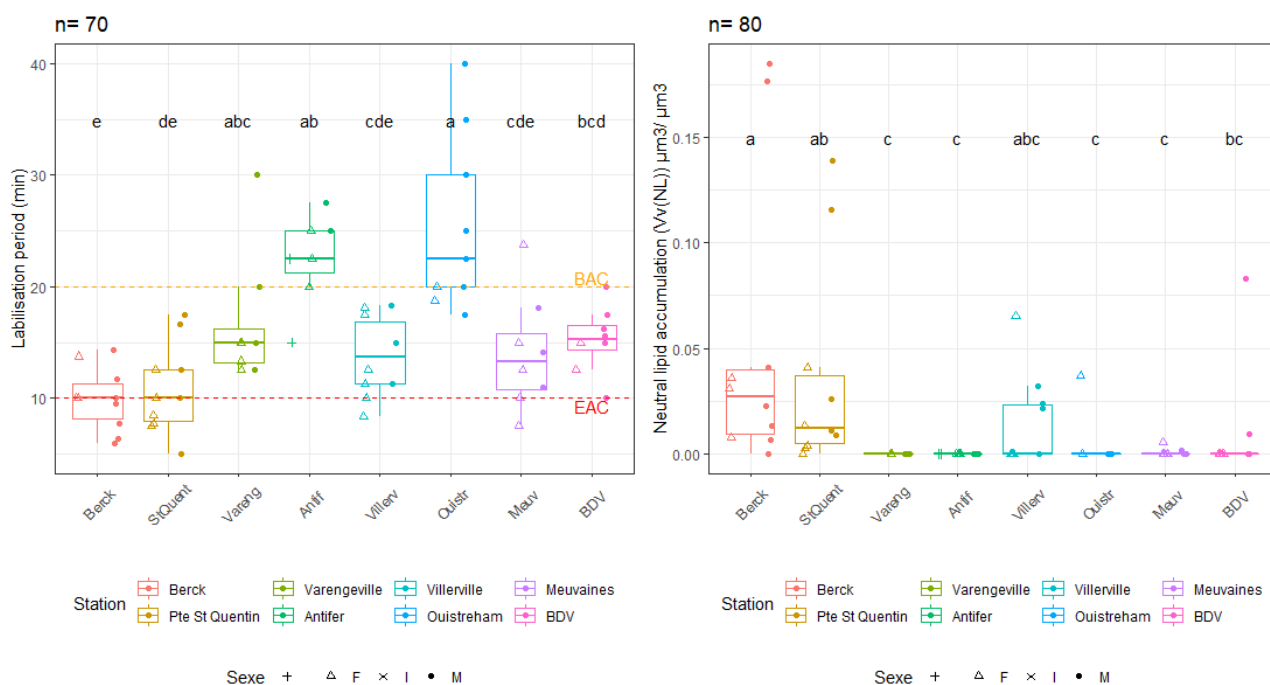


Figure 24 – Biomarqueurs de stress général chez les moules collectées aux 8 stations de la campagne SELIMANCHE en février 2022 : temps de labilisation des lysosomes (min, gauche) et accumulation de lipides neutres ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$, droite). Les lignes horizontales indiquent les seuils (Tableau 1). Les lettres sur les plots indiquent les groupes significativement différents selon 1) LMS : une ANOVA suivi d'un test post hoc de Tukey et 2) Vv(NL) : un test de KW suivi d'un test post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

Tableau 20 - Période de labilisation (min) mesurée dans la glande digestive de moules échantillonnées lors des campagnes SELIMANCHE 2018 et 2021. Les astérisques* indiquent des différences significatives entre les campagnes 2018 et 2012 (Test U de Mann-Whitney $p < 0,05$).

Stations	Mean LP SELISEINE 2018	Mean LP SELISEINE 2021
Antifer	15,53 ± 6,57	22,50 ± 4,08*
Meuvaines	19,82 ± 10,02	14,01 ± 5,11*
Villerville	15,83 ± 9,49	13,73 ± 3,57
Ouistreham	17,81 ± 5,25	25,42 ± 7,91*
Baie des veys	15,24 ± 3,57	15,23 ± 3,02

Tableau 21 – Changements structuraux des lysosomes (LSC) mesurés dans la glande digestive de moules échantillonnées à Berck et Pointe de Saint Quentin lors de la campagne SELIMANCHE 2021; $Vv_{(lys)}$ = densité volumétrique lysosomale ($\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$); $S_{(lys)}/V_{(lys)}$ = ratio Surface/Volume ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$); $Nv_{(lys)}$ = densité numérique lysosomale ($1/\mu\text{m}^3$).

	Units	Berk	PSQ
Vv_{Lys}	$\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^3$	0,00129 ± 0,001058	0,00172 ± 0,00137
S/V_{Lys}	$\mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$	4,61 ± 1,27	4,48 ± 1,50
Nv_{Lys}	$1/\mu\text{m}^3$	0,0015 ± 0,0005	0,0018 ± 0,0004

4.3 Biomarqueurs de génotoxicité : tests des comètes et des micronoyaux

Les niveaux de cassures de brins de l'ADN ont été mesurés chez 67 moules des 8 stations ROCCH. Les niveaux varient de 5,2 à 29,7 % ADN présent dans la queue de la comète ($16,5 \pm 4,6$, % Tail DNA). Le niveau de dommage à l'ADN est similaire entre les 8 stations analysées ($p > 0,05$, **Figure 25**). Les valeurs moyennes par station se situent entre 1,4 et 2,0 fois la BAC (10 %, (Davies and Vethaak, 2012)). Lors de la campagne SELISEINE 2018, les niveaux varient de 6,4 à 17,5 % ADN présent dans la queue de la comète (% Tail DNA) (Mauffret *et al.*, 2021).

La présence de micronoyaux a été recherchée chez 87 moules des 8 stations ROCCH ; 32 lames ne présentaient pas assez d'hémocytes pour être lues (probablement lié au prélèvement) et une lame était cassée. Quarante-neuf individus ne présentaient pas de micronoyaux (*i.e.* 46%). Quatre individus présentent une fréquence de micronoyaux supérieure à la valeur de fond (BAC = 2,5 micronoyaux/1000 cellules (Davies and Vethaak, 2012), **Figure 25**). La fréquence de micronoyau est supérieure à Meuvaines (Seine Ouest) par rapport à celle mesurée à Antifer (Seine Est), et les moules des autres stations présentaient des fréquences intermédiaires aux 2 stations.

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 en évidence un stress génotoxique plus intégré et héréditaire comme le sont les micronoyaux (< BAC), en baies de Seine et Somme.

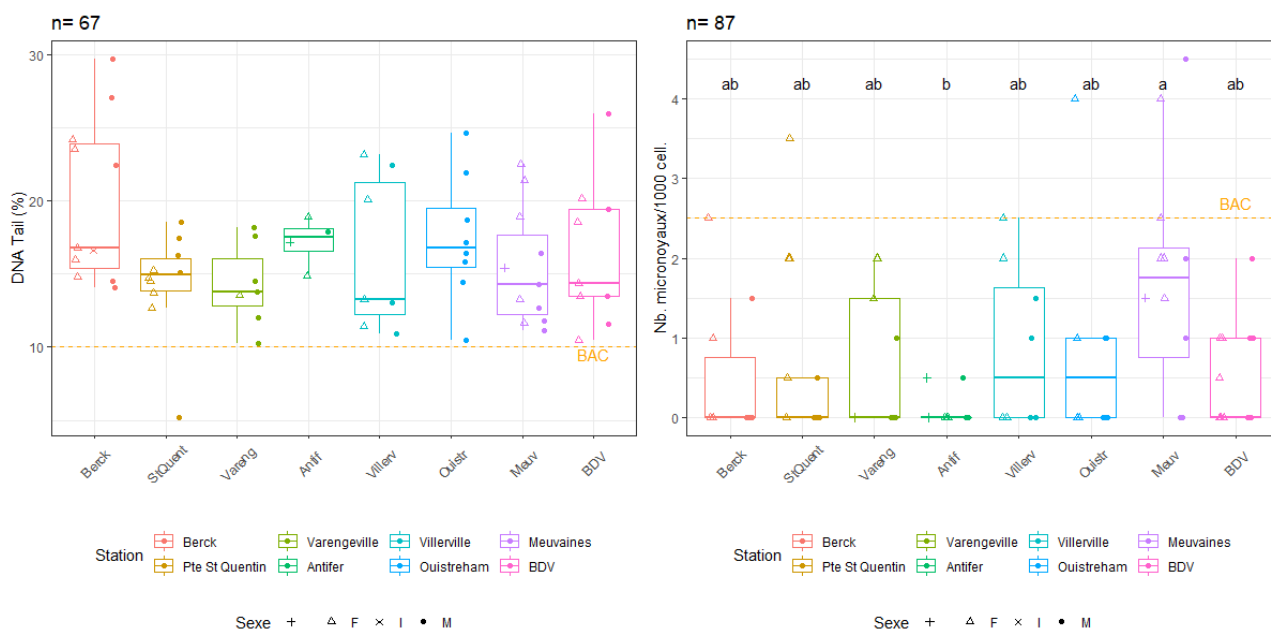


Figure 25 – Biomarqueurs de génotoxicité chez les moules collectées aux 8 stations de la campagne SELIMANCHE en février 2022 : niveau de cassures de brins de l'ADN (%DNA Tail, gauche) et fréquence de cellules micronucléées (MN, %, droite). Les lignes horizontales indiquent les seuils (Tableau 1). Les lettres sur les plots indiquent les groupes significativement différents selon 1) Comet : une ANOVA suivi d'un test post hoc de Tukey ($p > 0,05$, pas de différence entre stations) et 2) MN : un test de KW suivi d'un test post hoc de Dunn ($p < 0,05$).

4.4 Biomarqueur de neurotoxicité : activité AChE

Dans les branchies des 113 moules prélevées sur les 8 stations prospectées, l'activité AChE a été mesurée entre 3,5 et 48,3 (moyenne 18,9) nmol/min/mg protéine. L'activité a été mesurée entre 11,9 et 70,4 (moyenne : 29,3) nmol/min/mg protéine lors de la campagne SELILOIRE 2020 et entre 26,1 et 224,4 (moyenne : 100,4) nmol/min/mg protéine lors de la campagne SELISEINE 2018 (Figure 24). L'activité était minimale (possiblement plus altérée) à Ouistreham et plus élevée à Baie des Veys. La majorité des moules ont des valeurs AChE inférieures à l'EAC suggérant qu'elles seraient soumises à un stress neurotoxique.

