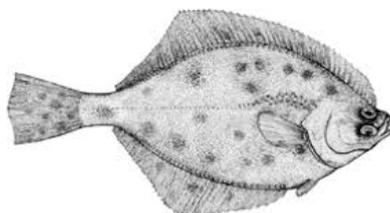




Rapport final sur le Projet : POPEST

(1^{er} Juillet 2021)

Marqueurs de vulnérabilité de populations de flet identifiés par la protéogénomique : de nouveaux outils pour estimer l'état écologique des systèmes estuariens



Vianney PICHEREAU, Jennifer LAURENT, Elodie BORCIER, Jean LAROCHE

Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin

LEMAR - UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer

Institut Universitaire Européen de la Mer, Plouzané



1) Contexte général et principaux objectifs du projet POPEST

La qualification de l'état écologique des estuaires, en réponse aux préconisations de la DCE, demeure un exercice très difficile en Europe, de par la complexité de ces écosystèmes qui présentent notamment une variabilité temporelle naturelle forte des paramètres hydromorphologiques, physico-chimiques et biologiques. Par ailleurs ces hydrosystèmes présentent une anthropisation massive se traduisant par des modifications profondes de l'habitat tant physique que chimique, depuis plus d'un siècle.

A l'échelle locale des estuaires, l'anthropisation se traduit notamment par :

- une perte des habitats intertidaux liés aux aménagements portuaires et à la canalisation pour la navigation
- une modification des régimes hydriques liée à des régulations hydrauliques en amont
- un risque chimique lié à la remise en suspension des polluants par le dragage, par les rejets des effluents domestiques et industriels, et par la pollution diffuse liée au drainage des bassins versants (pesticides d'origine agricole, pollution d'origine routière...)
- une eutrophisation des eaux induite par un excès de nitrates produit par les stations d'épuration et les activités agricoles, conduisant à une surproduction d'algue verte, un dérèglement de la production en phytoplancton et micro-phytobenthos, et au final à la dégradation de la matière organique par les bactéries, aboutissant à un risque hypoxique.

A l'échelle globale, sous l'impact des changements climatiques, les estuaires sont fortement exposés à d'autres facteurs de forçage :

- des épisodes de stress thermique en saison estivale
- le stress croissant lié aux rayonnements UV
- une modification profonde des débits fluviaux, avec une augmentation de la fréquence des épisodes de crue et/ou d'étiage sévère, et globalement une salinisation plus poussée des systèmes estuariens en Europe.

Les estuaires sont donc soumis à un multistress qui peut potentiellement impacter fortement leur fonctionnement écologique. Il est donc devenu illusoire de rechercher des systèmes estuariens dits

« témoins » (ie peu impactés par les effets du multistress) et considérés comme les référentiels d'un « bon état écologique ». Il devient donc d'un intérêt majeur de pratiquer le monitoring des systèmes estuariens pour suivre leur évolution temporelle, et diagnostiquer la dégradation, le maintien ou la restauration de leur état écologique au cours des prochaines décennies. La démarche comparative multi-estuaire sera aussi d'un intérêt majeur pour affiner nos connaissances sur la pertinence de différents indicateurs (hydro-morpho-sédimentaires, physico-chimiques et biologiques) sur le fonctionnement-disfonctionnement écologique de systèmes estuariens présentant des environnements contrastés.

Depuis 2000, le Laboratoire LEMAR s'est fortement impliqué dans de nombreux travaux sur la réponse d'un poisson plat (le flet : *Platichthys flesus*) aux stress environnementaux, dans une grande diversité d'estuaires sur la façade atlantique française, mais aussi en Angleterre et au Portugal. Rappelons que le flet réalise la plus grande partie de son cycle biologique en estuaire (Fig. 1), dans les milieux oligohalins (petits juvéniles et grands juvéniles), comme mésahalins (grands juvéniles et subadultes) et polyhalins (subadultes et adultes). Le pic de la période de reproduction pour cette espèce est classiquement observé en février, avec un regroupement des flets adultes en ponte à l'embouchure des estuaires (Fig. 1); les larves pélagiques issues de cette reproduction se métamorphosent en juvéniles qui sont principalement recrutés dans les estuaires de la façade atlantique française au mois de mai, pour une taille de 2 à 3 cm (Masson 1987, Gallien-Landriau 2003).