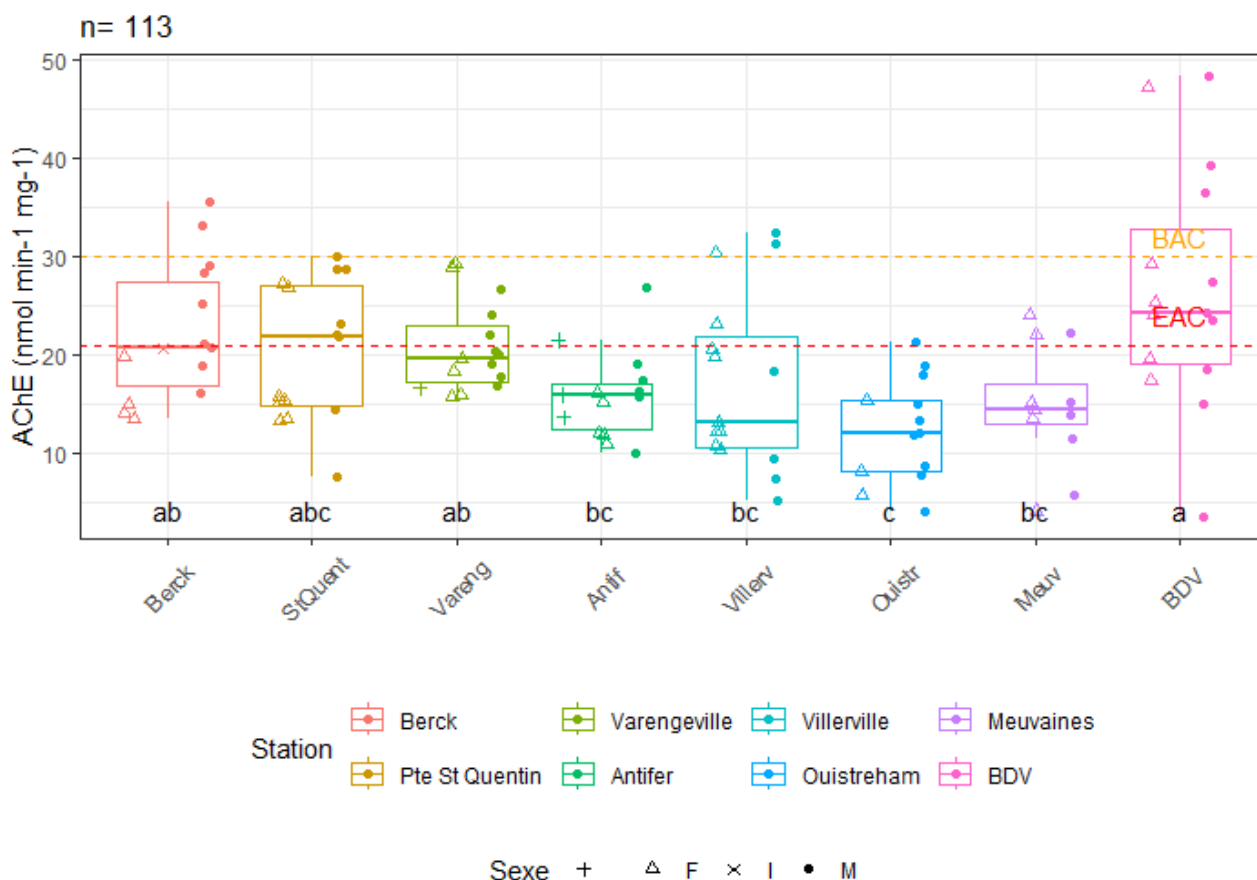


Figure 26 – Biomarqueurs de neurotoxicité chez les moules collectées aux 8 stations de la campagne SELIMANCHE en février 2022 : activité de l'enzyme acétylcholine estérase (AChE). Les lignes horizontales indiquent les seuils (Tableau 1). Les lettres sur les plots indiquent les groupes significativement différents selon 1) Comet : une ANOVA suivi d'un test post hoc de Tukey ($p > 0,05$, pas de différence entre stations, 6 outliers ont été retirés).

4.5 Analyse histologique chez la moule

4.5.1 Sex-ratio et stades de maturité chez la moule

Un examen histologique des gonades a été réalisé pour déterminer le sexe et les stades de développement gonadal chez la moule (Tableau 22). Le stade de développement précoce était uniquement détecté pour le site de Meuvaines. La proportion d'individus matures observés pour le site Berck était significativement supérieure aux autres sites (test z-score). L'avancé du cycle de développement des gonades peut affecter les niveaux de biomarqueurs chez la moule (Benito *et al.*, 2019). Un individu intersex a été identifié pour le site Berck.

Tableau 22 - Sexe et stades de développement gonadal (%) identifiés histologiquement chez la moule échantillonnée lors de la campagne SELIMANCHE 2021. Les astérisques * indiquent des différences significatives entre sites (test z-score, $p < 0,05$).

	Male	Female	Undif. ferentiated	Undif. ferentiated	Early Development	Advanced	Mature	Spawning	Post-spawning
Berck	64,29	35,71	0,00	0,00	0,00	0,00	86,67*	13,33	0,00
Pointe de St Quentin	53,33	46,67	0,00	0,00	0,00	0,00	57,14	35,71	7,14
Varengueville	57,14	42,86	0,00	0,00	0,00	46,15	38,46	15,38	0,00
Antifer	54,55	45,45	0,00	0,00	0,00	30,00	40,00	20,00	10,00
Villerville	40,00	60,00	0,00	0,00	0,00	66,67	26,67	6,67	0,00
Ouistreham	73,33	26,67	0,00	0,00	0,00	60,00	33,33	6,67	0,00
Meuvaines	42,86	57,14	0,00	0,00	7,14*	42,86	42,86	7,14	0,00
Baie des Veys	60,00	40,00	0,00	0,00	0,00	20,00	40,00	33,33	6,67

4.5.2 Lésions et pathologies chez la moule

Plus de 70% des femelles montraient des cas d'atrésie sauf pour le site Antifer pour lequel la proportion d'occurrence de la lésion était significativement inférieure (40 %, **Tableau 23**). La valeur maximale de l'indice semi-quantitatif d'atrésie a été enregistrée à Ouistreham et Varengueville (indice = 4, **Tableau 24**) mais l'indice d'atrésie était statistiquement similaire entre stations (Kruskal Wallis $p > 0,05$, **Tableau 24**). L'atrésie est un phénomène habituellement observé lors du cycle gonadal des bivalves, en particulier pour les stades les plus proches de la période de ponte comme observés lors de cette campagne. Ce phénomène a également été observé suite à des expositions à divers contaminants comme dans des cas de marées noires (Ortiz-Zarragoitia *et al.*, 2011b).

Les valeurs minimales de l'indice adipogranulaire ont été enregistrées à Ouistreham et Varengueville et la valeur maximale à Pointe de Saint Quentin (**Figure 27 A**). Il a été rapporté que l'indice adipogranulaire diminuait chez la moule en présence de contaminants (Benito *et al.*, 2023 ; Cunha *et al.*, 2023). Cet indice varie aussi au cours des saisons avec des valeurs minimales au printemps et maximales en automne (Bignell *et al.*, 2008, Benito *et al.*, 2019). Benito *et al.* (2023) ont reporté des niveaux d'indice adipogranulaire chez *M. edulis* provenant de sites éloignés de source de contamination connue qui se rapprochent des niveaux reportés pour les sites au nord de la Baie de Somme (Berck et Pointe de St Quentin).

L'indice d'atrophie enregistré pour le site Villerville était significativement supérieur à celui du site Pointe de Saint Quentin (**Figure 27 B**). Ces valeurs dépassent les valeurs maximales enregistrées lors de la campagne SELILOIRE 2020, pour le site Pointe Er Fosse. Elles sont aussi comparables aux valeurs reportées dans des études précédentes après exposition aux ETM Pb et Li (Cunha *et al.*, 2023) et supérieures aux valeurs reportées chez la moule pour des sites de référence et contaminés, ce qui suggère une altération de la glande digestive (Benito *et al.*, 2023).

Finalement, les valeurs d'indice d'intégrité de la glande digestive (Connective Tissue Index) ne variaient pas significativement entre sites. Lors de la campagne SELILOIRE 2020, cet indice a permis de différencier les états de santé général des moules entre sites. Dans le cas présent, les valeurs enregistrées se rapprochent aux valeurs les plus basses de la campagne SELILOIRE 2020. Les moyennes les plus élevées enregistrées pour les sites Pointe de Saint Quentin et Villerville (>2) sont comparables aux niveaux reportés en laboratoire chez la moule après exposition à un ETM, le Li (Fraga *et al.*, 2022). L'indice de l'intégrité de la glande digestive peut varier sous l'influence de contaminants, de la disponibilité de la nourriture ou de l'influence du cycle de reproduction (Benito *et al.*, 2017, Benito *et al.*, 2019).

Tableau 23 – Prévalence (en % de moules atteintes) des lésions et parasites identifiés dans la glande digestive (dg) ou gonade (go) chez la moule échantillonnée lors de la campagne SELIMANCHE 2021. Les astérisques * indiquent des différences significatives entre site (test z-score, $p < 0,05$).

	n	BUC	MPX(dg)	MEL(dg)	MEL(go)	ATS(go)	HAE
Berck	15	0,00	6,67	33,33	0,00	93,33	40,00
Pointe de St Quentin	15	6,67	6,67	60,00	0,00	71,43	46,67
Varengueville	14	6,67	0,00	33,33	0,00	93,33	40,00
Antifer	11	0,00	0,00	60,00	0,00	44,00*	20,00
Villerville	15	0,00	0,00	26,67	0,00	100,00	33,33
Ouistreham	15	0,00	0,00	80,00	6,67*	100,00	73,33
Meuvaines	14	7,14	0,00	57,14	0,00	75,00	35,71
Baie des Veys	15	6,67	0,00	53,33	0,00	83,33	6,67

BUC: *Bucephalus* sp. / trematode sporocyst

MPX: Digestive cell Intracelular cilliate

MEL: Brown cell infiltration

ATS: Atresia

HAE: Haemocytic infiltration focal/diffuse

Lésions recherchées mais non observées : Digenean, Gregarine, Digestive tissue degeneration, Granulocytoma

Tableau 24 – Indice semi-quantitatif d'atrésie calculés pour les moules femelles échantillonnées lors de la campagne SELIMANCHE 2021. Pas de différences significatives entre sites (KW, $p > 0,05$).

Sites	Indice d'atrésie (ATSgo)
Berck	2,20
Pointe de St Quentin	2,60
Varengueville	4,00
Antifer	3,33
Villerville	3,78
Ouistreham	4,00
Meuvaines	3,17
Baie des Veys	2,60

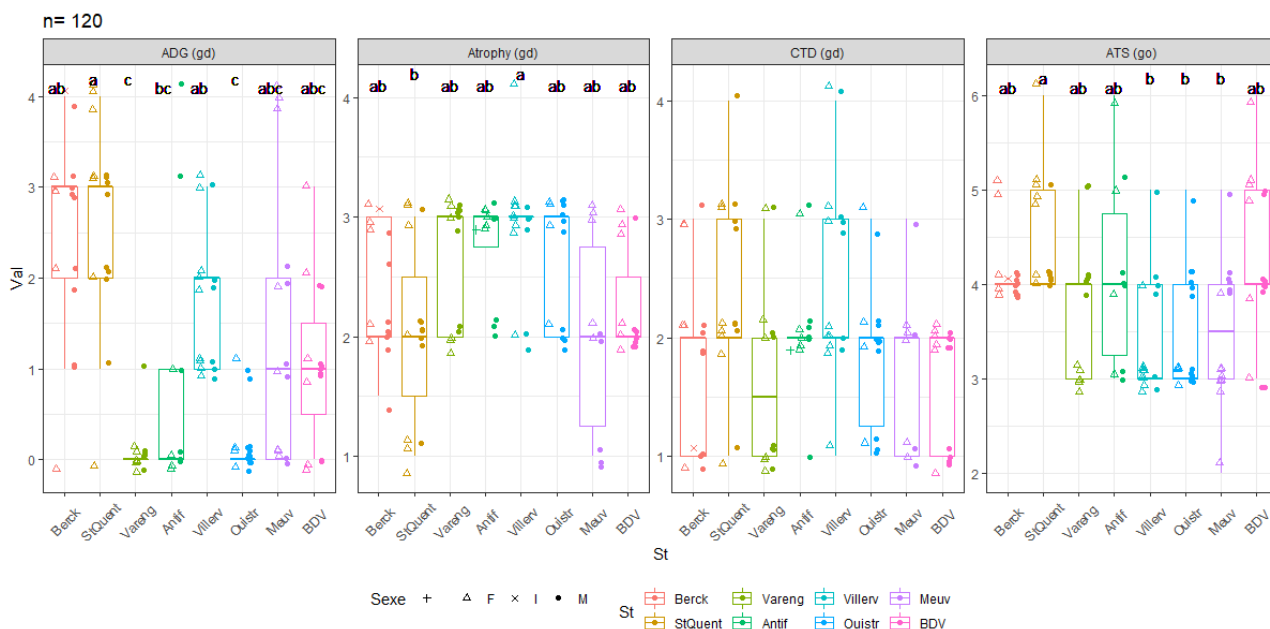


Figure 27 – Indices cellulaires (A) adipogranulaire (ADG), (B) d'atrophie et (C) d'intégrité (Connective to Digestive Tissue Index, CTD) de la glande digestive (gd) et indice semi-quantitatif d'atrésie des gonades femelles (go), calculés après examen histopathologique des moules collectées lors de la campagne SELIMANCHE 2021. Les différentes lettres indiquent des différences spatiales significatives (Kruskal-Wallis, test post hoc Dunn, $p < 0,05$).

4.6 Approche intégrée par indice : Distance au seuil pour toutes les variables avec un seuil (CHASE)

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-dessous). Ils ne font pas l'objet d'une analyse spécifique dans le cadre du projet SELIMANCHE 2021, mais ils sont utilisés pour l'analyse multiparamétrique CHASE (voir détail et définition ci-dessus : 3.4.2, (Andersen *et al.*, 2016, Andersen *et al.*, 2019)). Pour rappel, un indice (Contamination score, CS) basé sur la distance au seuil d'un ensemble de variables permet de qualifier la zone évaluée en

- 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 ≥ 10 : « Zone à problème » ayant une qualité environnementale mauvaise

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.

Pour les biomarqueurs, les seuils utilisés dans le CHASE sont l'EAC pour l'ACHe et la LMS, puis la BAC pour les micronoyaux et le Comet (**Tableau 1**). Les 8 stations évaluées sont classées en « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée, notamment liée au biomarqueur de neurotoxicité (ACHe) et génotoxicité (Comet) (**Figure 28** gauche).

Pour les contaminants, l'évaluation présentée sur le OHAT d'OSPAR a été utilisée. Elle est disponible sur <https://dome.ices.dk/ohat/?assessmentperiod=2024>. Les seuils utilisés dans cette évaluation correspondent aux seuils du Tableau 2 et 7 seuils santé humaine supplémentaires :

TBSN+	QShh = 93 µg/kg dw
BAP	QShh = 31 µg/kg dw
FLU	QShh = 183 µg/kg dw
SBDE6	QShh = 0,05 µg/kg dw
PFOS	QShh = 55 µg/kg dw
SCB6	MPC = 457 µg/kg dw
HCHG	QShh = 372 µg/kg dw

L'évaluation est effectuée en poids sec pour les bivalves selon les recommandations sur le OHAT ([methods contaminants biota \(ices.dk\)](#)). Au regard de la santé environnementale et de la santé humaine, 6 des 8 stations sont classées en « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée (**Figure 28**). Par contre, Antifer et Villerville présentent un CS ≥ 5 pour les 2 objectifs de protection considérés (santé environnementale et santé humaine), elles sont donc classées en « Zone à problème » ayant une qualité environnementale faible. Les principaux écarts aux seuils environnementaux sont observés pour le CB-118, CB-101 et le Hg. Par ailleurs, le TBT est 3 et 1,5 fois supérieur à l'EAC (12 µg/kg dw) à Antifer et Villerville, respectivement. Les principaux écarts aux seuils « santé humaine » sont observés pour les PBDE avec des concentrations 6 (Berck) à 27 (Antifer) fois supérieures à la NQE (0,05 µg/kg dw = 0,0085 µg kg⁻¹ ww, somme des BDE-28, -47, -99, -100, -153 and -154).

Tableau 25 – Valeur des indices CS chez les moules des différentes stations. Les « n » indiquent le nombre de paramètres pris en compte dans le calcul. Les couleurs des cellules sont liées à la classification CHASE : **bleu** : CS = 0,5 < 1 : « Zone sans problème » de bonne qualité, **orange** : CS = 1 < 5 : « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée, **rouge** : CS = 5 < 10 : « Zone à problème » ayant une qualité environnementale qualité faible.

Station	CS Biomarqueurs	CS santé environnementale	CS santé humaine
N	4	25	9
Seine			
Varengeville	1,71	2,24	2,70
Antifer	1,82	5,13	5,36
Villerville	2,19	9,11	9,90
Ouistreham	2,31	2,60	3,48
Meuvaines	2,44	1,64	2,80
BDV	1,84	1,13	3,14
Somme			
Berck	2,16	1,42	2,19
Pte St Quentin	1,98	1,47	2,48

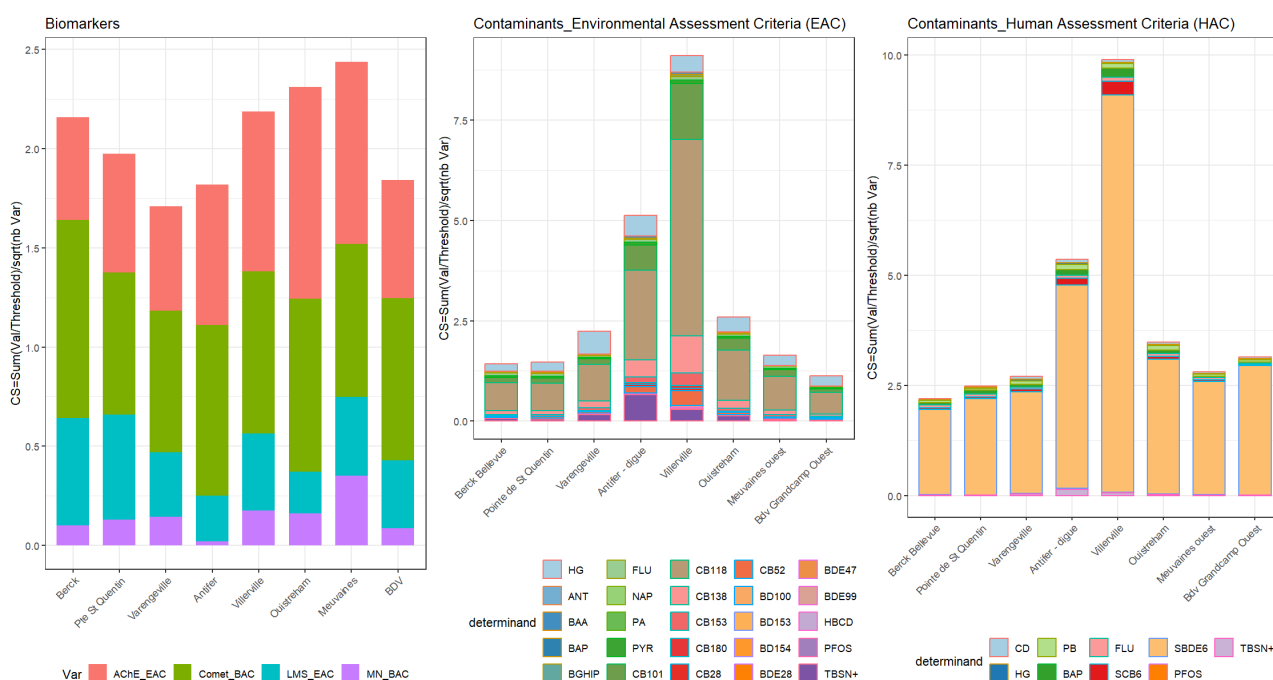


Figure 28 – Calcul de l'indice multiparamétrique CHASE pour les stations prospectées lors de la campagne SELIMANCHE 21. Les paramètres sont regroupés par type : réponses des biomarqueurs (gauche), concentrations en contaminants comparées aux seuils environnementaux (milieu) et contaminants comparés aux seuils « santé humaine » (droite).

5 Conclusions

Les poissons plats et les mollusques bivalves sont utilisés comme organismes sentinelles dans les SELI. Ils sont recommandés pour la surveillance de la contamination et de ses effets sur les organismes marin par OSPAR. 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 et filtreurs, ils sont également sujets à une forte pression chimique et peuvent en être impactés.

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-huit poissons plats ont été pêchés en baies de Seine et Somme en septembre 2021. 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 principalement ($n = 30$ pour les contaminants organiques et $n = 50$ pour les autres éléments traces métalliques et le Hg). La variabilité spatiale de réponses des biomarqueurs ou des concentrations en contaminants a été analysée sur un sous-échantillonnage d'individus pour limiter l'effet de facteurs biologiques possiblement confondants dans les analyses de variances : les individus sélectionnés sont âgés de 1, 2 ou 3 ans, chaque station est représentée par plus de 5 individus. L'effet de l'âge sur la réponse des biomarqueurs ou les concentrations en contaminants a été analysé séparément (régression linéaire). Les biomarqueurs ont de plus été analysés chez des moules prélevées au niveau de 8 stations ROCCH MV des baies de Seine et Somme en février 2022 (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. Pour la majorité des paramètres analysés, le sexe et l'âge (pour les individus entre 0 et 3 ans, *i.e.* < 4 ans) des poissons n'avaient pas d'effet sur les valeurs observées.

- **Santé générale** : La stabilité de la membrane lysosomale (LMS), indicatrice d'un état de santé générale des individus, semble altérée (<EAC) chez les soles en baies de Seine et Somme. Les valeurs de période de labilisation chez la sole en 2021 sont similaires par rapport à celles mesurées lors de la précédente campagne (SELISEINE 2018). L'analyse de la structure des lysosomes (densité volumétrique N_v , densité numérique N_v , diminution du ratio surface/volume S/V) confirme l'observation faite par l'analyse de la LMS montrant un état de santé général plus affecté en Somme (BS1 et BS2) et Z5 qu'aux autres stations en Seine pour la sole (*i.e.* Z1 et Z6). Les flets présentent des valeurs de labilisation altérées (<EAC) à Z1 (embouchure de la Seine) mais pas à BS2. Les valeurs de période de labilisation chez le flet en 2021 sont inférieures (plus altérées) à celles mesurées en 2018 (SELISEINE 2018). Chez la moule, la stabilité de la membrane lysosomale semble plus altérée en Somme (Berck, Pointe de St Quentin) et à Z1 qu'aux autres stations en Seine (*i.e.* Z5 et Z6). En Somme, elle était, de plus, inférieure à l'EAC suggérant un possible stress chez les moules.

- **Génotoxicité** : Le niveau de cassures de brins d'ADN chez la sole et le flet atteint des valeurs maximales allant jusque 66 % d'ADN dans la queue de la comète ce qui est plus élevé que les valeurs précédemment obtenues sur la zone (Akcha et al., 2004; Mauffret et al., 2021). Cette différence de résultats entre années peut traduire soit un problème lié à la préparation et à la conservation des

échantillons, soit une dégradation de la qualité de l'environnement. Pour le moment, nous présentons ces données dans le rapport pour évaluer des différences entre stations et espèces mais ne les intégrons pas encore dans l'évaluation environnementale (3.4.2). Chez la sole, le niveau de cassures de brins de l'ADN est plus élevé à Z1 et Z5 qu'en Somme et à Z6, l'inverse est observé chez le flet (BS2 > Z1). Le niveau de cassures de brins de l'ADN est plus élevé chez la sole que chez les flets, notamment à Z1. L'occurrence des micronoyaux chez la sole et le flet varie de 0 à 0,6 micronoyaux/1000 cellules avec 141 poissons ne présentant pas de micronoyau (95 %) ce qui suggère une faible pression génotoxique. Chez la moule, les niveaux de cassures de brins d'ADN sont similaires entre stations. La fréquence de micronoyaux est supérieure à Meuvaines par rapport à Antifer, et les moules des autres stations présentaient des fréquences intermédiaires aux 2 stations.