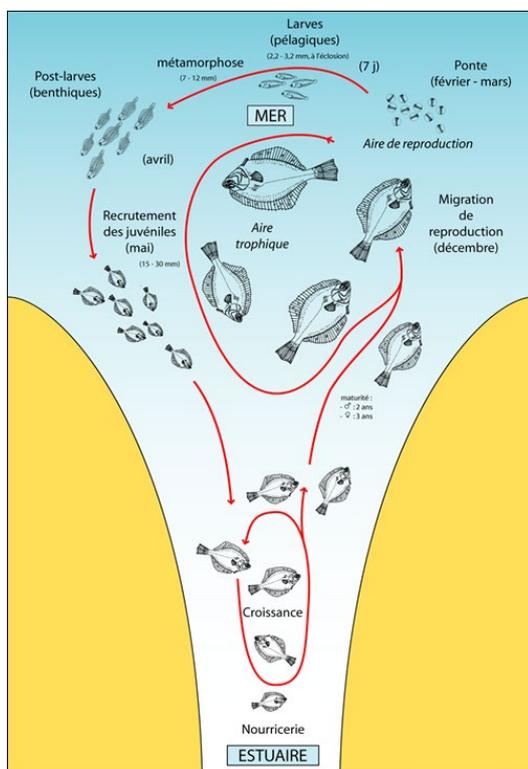


Fig.1 Cycle de vie du flet (*Platichthys flesus*) sur les côtes atlantiques françaises

Le flet est considéré en Europe comme une espèce sentinelle d'intérêt majeur pour évaluer la qualité des milieux estuariens (Koehler 2004; Kleinkauf et al. 2004a; Marchand et al. 2004; Broeg et al. 2005; Evrard et al. 2010; Williams et al. 2011; Henry et al. 2012; Kerambrun et al. 2013; Laroche et al. 2013 ; Capela et al. 2016; Dabrowska et al. 2017; Borcier et al. 2020).

Dans un contexte résolument multi-estuaire, le LEMAR a ainsi développé des travaux en Biologie des Populations de flet, en intégrant les réponses moléculaires, les traits physiologiques, les traits d'histoire de vie, la capacité d'acclimatation face au multistress et les approches démo-génétiques, pour aller vers une évaluation du niveau de vulnérabilité des populations ; notre démarche se plaçant à l'interface entre l'écologie du stress et la biologie de l'adaptation - vulnérabilité.

Dans le cadre du projet POPEST, nous explorons désormais le potentiel de nouvelles méthodologies dites « -omiques » pour rechercher de nouveaux gènes et protéines candidats en lien avec les réponses du flet aux stress estuariens. Ces nouvelles technologies sont mises en œuvre dans notre équipe au niveau de la protéo-génomique (ie un couplage entre les approches haut débit de Transcriptomique et Protéomique) ; ces méthodes novatrices permettent d'identifier sans a priori des milliers de gènes-protéines candidats en une seule analyse par individu ; Les molécules exprimées différemment suivant la nature des stress environnementaux, et en lien avec la fitness des individus, pourront être retenues comme indicateurs fonctionnels de la population estuarienne. Cette approche pourrait contribuer de manière majeure au suivi de la qualité écologique :

- de grands estuaires souvent impactés par des mélanges complexes de micropolluants d'origine multiple
- comme de petits estuaires présentant des stress de natures plus spécifiques (cocktails polluants moins complexes, bassins versants souvent à dominante agricole caractérisés par une contamination diffuse par les pesticides et par des charges en nitrates contrastées).