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 en évidence d'anomalies chromosomiques (dommages plus intégratifs, irréversibles et transmissibles entre générations) tels que les micronoyaux (< BAC), en baies de Seine et Somme.

- **Neurotoxicité** : L'activité AChE est plus inhibée à BS2 qu'aux autres stations chez la sole, elle est similaire entre Seine et Somme chez le flet. Elle est aussi plus faible chez la sole que chez le flet comme suggéré lors de la campagne SELISEINE 2018. Chez la moule, l'activité AChE était minimale (possiblement plus altérée) à Ouistreham et plus élevée à Baie des Veys. La majorité des moules ont des valeurs AChE inférieures à l'EAC suggérant qu'elles seraient soumises à un stress neurotoxique.
- **Exposition aux HAP** : Les niveaux en métabolites de HAP dans la bile des soles et des flets sont inférieurs aux EAC. De manière générale, les concentrations en métabolites de HAP dans la bile des flets et soles étaient plus élevés en Seine qu'en Somme.
- **Reprotoxicité** : Aucun mâle (sole et flet) 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 d'accumulation de lipides dans les ovocytes sont plus fréquemment observés chez les soles de Seine que chez les soles de Somme, et ils ne sont pas observés chez les flets (de Seine et de Somme). 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). L'indice histopathologique des gonades était similaire entre station pour le flet et pour la sole. A Z1, l'indice histopathologique des gonades est *ca.* 3 fois plus élevé chez la sole que le flet, mais il était similaires entre les 2 espèces à BS2.
- **Pathologies hépatiques** : Aucune sole analysée ne présentait de lésions néoplasiques. L'indice histopathologique (foie) est plus élevé à Z1 qu'à BS2 chez la sole (les autres stations ont une position intermédiaire), il est similaire entre Z1 et BS2 chez le flet. L'indice histologique hépatique est plus élevé chez la sole que le flet.
- **Contaminants organiques** : Les principaux dépassements des seuils environnementaux chez les poissons sont observés pour les PCB, notamment le CB-118 (type dioxine). Les concentrations en PCB, HBCDD, pesticides organochlorés sont en majorité plus élevées à Z1 et Z5 qu'à BS1 et plus élevées chez le flet que chez la sole. L'analyse de ratio de congénères de PBDE suggère que la sole aurait de meilleures capacités métaboliques que le flet. Par contre, les concentrations en PFAS montrent un profil différent. Elles sont similaires entre sole et flet, les concentrations en PFOS sont aussi similaires entre stations, les concentrations en PFNA sont supérieures en Somme par rapport à celles en Seine et les concentrations en PFTeDA sont plus élevées en Seine qu'en Somme.

- **Contaminants inorganiques (éléments traces métalliques)** : Les concentrations en Hg sont supérieures au seuil environnemental chez une large majorité de poissons. Certains éléments, principalement ceux non-essentiels, montrent une tendance à l'augmentation des concentrations mesurées avec l'âge de individus (*e.g.* Ag, Cd, Cu, Hg, U et V ont des coefficients de corrélation > 0,6) mais sont similaires entre les individus de 1 et 2 ans utilisés pour les comparaisons inter-espèces et inter-stations. Certains éléments sont plus élevés chez la sole que chez le flet (Ag, Mn, Mo et dans une moindre mesure Tl) d'autres éléments sont plus élevés chez le flet (Cd, Co, Hg, U et Zn). Il y a globalement peu de différences entre stations, sauf par exemple pour 1) l'Ag qui est plus élevé en Somme qu'en Seine, et 2) Ni, et dans une moindre mesure V, qui sont plus élevés en Seine qu'en Somme chez le flet en particulier.

Différentes méthodes d'évaluation intégrée sont présentées dans ce rapport (analyse multivariée, approche par indice cumulé (écart au seuil (= CHASE)).

- **Analyse multivariée** : Au niveau des ACP pour les biomarqueurs et pour les éléments traces, l'effet principal est entre espèces, puis entre stations. Pour les contaminants organiques, l'effet principal est entre stations puis entre espèces. 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 au seuil (CHASE)** : Ces analyses sont synthétisées pour les moules et les poissons en Baie de Seine et de Somme (**Figure 29**). D'après les réponses des biomarqueurs chez les poissons, 5 des 7 couples espèce_station sont classées en « Zone sans problème » de bonne qualité selon l'approche CHASE sur les biomarqueurs. Pour les 2 cas restants, les soles en Somme (BS1 et BS2) sont en « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée. D'après les réponses des contaminants chez les poissons, la qualité de l'environnement au regard des organismes marins est classée en « Zone à problème » ayant une qualité modérée (soles de Seine et Somme, et flets de Somme) à faible (Flets et soles en Z1) principalement du fait des concentrations en CB-118 et Hg. La qualité de l'environnement au regard de la santé humaine est en « Zone sans problème » de bonne qualité (Soles en Somme et en Z5) à « Zone à problème » ayant une qualité mauvaise (Flets en Z1) principalement du fait des concentrations en PBDE. D'après les réponses des biomarqueurs chez les moules, les 8 stations évaluées sont classées en « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée, notamment liée au biomarqueur de neurotoxicité (AChE) et génotoxicité (Comet). Pour les contaminants (au regard de la santé environnementale et de la santé humaine), 6 des 8 stations sont classées en « Zone à problème », ayant une qualité environnementale modérée. Par contre Antifer et Villerville présentent un CS \geq 5 pour les 2 objectifs de protection considérés (santé environnementale et santé humaine), elles sont donc classées en « Zone à problème » ayant une qualité environnementale faible.

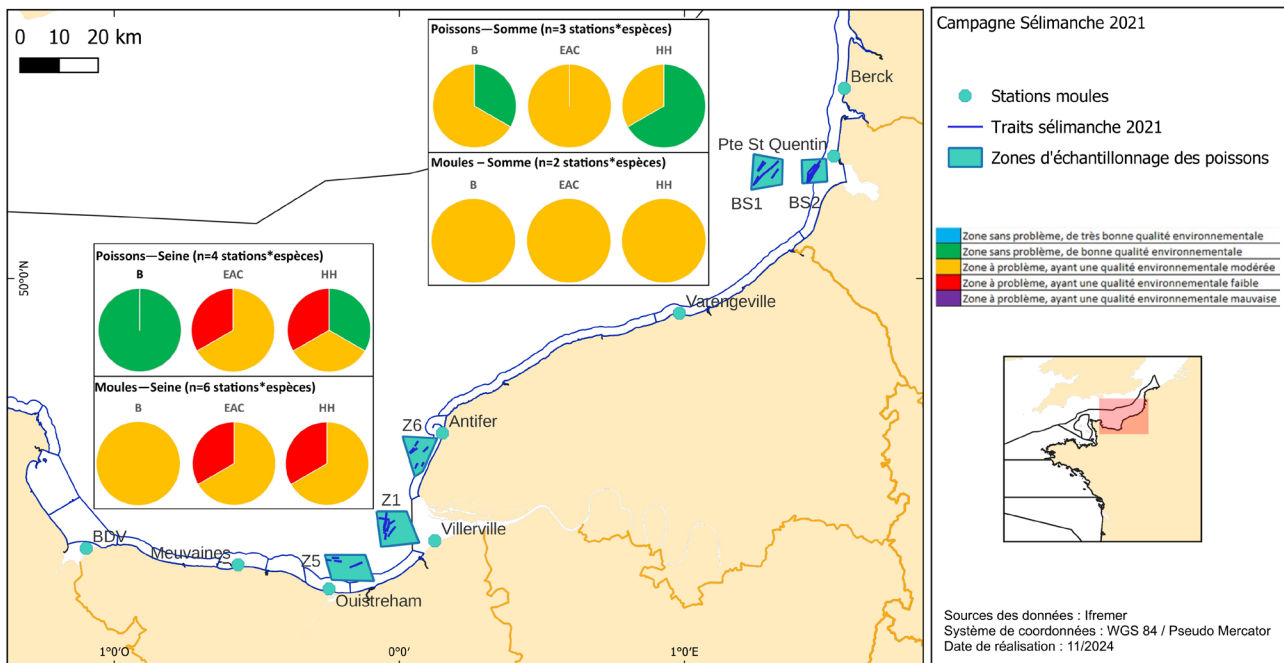


Figure 29 – Indice cumulé CHASE pour les poissons et moules, en Seine (Z1 + Z5 + Z6 pour la sole et le flet ; Varengeville, Antifer, Villerville, Ouistreham, Meuvaine et Baie des Veys pour la moule) et en Somme (BS1 + BS2 pour la sole et le flet ; Berck et Pointe de Saint Quentin pour la moule). La lettre au dessus de chaque camembert correspond au groupe de paramètres concerné : B = Biomarqueurs ; EAC = Contaminants avec des seuils de santé environnementale EAC ; HH = Contaminants avec des seuils de santé humaine.

Le dispositif SELI est le seul à permettre l'étude simultanée de la contamination et ses possibles effets sur les organismes de manière globale et dans l'environnement. La pérennisation d'un tel dispositif permettra de

- 1) suivre l'évolution des impacts écotoxicologiques de la contamination chimique diffuse,
- 2) 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 endocrinienne 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.* tendances spatio-temporelles, et liens entre contamination et biomarqueurs. Les observations *in situ* sont pertinentes d'un point de vue écologique mais nécessitent beaucoup de données et des approches comparatives (notamment entre systèmes) pour conclure quant aux effets qui pourraient être imputés aux contaminants chimiques.

Références

- Akcha, F., C. Munsch, K. Moisan and J. Tronczynski (2004a). Relation entre la contamination chimique de l'estuaire de la Seine et les effets génotoxiques et cancérigènes chez la limande. Etude financée par l'Agence de l'eau Seine Normandie, Rapport Ifremer, Centre de Nantes, 2004, R. INT.DCN/BE-2005-08 (70 p).
- Akcha, F., A. Tanguy, G. Leday, L. Pelluhet, H. Budzinski and J. F. Chiffolleau (2004b). "Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast." Marine Environmental Research **58**(2-5): 753-756.DOI: 10.1016/j.marenvres.2004.03.090.
- Akcha, F., F. Vincent Hubert and A. Pfohl-Leszkowicz (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., A. Buxens, L. I. Mazón, I. Marigómez and M. Soto (2005). "Cellular biomarkers of exposure and biological effect in hepatocytes of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu and Zn and after depuration." Aquatic Toxicology **74**(2): 110-125.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.024>.
- Andersen, J. H., N. Bork, N. Green, T. Harvey, C. Murray, X. Trier, C. Whaley and J. Reker (2019). Contaminants in Europe's Seas, European Environment Agency, EEA Report No 25/2018: 61. DOI: 10.2800/511375
- Andersen, J. H., C. Murray, M. M. Larsen, N. Green, T. Høggåsen, E. Dahlgren, G. Garnaga-Budrè, K. Gustavson, M. Haarich, E. M. Kallenbach, J. Mannio, J. Strand and S. Korpinen (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., E. Ponzevera, N. Briant, J. Knoery, S. Bruzac, T. Sireau, A. Pellouin-Grouhel and C. Brach-Papa (2021). "Differences in Copper Isotope Fractionation Between Mussels (Regulators) and Oysters (Hyperaccumulators): Insights from a Ten-Year Biomonitoring Study." Environmental Science & Technology **55**(1): 324-330.DOI: 10.1021/acs.est.0c04691.
- Ballutaud, M., H. Drouineau, L. Carassou, G. Munoz, X. Chevillot, P. Labadie, H. Budzinski and J. Lobry (2019). "Estimating Contaminants tRansfers Over Complex food webs (ESCROC): An innovative Bayesian method for estimating POP's biomagnification in aquatic food webs." Science of the Total Environment **658**: 638-649.DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.058.
- Baumann, P. C., J. C. Harshbarger and K. J. Hartman (1990). "RELATIONSHIP BETWEEN LIVER-TUMORS AND AGE IN BROWN BULLHEAD POPULATIONS FROM 2 LAKE ERIE TRIBUTARIES." Science of the Total Environment **94**(1-2): 71-87.DOI: 10.1016/0048-9697(90)90365-2.
- Benito, D., A. Ahvo, J. Nuutinen, D. Bilbao, J. Saenz, N. Etxebarria, X. Lekube, U. Izagirre, K. K. Lehtonen, I. Marigómez, B. Zaldibar and M. Soto (2019). "Influence of season-dependending ecological variables on biomarker baseline levels in mussels (*Mytilus trossulus*) from two Baltic Sea subregions." Science of The Total Environment **689**: 1087-1103.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.412>.
- Benito, D., H. D. Guls, H. P. Halldórsson, T. M. Ciesielski, U. Izagirre, X. Lekube, N. Etxebarria, I. Marigómez, B. Zaldibar and M. Soto (2023). "Integrated assessment of biological responses to pollution in wild mussels (*Mytilus edulis*) from subarctic and arctic areas in the Norwegian sea." Environmental Pollution **336**: 122454.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122454>.
- Benito, D., M. Niederwanger, U. Izagirre, R. Dallinger and M. Soto (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): 1815.
- Bernet, D., H. Schmidt, W. Meier, P. Burkhardt-Holm and T. Wahli (1999). "Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution." Journal of Fish Diseases **22**(1): 25-34.DOI: 10.1046/j.1365-2761.1999.00134.x.
- Bignell, J. P., M. J. Dodge, S. W. Feist, B. Lyons, P. D. Martin, N. G. H. Taylor, D. Stone, L. Travalent and G. D. Stentiford (2008). "Mussel histopathology: effects of season, disease and species." Aquatic Biology **2**(1): 1-15.

Blanco-Rayón, E., L. Guilhermino, I. Marigómez and U. Izagirre (2019). "Collection and transport of sentinel mussels in biomarker-based coastal pollution monitoring: Current flaws and reliable practices." Ecological Indicators **103**: 722-734. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.04.041>.

Blazer, V. S. (2002). "Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes." Fish Physiology and Biochemistry **26**(1): 85-101. DOI: 10.1023/a:1023332216713.

Bocquene, G. and F. Galgani (1998). "Biological effects of contaminants: Cholinesterase inhibition by organophosphorous and carbamate compounds." ICES Techniques in Marine Environmental Sciences **22**: 1-12.

Bocquené, G., F. Galgani, T. Burgeot, L. Le Dean and P. Truquet (1993). "Acetylcholinesterase levels in marine organisms along French coasts." Marine Pollution Bulletin **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).

Briant, N., T. Chouvelon, L. Martinez, C. Brach-Papa, J. F. Chiffolleau, N. Savoye, J. Sonke and J. Knoery (2017). "Spatial and temporal distribution of mercury and methylmercury in bivalves from the French coastline." Marine Pollution Bulletin **114**(2): 1096-1102. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.018>.

Briant, N., J. Knoery, D. F. Araújo, E. Ponzevera, T. Chouvelon, S. Bruzac, T. Sireau, B. Thomas, M. Mojtahid, E. Metzger and C. Brach-Papa (2024). "Vanishing lead in the Loire River estuary: An example of successful environmental regulation." Environmental Pollution **340**: 122860. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122860>.

Briaudeau, T., L. A. A. Dos Santos, I. Zorita, U. Izagirre and I. Marigomez (2021). "Biological responses and toxicopathic effects elicited in *Solea senegalensis* juveniles by waterborne exposure to benzo a pyrene." Marine Environmental Research **170**. DOI: 10.1016/j.marenvres.2021.105351.

Briaudeau, T., G. Guerrero-Limón, I. Zorita, I. Marigómez and U. Izagirre (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., I. Zorita, N. Cuevas, J. Franco, I. Marigomez and U. Izagirre (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." Marine Pollution Bulletin **145**: 126-137. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2019.05.034.

Briaudeau, T., I. Zorita, U. Izagirre and I. Marigómez (2020). "Biological responses and toxicopathic effects elicited in *Solea senegalensis* juveniles on exposure to contaminated sediments under laboratory conditions." Science of the Total Environment **731**. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.138849.

Broeg, K., S. Zander, A. Diamant, W. Körting, G. Krüner, I. Paperna and H. v. Westernhagen (1999). "The use of fish metabolic, pathological and parasitological indices in pollution monitoring." Helgoland Marine Research **53**(3): 171-194. DOI: 10.1007/s101520050023.

Burgeot, T., F. Akcha, D. Ménard, C. Robinson, V. Loizeau, C. Brach-Papa, C. Martínez-Gómez, J. Le Goff, H. Budzinski, K. Le Menach, J. Cachot, C. Minier, K. Broeg and K. Hylland (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." Marine Environmental Research **124**: 92-105. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.10.009>.

Champagnat, J., J. B. Lecomte, E. Rivot, L. Douchet, N. Martin, F. Grasso, F. Mounier, P. Labadie, V. Loizeau, N. Bacq and O. Le Pape (2021). "Multidisciplinary assessment of nearshore nursery habitat restoration for an exploited population of marine fish." Marine Ecology Progress Series **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.

Claisse, D. (1989). "Chemical contamination of French coasts: The Results of a Ten Years Mussel Watch." Marine Pollution Bulletin **20**(10): 523-528. DOI: [https://doi.org/10.1016/0025-326X\(89\)90141-0](https://doi.org/10.1016/0025-326X(89)90141-0).

Cossa, D., M. Coquery, K. Nakhlé and D. Claisse (2002). Dosage du mercure et du monométhylmercure dans les organismes et les sédiments marins. E. Ifremer.

Costa, P. M., M. S. Diniz, S. Caeiro, J. Lobo, M. Martins, A. M. Ferreira, M. Caetano, C. Vale, T. A. DelValls and M. H. Costa (2009). "Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to

contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach." *Aquatic Toxicology* **92**(3): 202-212. DOI: 10.1016/j.aquatox.2008.12.009.

Couture, R.-M., J.-F. Chiffolleau, D. Auger, D. Claisse, C. Gobeil and D. Cossa (2010). "Seasonal and Decadal Variations in Lead Sources to Eastern North Atlantic Mussels." *Environmental Science & Technology* **44**(4): 1211-1216. DOI: <https://doi.org/10.1021/es902352z>.

Cuevas, N., I. Zorita, P. M. Costa, I. Quincoces, J. Larreta and J. Franco (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)." *Marine Pollution Bulletin* **94**(1-2): 185-198. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2015.02.030.

Cunha, M., I. Cruz, J. Pinto, D. Benito, P. Ruiz, A. M. V. M. Soares, E. Pereira, U. Izagirre and R. Freitas (2023). "The influence of temperature on the effects of lead and lithium in *Mytilus galloprovincialis* through biochemical, cell and tissue levels: Comparison between mono and multi-element exposures." *Science of The Total Environment* **902**: 165786. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165786>.

Dallas, L. J. and A. N. Jha (2015). "Applications of biological tools or biomarkers in aquatic biota: A case study of the Tamar estuary, South West England." *Marine Pollution Bulletin* **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 Cooperative Research Report No 315*.

Deniel, C. (1981). *Les poissons plats en baie de Douarnenez : Reproduction - Croissance - Migrations, Thèse d'état, 476 pp., UBO*.

Deniel, C. and M. Tassel (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 annual report* **44**.

Devier, M. H., M. Le Du-Lacoste, F. Akcha, B. Morin, L. Peluhet, K. Le Menach, T. Burgeot and H. Budzinski (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., T. Lang, G. D. Stentiford and A. Köfler (2004). "Biological effects of contaminants: Use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring." *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* **38**.

Fraga, N., D. Benito, T. Briaudeau, U. Izagirre and P. Ruiz (2022). "Toxicopathic effects of lithium in mussels." *Chemosphere* **307**: 136022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136022>.

García-López, A., V. Fernández-Pasquier, E. Couto, A. V. M. Canario, C. Sarasquete and G. Martínez-Rodríguez (2006). "Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole *Solea senegalensis* Kaup." *General and Comparative Endocrinology* **147**(3): 343-351. DOI: 10.1016/j.ygcen.2006.02.003.

Garmendia, L., M. Soto, M. P. Cajaraville and I. Marigómez (2010). "Seasonality in cell and tissue-level biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: relevance for long-term pollution monitoring." *Aquatic Biology* **9**(3): 203-219.

Garmendia, L., M. Soto, U. Vicario, Y. Kim, M. P. Cajaraville and I. Marigómez (2011). "Application of a battery of biomarkers in mussel digestive gland to assess long-term effects of the Prestige oil spill in Galicia and Bay of Biscay: tissue-level biomarkers and histopathology." *J Environ Monit* **13**(4): 915-932. DOI: 10.1039/c0em00410c.

Gilliers, C., O. Le Pape, Y. Désaunay, J. P. Bergeron, N. Schreiber, D. Guerault and R. Amara (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., T. Burgeot, C. Martínez-Gómez, T. Lang, C. D. Robinson, J. Svavarsson, J. E. Thain, A. D. Vethaak and M. J. Gubbins (2017). "How can we quantify impacts of contaminants in marine ecosystems? The ICON project." *Marine Environmental Research* **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.

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.

Izagirre, U., P. Ruiz and I. Marigómez (2009). "Time-course study of the early lysosomal responses to pollutants in mussel digestive cells using acid phosphatase as lysosomal marker enzyme." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **149**(4): 587-597. DOI: 10.1016/j.cbpc.2009.01.004.

Kammann, U., F. Akcha, H. Budzinski, T. Burgeot, M. J. Gubbins, T. Lang, K. Le Menach, A. D. Vethaak and K. Hylland (2017). "PAH metabolites in fish bile: From the Seine estuary to Iceland." Marine Environmental Research **124**: 41-45. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.02.014>.

Kerambrun, E., F. Henry, V. Cornille, L. Courcot and R. Amara (2013). "A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries." Chemosphere **91**(4): 498-505. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.010>.

Kim, Y., K. A. Ashton-Alcox and E. N. Powell (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., H. Deisemann and B. Lauritzen (1992). "Histological and cytochemical indexes of toxic injury in the liver of dab *limanda limanda*." Marine Ecology Progress Series **91**(1-3): 141-153. DOI: 10.3354/meps091141.

Köhler, A., E. Wahl and K. Söffker (2002). "Functional and morphological changes of lysosomes as prognostic biomarkers of toxic liver injury in a marine flatfish (*Platichthys flesus* (L.))." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(11): 2434-2444. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.5620211124>.

Laffargue, P., M. L. Begout and F. Lagardere (2006). "Testing the potential effects of shellfish farming on swimming activity and spatial distribution of sole (*Solea solea*) in a mesocosm." Ices Journal of Marine Science **63**(6): 1014-1028. DOI: 10.1016/j.icesjms.2006.03.018.

Laurent, J., I. Le Berre, J. Armengaud, S. Kailasam, J. Couteau, M. Waeles, J. Laroche and V. Pichereau (2023). "Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France." Science of the Total Environment **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., J. Moderan, G. Beaune, P. Riera, D. Nicolas, N. Savoye, M. Harmelin-Vivien, A. M. Darnaude, A. Brind'Amour, H. Le Bris, H. Cabral, C. Vinagre, S. Pasquaud, S. Franca and C. Kostecki (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." Journal of Sea Research **75**: 85-95. DOI: 10.1016/j.seares.2012.05.003.

Lebigre, C., Y. Aminot, C. Munsch, M. Drogou, R. Le Goff, N. Briant and T. Chauvelon (2022). "Trace metal elements and organic contaminants are differently related to the growth and body condition of wild European sea bass juveniles." Aquatic Toxicology **248**: 106207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106207>.