Ce rapport du LEMAR fait donc un bilan final sur les trois années d'activités de notre équipe dans le cadre du projet POPEST ; il suivra le plan suivant :

Chpt 2. Pertinence de l'approche en protéomique sur le flet, pour diagnostiquer l'état écologique d'un grand estuaire à micro-échelle (le cas de la Seine)	Page 6
Chpt 3. Approche multi-estuaire sur l'écologie du stress dans les petits systèmes estuariens (Hydrobiologie - Signatures chimiques et biologiques sur le flet)	Page 8
Chpt 4. Pertinence de l'approche protéo-génomique sur le flet, dans les petits estuaires	Page 31
Chpt 5. Intégration de l'approche multidisciplinaire (Hydrobiologie / Biologie du flet / Géographie des bassins versants) pour le diagnostic écologique des petits estuaires	Page 38
Chpt 6. Perspectives en termes de recherche en écologie du stress, et de production d'indicateurs de la qualité écologique des milieux estuariens	Page 44
Chpt 7. Travaux, publications et communications réalisés dans le cadre du projet POPEST	Page 46
Chpt 8. Bibliographie	Page 47

2) Pertinence de l'approche en protéomique sur le flet, pour diagnostiquer l'état écologique d'un grand estuaire à micro-échelle (le cas de la Seine)

Les approches de protéomique globale permettent, en une expérience, de visualiser l'ensemble des protéines présentes dans un échantillon. Nous avons développé ce type d'approches au laboratoire depuis une dizaine d'année pour caractériser l'impact des conditions environnementales, notamment sur le flet, par des approches basées sur l'électrophorèse 2-D (Galland et al. 2013 ; 2015), puis des approches exploitant les dernières avancées technologiques en spectrométrie de masse (ie. « Shotgun proteomics », Pédrón et al., 2017). Au démarrage du projet POPEST, il nous est apparu important d'effectuer une expérimentation (in situ) sur un système pour lequel nous avons déjà des données : la Seine. Nous avons un double objectif : (i) évaluer la pertinence de cet outil de protéomique à haut débit pour l'évaluation de l'état écologique des estuaires, et évaluer la pertinence d'une approche de transplantation/encagement ('caging') des poissons afin de limiter la variabilité de ces expériences.

Dans ce contexte, nous avons prélevé des flets dans l'estuaire de la Canche, qui est considéré comme référence dans de nombreuses études, et les avons encagés dans deux sites de l'estuaire de la Seine Rouen et Fosse Nord (et bien sûr dans l'estuaire de la Canche en référence). Les poissons sont restés encagés pendant 1 mois, avant d'être récupérés, disséqués, et analysés. Dans le même temps, le site d'encagement a fait l'objet d'une analyse physico-chimique complète incluant des mesures de température, salinité, et le dosage de polluants métalliques et organiques dans les sédiments. Nous avons en outre caractérisé la croissance (indice de condition) et la génotoxicité sur les poissons. Les résultats obtenus ont été publiés dans la revue internationale *Science of the Total Environment* (Borcier et al., 2019). Ils ont montré la pertinence de l'approche de protéomique à haut débit dans le contexte d'évaluation environnementale, mais également les limites de la stratégie d'encagement.

2.1) Pertinence de l'approche protéomique

Les trois sites étudiés (Rouen, Fosse Nord et Canche) ont montré des niveaux de contamination par les xénobiotiques métalliques et organiques très contrastés, contraste révélé à la fois par les approches directes (dosages) et les signatures protéomiques révélant une physiologie hépatique très différente dans les poissons encagés. De fait, nous avons pu voir des perturbations majeures du métabolisme cellulaire dans les poissons encagés dans l'estuaire de la Seine, et des protéines de détoxification des xénobiotiques. De fait, quasiment tous les systèmes de détoxification des xénobiotiques organiques caractérisés à ce jour étaient positivement dérégulés dans les poissons encagés dans les poissons