Lecomte, J.-B., O. L. Pape, H. Baillif, M. Nevoux, Y. Vermard, M. Savina, M. Veron, S. Lehuta, E. Hunter and E. Rivot (2020). "State-space modeling of multidecadal mark–recapture data reveals low adult dispersal in a nursery-dependent fish metapopulation." Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **77**(2): 342-354. DOI: 10.1139/cjfas-2019-0037.

Lyu, X. Y., F. Xiao, C. Y. Shen, J. J. Chen, C. M. Park, Y. Y. Sun, M. Flury and D. J. Wang (2022). "Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in Subsurface Environments: Occurrence, Fate, Transport, and Research Prospect." Reviews of Geophysics **60**(3). DOI: 10.1029/2021rg000765.

Marigomez, I., L. Garmendia, M. Soto, A. Orbea, U. Izagirre and M. P. Cajaraville (2013). "Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill "Mussel Watch"." Ecotoxicology **22**(3): 486-505. DOI: 10.1007/s10646-013-1042-4.

Marigómez, I., M. Soto, I. Cancio, A. Orbea, L. Garmendia and M. P. Cajaraville (2006). "Cell and tissue biomarkers in mussel, and histopathology in hake and anchovy from Bay of Biscay after the Prestige oil spill

(Monitoring Campaign 2003)." *Marine Pollution Bulletin* **53**(5): 287-304.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.09.026>.

Martinez-Gomez, C., J. P. Bignell and D. Lowe (2015). "Lysosomal membrane stability in mussels." *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences* **56**: 41.DOI: <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-240>.

Mauffret, A., N. Wessel, F. Akcha, Y. Aminot, N. Bély, D. Benito, S. Bruzac, T. Briaudeau, T. Chauvelon, J. Couteau, Y. Godfrin, K. Héas-Moisan, U. Izagirre, P. Le Monier, R. Le Roux, K. Mahé, C. Munsch, N. Olivier, C. Pollono, T. Sireau, B. Thomas and T. Burgeot (2024). Campagne dédiée à l'évaluation des effets biologiques induits par la contamination chimique en baie de Loire – SELILOIRE 2020, Rapport (101 pages).

Mauffret, A., N. Wessel, F. Akcha, C. Munsch, T. Chauvelon, J. Couteau, T. Briaudeau, U. Izagirre, Y. Aminot, C. Pollono, K. Héas-Moisan, N. Olivier, N. Bély, S. Crochet, B. Thomas, T. Sireau, D. Menard and T. Burgeot (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). . DOI: <https://doi.org/10.13155/73215>.

Mauffret, A., N. Wessel, V. Rubeix, F. Akcha, T. Chauvelon, Y. Aminot, C. Munsch, J. Couteau, T. Briaudeau, U. Izagirre, K. Mahé, Y. Godfrin, C. Pollono, K. Héas-Moisan, N. Olivier, N. Bély, S. Bruzac, S. Crochet, B. Thomas, T. Sireau and T. Burgeot (2021). Campagne dédiée à l'évaluation des effets biologiques induits par la contamination chimique en baie de seine - Seliseine 2018, Rapport final (98 pages). DOI: <https://archimer.ifremer.fr/doc/00688/80024/>.

Moore, M. N., J. I. Allen and P. J. Somerfield (2006). "Autophagy: Role in surviving environmental stress." *Marine Environmental Research* **62**: S420-S425.DOI: 10.1016/j.marenvres.2006.04.055.

Mounier, F., L. Pecquerie, J. Lobry, A. E. Sardi, P. Labadie, H. Budzinski and V. Loizeau (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." *Ecological Modelling* **433**.DOI: 10.1016/j.ecolmodel.2020.109224.

Munsch, C., N. Bely, K. Heas-Moisan, N. Olivier and V. Loizeau (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." *Ecotoxicology and Environmental Safety* **145**: 457-465.DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.07.062.

Munsch, C., N. Bely, K. Héas-Moisan, N. Olivier, C. Pollono, S. Hollanda and N. Bodin (2020). "Tissue-specific bioaccumulation of a wide range of legacy and emerging persistent organic contaminants in swordfish (*Xiphias gladius*) from Seychelles, Western Indian Ocean." *Marine Pollution Bulletin* **158**: 111436.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111436>.

Munsch, C., N. Bely, C. Pollono and Y. Aminot (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., N. Bodin, M. Potier, K. Heas-Moisan, C. Pollono, M. Degroote, W. West, S. J. Hollanda, A. Puech, J. Bourjea and N. Nikolic (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." *Environmental Research* **148**: 196-206.DOI: 10.1016/j.envres.2016.03.042.

Munsch, C., K. Héas-Moisan, C. Tixier, L. Boulesteix and J. Morin (2011). "Classic and novel brominated flame retardants (BFRs) in common sole (*Solea solea* L.) from main nursery zones along the French coasts." *Science of The Total Environment* **409**(21): 4618-4627.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.07.021>.

Murua, H. and L. Motos (2006). "Reproductive strategy and spawning activity of the European hake *Merluccius merluccius* (L.) in the Bay of Biscay." *Journal of Fish Biology* **69**(5): 1288-1303.DOI: 10.1111/j.1095-8649.2006.01169.x.

Myers, M. S., L. L. Johnson and T. K. Collier (2003). "Establishing the causal relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and hepatic neoplasms and neoplasia-related liver lesions in English sole (*Pleuronectes vetulus*)." *Human and Ecological Risk Assessment* **9**(1): 67-94.DOI: 10.1080/713609853.

Myers, M. S., J. T. Landahl, M. M. Krahn and B. B. McCain (1991). "RELATIONSHIPS BETWEEN HEPATIC NEOPLASMS AND RELATED LESIONS AND EXPOSURE TO TOXIC-CHEMICALS IN MARINE FISH FROM THE UNITED-STATES WEST-COAST." *Environmental Health Perspectives* **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>.

Ortiz-Zarragoitia, M., L. Garmendia, M. C. Barbero, T. Serrano, I. Marigómez and M. P. Cajaraville (2011a). "Effects of the fuel oil spilled by the <i>Prestige</i> tanker on reproduction parameters of wild mussel populations." *Journal of Environmental Monitoring* **13**(1): 84-94.DOI: 10.1039/c0em00102c.

Ortiz-Zarragoitia, M., L. Garmendia, M. C. Barbero, T. Serrano, I. Marigómez and M. P. Cajaraville (2011b). "Effects of the fuel oil spilled by the Prestige tanker on reproduction parameters of wild mussel populations." *Journal of Environmental Monitoring* **13**(1): 84-94.DOI: 10.1039/c0em00102c.

OSPAR (2012). JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota (Agreement 1999-02, revised 2012).

Phillips, D. J. H. and P. S. Rainbow (1989). "Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms." *Marine Environmental Research* **28**(1): 207-210.DOI: [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(89\)90226-2](https://doi.org/10.1016/0141-1136(89)90226-2).

Reichert, W. L., M. S. Myers, K. Peck-Miller, B. French, B. F. Anulacion, T. K. Collier, J. E. Stein and U. Varanasi (1998). "Molecular epizootiology of genotoxic events in marine fish: Linking contaminant exposure, DNA damage, and tissue-level alterations." *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* **411**(3): 215-225.DOI: 10.1016/s1383-5742(98)00014-3.

Roubeix, V., N. Wessel, F. Akcha, Y. Aminot, T. Briaudeau, T. Burgeot, T. Chouvelon, U. Izagirre, C. Munsch and A. Mauffret (2023). "Differences in biomarker responses and chemical contamination among three flatfish species in the Bay of Seine (NE Atlantic)." *Marine Pollution Bulletin* **197**: 115674.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115674>.

Schiewe, M. H., D. D. Weber, M. S. Myers, F. J. Jacques, W. L. Reichert, C. A. Krone, D. C. Malins, B. B. McCain, S. L. Chan and U. Varanasi (1991). "INDUCTION OF FOCI OF CELLULAR ALTERATION AND OTHER HEPATIC-LESIONS IN ENGLISH SOLE (PAROPHRYUS-VETULUS) EXPOSED TO AN EXTRACT OF AN URBAN MARINE SEDIMENT." *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**(9): 1750-1760.DOI: 10.1139/f91-207.

Schnitzler, J. G., J. P. Thomé, M. Lepage and K. Das (2011). "Organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and trace elements in wild European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) off European estuaries." *Science of The Total Environment* **409**(19): 3680-3686.DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.018>.

Simpson, M. G., M. Parry, A. Kleinkauf, D. Swarbreck, P. Walker and R. T. Leah (2000). "Pathology of the liver, kidney and gonad of flounder (*Platichthys flesus*) from a UK estuary Impacted by endocrine disrupting chemicals." *Marine Environmental Research* **50**(1-5): 283-287.DOI: 10.1016/s0141-1136(00)00089-1.

Stapleton, H. M., R. J. Letcher and J. E. Baker (2004). "Debromination of Polybrominated Diphenyl Ether Congeners BDE 99 and BDE 183 in the Intestinal Tract of the Common Carp (*Cyprinus carpio*)."

Environmental Science & Technology **38**(4): 1054-1061.DOI: 10.1021/es0348804.

Stentiford, G. D., J. P. Bignell, B. P. Lyons, J. E. Thain and S. W. Feist (2010). "Effect of age on liver pathology and other diseases in flatfish: implications for assessment of marine ecological health status." *Marine Ecology Progress Series* **411**: 215-230.DOI: 10.3354/meps08693.

Stentiford, G. D., M. R. Viant, D. G. Ward, P. J. Johnson, A. Martin, W. B. Wei, H. J. Cooper, B. P. Lyons and S. W. Feist (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., T. Chouvelon, Y. Aminot, J. Couteau, G. Loppion, L. Dégrémont, J.-B. Lamy, F. Akcha, J. Rouxel, C. Berthelin, T. Briaudeau, U. Izagirre, A. Mauffret, A. Grouhel and T. Burgeot (2022). "Differences in chemical contaminants bioaccumulation and ecotoxicology biomarkers in *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis* and their hybrids." *Environmental Pollution* **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., L. Ingenbleek, A. Adegboye, S. E. Hossou, A. Z. Kone, A. D. Oyedel, C. Kisito, Y. K. Dembele, R. W. Hu, I. A. Malak, R. Cariou, A. Venisseau, B. Veyrand, P. Marchand, S. Eyangoh, P. Verger, G. Dervilly-Pinel, J. C. Leblanc and B. Le Bizec (2020). "Levels of persistent organic pollutants (POPs) in foods from the first regional Sub-Saharan Africa Total Diet Study." *Environment International* **135**.DOI: 10.1016/j.envint.2019.105413.

Vethaak, A. D., I. M. Davies, J. E. Thain, M. J. Gubbins, C. Martinez-Gomez, C. D. Robinson, C. F. Moffat, T. Burgeot, T. Maes, W. Wosniok, M. Giltrap, T. Lang and K. Hylland (2017). "Integrated indicator framework

and methodology for monitoring and assessment of hazardous substances and their effects in the marine environment." Marine Environmental Research **124**: 11-20.DOI: 10.1016/j.marenvres.2015.09.010.

Viarengo, A., D. Lowe, C. Bolognesi, E. Fabbri and A. Koehler (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., A. Arini and C. Gourlay-Francé (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., L. W. Clausen and G. N. Chonchúir (2019). "Handbook of fish age estimation protocols and validation methods." ICES Cooperative Research Report.DOI: <https://doi.org/10.17895/ices.pub.5221>.

Wessel, N., R. Santos, D. Menard, K. Le Menach, V. Buchet, N. Lebayon, V. Loizeau, T. Burgeot, H. Budzinski and F. Akcha (2010). "Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*)." Marine Environmental Research **69**: S71-S73.DOI: 10.1016/j.marenvres.2010.03.004.

Zorita, I. and N. Cuevas (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. 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-dessous.

Lipides totaux

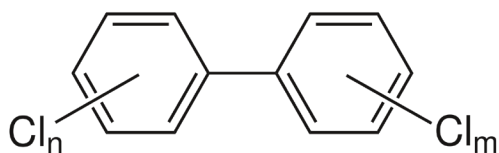
La matière extractible aux solvants organiques (proxy des lipides totaux) a été déterminée par méthode gravimétrique après extraction accélérée par solvant (ASE, Dionex) par un mélange de solvants (hexane/acétone 80%/20%) et séchage à l'étuve à 50°C jusqu'à poids constant. Les résultats sont exprimés 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 μ m 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 ^{13}C .

PFAS

Une quantité de 0,2 g de lyophilisat est extraite après ajout d'étalons de rendement marqués au ^{13}C 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/ammoniacque (99.5/0,5 v/v). Enfin les échantillons subissent une purification sur colonne SPE EnviCarb (Supelco® Envi Carb, 500 mg, 6 mL) avec élution par un mélange méthanol/acide acétique (80/1 v/v). L'analyse quantitative des PFAS 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 μ m 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 80% (^{13}C -PCB 52) et 97% (^{13}C -PCB 138)
LQ moyennes : inférieures à 158 pg/g ps (PCB 153)
Blancs moyens : inférieurs à 74 pg/g ps (PCB 153)
Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -20% (PCB 28) et +16% (PCB 138)

OCP

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 72% (^{13}C -op'DDD) et 122% (^{13}C - β -HCH)
LQ moyennes : inférieures à 24 pg/g ps (dieldrin)
Blancs moyens : inférieurs à 11 pg/g ps (dieldrin)
Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -11% (pp'DDE) et +35% (pp'DDT)

BFR

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 71% (^{13}C -PBDE 183) et 87% (^{13}C -PBDE 153)
LQ moyennes : inférieures à 6 pg/g ps (PBDE 47)
Blancs moyens : inférieurs à 3 pg/g ps (PBDE 47)
Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -14% (PBDE 183) et +12% (PBDE 47)

PFAS

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 50% (^{13}C -PFTeDA) et 87% (^{13}C -PFNA)
LQ moyennes : inférieures à 71 pg/g ps (PFHxA)
Blancs moyens : inférieurs à 58 pg/g ps (PFHxA)
Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre -44% (PFHxA) et +23% (PFTeDA)

HBCDD

Rendements moyens des composés isotopiquement marqués : entre 70% (^{13}C - γ -HBCDD) et 87% (^{13}C - α -HBCDD)
LQ moyennes : inférieures à 12 pg/g ps (γ -HBCDD)
Blancs moyens : inférieurs à 6 pg/g ps (γ -HBCDD)
Justesse sur matériau de contrôle qualité interne : entre +2% (β -HBCDD) et +5% (γ -HBCDD)

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

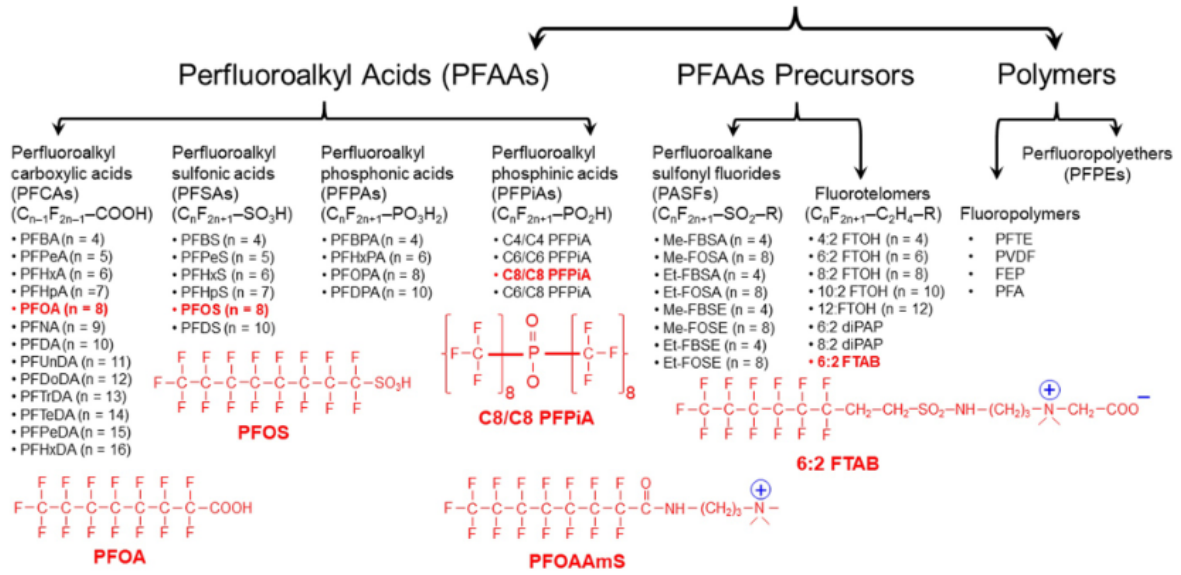


Figure 1. Per- and polyfluoroalkyl substances (PFASs) family tree including perfluoroalkyl acids (PFAAs), PFAA precursors (e.g., perfluoroalkane sulfonyl fluorides and fluorotelomers), and polymers (e.g., fluoropolymers and perfluoropolyethers). PFAAs include perfluoroalkyl carboxylic acids, perfluoroalkyl 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.

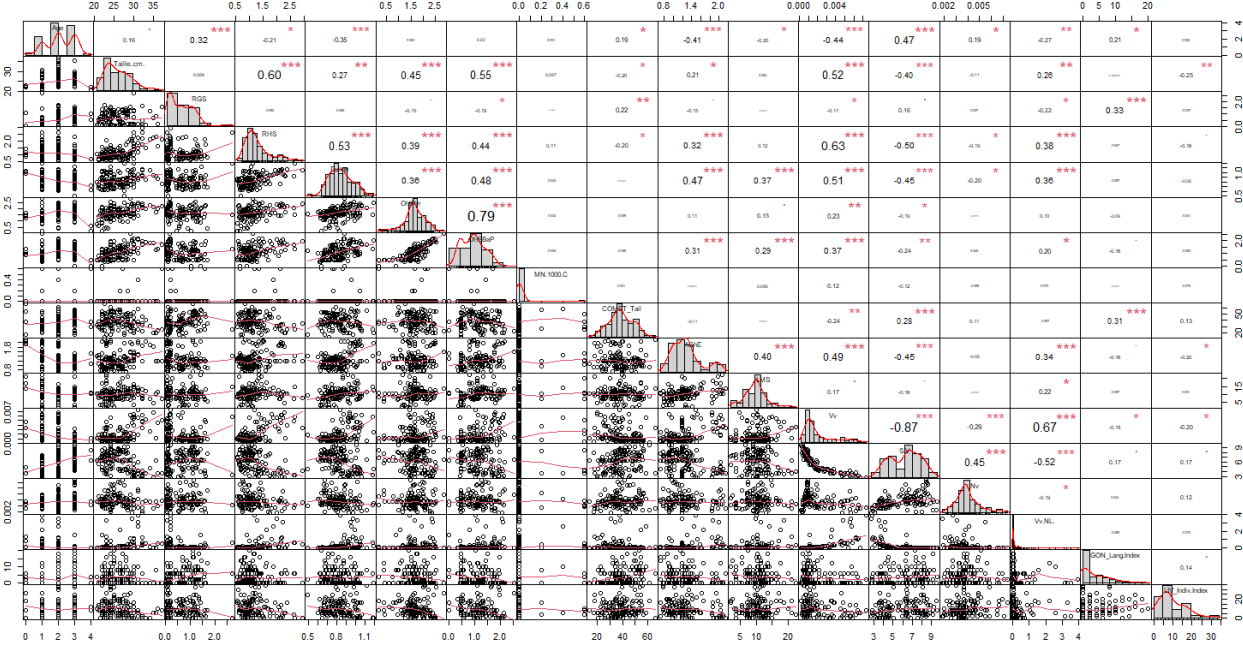
Figure 30- PFAS Extrait de (Lyu et al., 2022)

Annexe 2. MM Contaminants inorganiques (Ifremer, RBE/CCEM/ LBCM)

Hg. Les concentrations en mercure total (Hg) dans les muscles de poissons 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 : DORM-4 (protéines de poissons, National Research Council Canada/NRCC) et IAEA-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 poissons 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). 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 : 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) ou encore le zinc (Zn). Les concentrations en tous les éléments autres que le Hg (voir ci-dessus) 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 \pm 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, NRCC) et DORM-4 (protéine de poisson, NRCC). Les éléments gardés (voir section 2.5.1) avaient des taux de recouvrement des MRC satisfaisants par rapport aux attentes de la méthode, i.e. compris entre 70 et 130% (soit un écart de moins de 30% par rapport à la valeur certifiée). Enfin, avec cette méthode, les limites de quantification (LOQ) pour une prise d'essai moyenne de 200 mg ps étaient de 0,0004 mg/kg ps pour Ag, 0,001 mg/kg ps pour Cd, 0,002 mg/kg ps pour Co, 0,104 mg/kg ps pour Cr, 0,57 mg/kg ps pour Cu, 0,739 mg/kg ps pour Fe, 0,033 mg/kg ps pour Li, 0,019 mg/kg ps pour Mn, 0,003 mg/kg ps pour Mo, 0,062 mg/kg ps pour Ni, 0,019 mg/kg ps pour Pb, 0,0003 mg/kg ps pour Tl, 0,002 mg/kg ps pour U, 0,025 mg/kg ps pour V et 2,4 mg/kg ps pour Zn.

Annexe 3. Complément aux analyses statistiques



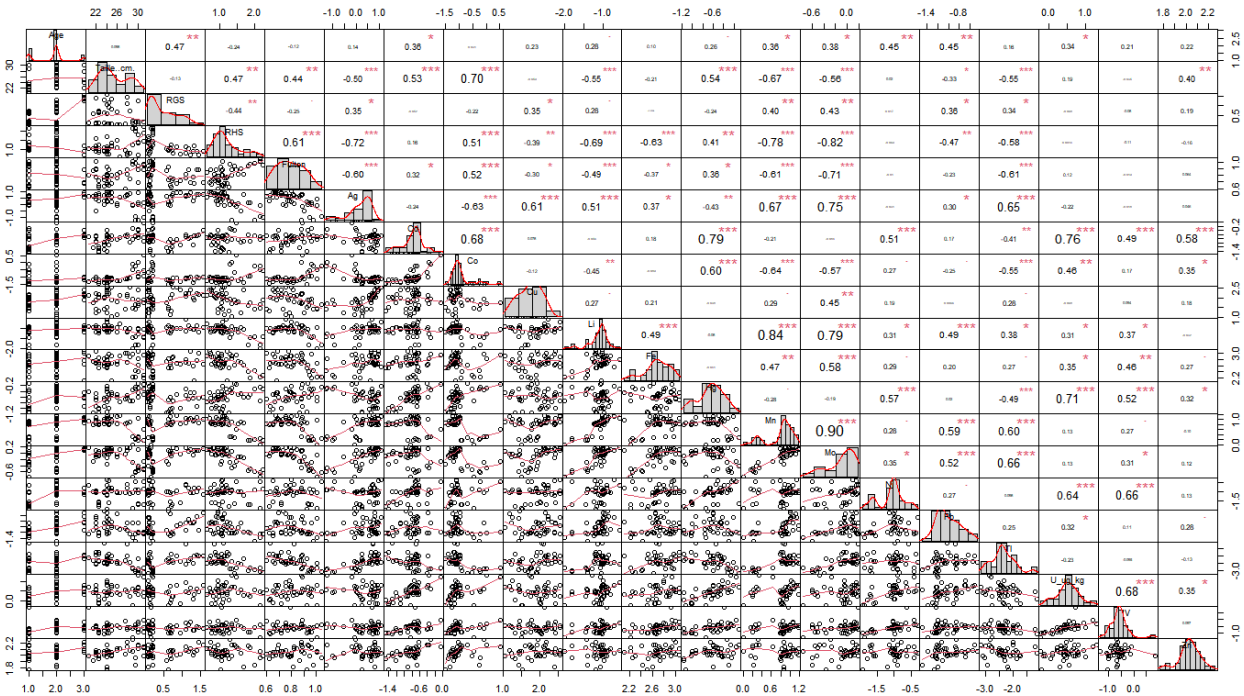
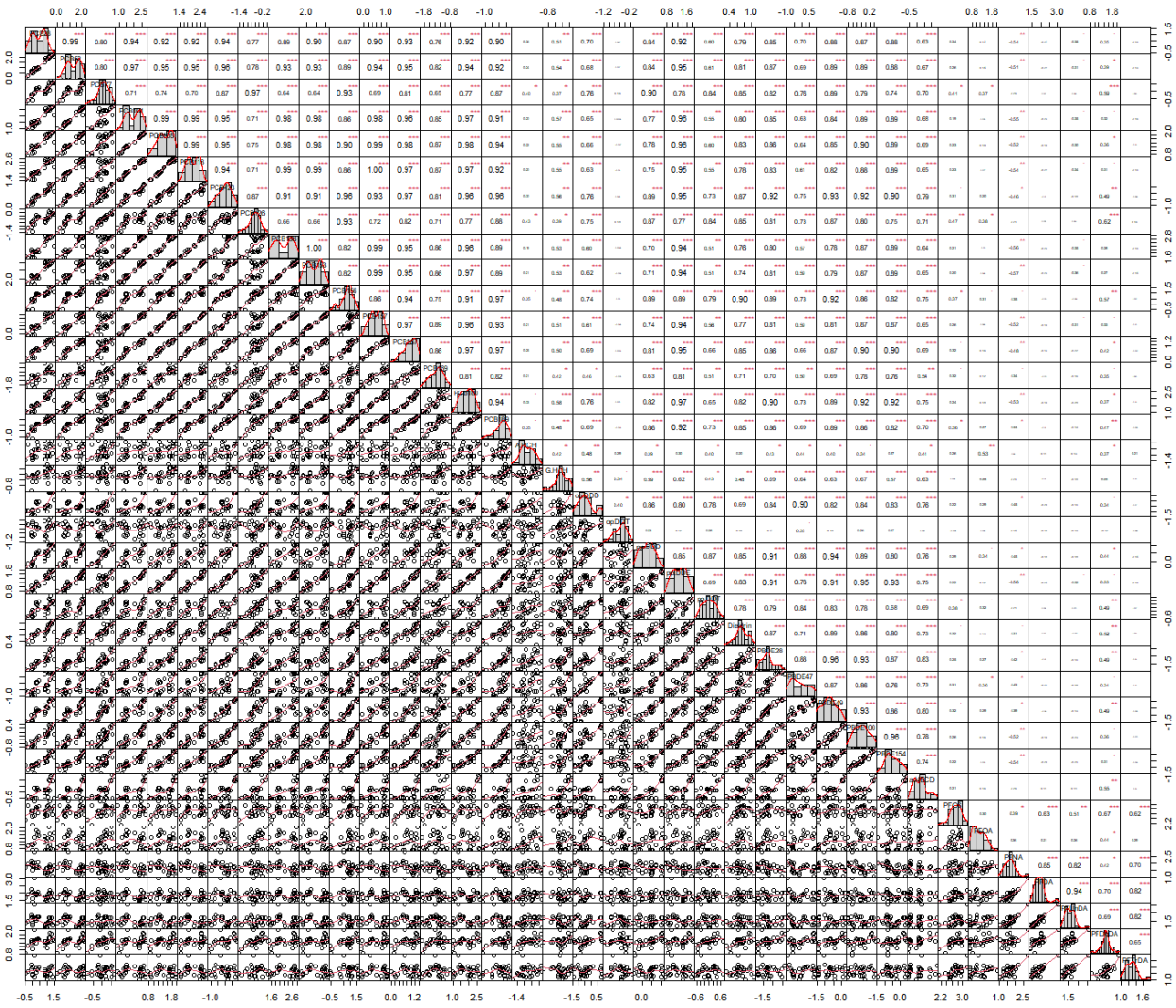


Figure 31 - Corrélations de Pearson pour les biomarqueurs, les contaminants organiques et ETM quantifiés dans une majorité d'échantillons de poissons collectés lors de la campagne SELIMANCHE 2021 et p-value associé. Les données de concentrations sont log-transformées et normalisées 1) par les lipides pour les contaminants hydrophobes (PCB, OCP, PBDE), 2) en poids frais pour les PFAS ou 3) en poids sec pour les ETM. Ordre des substances pour le chart « organique » : PCB28, PCB52, PCB77, PCB101, PCB105, PCB118, PCB123, PCB126, PCB138, PCB153, PCB156, PCB157, PCB167, PCB169, PCB180, PCB189, A.HCH, G.HCH, op.DDD, op.DDT, pp.DDD, pp.DDE, pp.DDT, PBDE28, PBDE47, PBDE49, PBDE100, PBDE154, α .HBCD, PFOS, PFOA, PFNA, PFDA, PFUnDA, PFDoDA, PFTrDA, PFTeDA.

Tableau 26 – Pourcentage de variance expliqué par les 2 premiers axes et scores des variables sur ces axes pour les ACP discutées et capacité d'ajustement de variables environnementales (Station) ou biologiques (Espèce, Age, Sexe) sur le modèle de l'ACP (Figure 20). Les ACP sont menées par groupe de variables : biomarqueurs, ETM et contaminants organiques et par groupe d'espèce : flet + sole, flet ou sole. Les ACP sont centrées-réduites. Les individus sont âgés de 0 à 3 ans (i.e. < 4 ans). Les cellules en gris/vert ont une abscisse > 0,5 ou < -0,5 sur l'axe discriminant la zone (gris : réponse plus altérée en Seine, vert : réponse plus altérée en Somme). Les cellules en bleu/jaune ont une abscisse > 0,5 ou < -0,5 sur l'axe discriminant les espèces (bleu : réponse plus altérée chez la sole, jaune : réponse plus altérée chez le flet). En gras, les variables ayant une abscisse > 0,5 ou < -0,5 sur un axe dont aucune corrélation avec une variable environnementale (Station, Zone) ou biologique (Espèce, Age, Sexe) n'est identifiée.

Biomarkers		ETM (dry weig ht)						Organic contaminants (lipid weight except PFAS: wet weight)													
		F+S N=136		Flounder N=37		Sole N=99		F+S N=44		Flounder N=10		Sole N=34		F+S N=30		Flounder N=10		Sole N=20			
Axe		PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2	PC1	PC2		
Proportion Explained per axe		0,29	0,14	0,22	0,12	0,22	0,15	0,35	0,29	0,52	0,22	0,41	0,17	0,55	0,26	0,64	0,23	0,53	0,26		
Scores																					
	OHPyr	0,79	-1,33	-1,13	0,42	0,92	-1,10	Ag	1,09	0,14	-0,12	0,77	-0,28	-1,01	PCB28	-1,12	-0,01	-0,75	0,12	-1,02	0,09
	OH9BaP	1,04	-1,35	-1,12	0,35	1,18	-0,99	Cd	-0,43	-1,10	0,80	0,14	-1,09	0,00	PCB118	-1,12	-0,02	-0,86	0,14	-1,02	0,13
	MN.1000.C	0,23	0,44	0,02	-0,16	-0,21	0,37	Co	-0,97	-0,62	0,65	-0,28	-0,95	-0,32	PCB153	-1,11	-0,06	-0,85	0,18	-1,02	0,08
	COMET_Tail	-0,62	-0,35	0,71	-0,44	0,77	-0,06	Cu	0,57	-0,17	0,50	0,42	-0,32	0,95	pp.DDE	-1,16	-0,01	-0,86	0,09	-1,04	0,06
	AChE	1,18	-0,09	0,57	0,35	0,15	-0,05	Fe	0,66	-0,57	0,77	0,23	-0,39	-0,27	Dieldrin	-1,01	0,29	-0,85	-0,02	-0,80	0,44
	LMS ¹	0,71	-0,53	0,97	0,00	0,76	-0,63	Hg	-0,58	-1,00	0,71	-0,30	-0,97	0,25	G.HCH	-0,76	0,05	-0,71	0,38	-0,50	0,00
	Vv ¹	1,63	0,36	-0,51	-1,05	-1,13	-1,00	Li	1,02	-0,42	0,70	0,00	-0,70	0,37	PBDE49	-1,10	0,22	-0,86	0,14	-0,94	0,28
	S.V ¹	-1,53	-0,57	0,36	1,18	1,20	0,95	Mn	1,21	-0,21	0,81	-0,03	-0,84	0,35	PBDE100	-1,14	0,07	-0,84	0,17	-1,02	0,08
	Nv ¹	-0,66	-0,86	0,12	0,86	0,69	0,19	Mo	1,21	-0,34	0,79	0,31	-0,92	-0,53	PBDE154	-1,12	0,01	-0,85	0,19	-0,98	-0,01
	Vv.NL. ¹	1,23	0,35	-0,06	-0,78	-0,93	-0,46	Ni	0,20	-1,00	0,57	-0,54	-0,98	-0,06	PFOS	-0,27	0,90	0,66	0,46	-0,26	0,86
	GON_Lang.Index	-0,59	0,00	0,51	-0,26	0,23	0,21	Pb	0,64	-0,44	0,45	0,60	-0,62	0,50	PFOA	-0,18	0,55	0,31	0,69	-0,06	0,32
	LIV_Indiv.Index	-0,51	-0,33	0,41	0,00	0,23	-0,45	Tl	0,98	0,27	-0,03	0,24	0,18	-0,71	PFNA	0,68	0,88	0,62	0,47	0,67	0,78
								U	-0,10	-1,19	0,80	-0,19	-1,04	0,38	PFDA	0,30	1,09	0,31	0,75	0,40	0,95
								V	0,18	-1,00	0,76	-0,38	-0,80	0,17	PFUnDA	0,38	1,05	0,46	0,67	0,56	0,85
								Zn	1,09	0,14	0,34	0,76	-0,77	-0,29	PFDODA	-0,41	1,03	-0,33	0,70	-0,08	1,00
Goodness of fit for each PCA		r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p		
	Species	0,36	0,001	na	na	na	na	Species	0,46	0,001	na	na	na	na	Species	0,14	0,01	na	na	na	na
	Station	0,44	0,001	0,38	0,001	0,32	0,001	Station	0,28	0,002	0,46	0,01	0,36	0,001	Station	0,55	0,00	0,47	0,01	0,66	0,001
	Age	0,19	0,001	na	na	0,16	0,002	Age	0,14	0,014	na	na	0,22	0,01	Age	0,08	0,11	na	na	na	na
	Sexe	0,10	0,001	0,00	0,99	0,01	0,32	Sexe	0,14	0,003	0,00	1,00	0,01	0,75	Sexe	0,07	0,16	na	na	0,02	0,74

¹ Pour ces ACP, une réponse plus élevée des paramètres des lysosomes est considérée comme défavorable/altérée, sauf pour la LMS et S/V, pour lesquelles une réponse plus faible est considérée comme défavorable/altérée.