encagés sur le site de Rouen, montrant le haut niveau de contamination de ce site, par une multiplicité de xénobiotiques organiques. Il faut noter que ce site particulier est situé environ 2 Km en aval du lieu où l'accident de l'usine de produits chimiques Lubrizol est survenu le 26 septembre 2019. Dans l'optique d'évaluer l'impact environnemental de cet accident, nous avons réalisé un nouvel encagement en novembre 2019, exactement dans les mêmes conditions que précédemment (cette dernière expérience a été réalisée dans le cadre d'un financement provenant du GIP Seine-Aval). Nous avons analysé le protéome hépatique des poissons, et ainsi pu comparer les résultats à ceux que nous avons obtenu précédemment (l'analyse complète figure dans le document : Fisson et al., 2020).

2.2) Pertinence de la stratégie d'encagement pour l'évaluation environnementale des estuaires

Dans cette étude, nous testions pour la première fois une stratégie basée sur la transplantation d'animaux prélevés dans un estuaire de référence, et leur encagement en différents sites d'un estuaire d'intérêt. Il était également important d'évaluer la pertinence de cette approche, en évaluant les modifications de physiologie induites, précisément, par l'encagement. Nous avons pour cela développé une approche de protéomique comparative, entre des poissons prélevés *in natura* dans la Canche, et les poissons encagés dans ce même estuaire.

Le principal intérêt que nous attendions de notre stratégie de transplantation/encagement, était de gommer la part de variabilité due à (i) la possible hétérogénéité génétique des poissons dans les différents estuaires, et (ii) l'hétérogénéité environnementale intrinsèquement liée au milieu estuarien. Réciproquement, les risques principaux liés à cette approche étaient (i) d'introduire un stress supplémentaire lié au confinement des poissons dans la cage, et (ii) d'analyser finalement seulement le micro-environnement dans lequel sont placées les cages... ie. De perdre en quelques sortes une dimension intégrative, liée au fait que les poissons en se déplaçant dans l'estuaire, intègrent dans leur physiologie tous les stress rencontrés. De fait, les résultats obtenus ont montré que la physiologie des poissons encagés dans l'estuaire de la Canche reflétait effectivement le micro-environnement d'encagement, avec notamment la révélation d'un stress thermique que nous n'attendions pas. Ainsi, bien que cette stratégie se soit révélée extrêmement pertinente et informative pour l'estuaire de la Seine (l'analyse de l'impact de l'accident Lubrizol en est un exemple concret), nous avons décidé, pour l'analyse des petits systèmes estuariens bretons, de rester sur une approche *in natura* permettant de conserver cette dimension intégrative.

3) Approche multi-estuaire sur l'écologie du stress dans les petits systèmes estuariens (hydrobiologie - signatures chimiques et biologiques sur le flet)

3.1) De la biosurveillance active à la biosurveillance passive

Dans le chapitre précédent (2), **l'expérience de biosurveillance active de type « caging » sur la Seine** a permis d'analyser les réponses biologiques du poisson dans différents environnements, en plaçant dans les sites expérimentés des individus aussi « homogènes » que possible, ceci devant faciliter la comparaison des réponses inter-sites. Cette approche visait à explorer l'état écologique d'un milieu sur le fonctionnement physiologique du poisson, à l'échelle des micro-habitats. Ainsi, notre étude a mis en évidence le caractère fortement pollué d'un site amont Seine (Rouen) vs un site aval Seine (Fosse Nord), à travers notamment la sur-activation des processus de détoxification suite à un mois d'encagement. La biosurveillance active chez le flet est donc a priori très pertinente pour appréhender la qualité écologique des habitats estuariens à micro-échelle. Notons que l'approche en protéomique haut-débit (dite shotgun), mise en œuvre sur les foies des flets expérimentés en caging, s'est révélée particulièrement efficace pour identifier et quantifier par individu plusieurs centaines de protéines ; elle a ainsi permis d'explorer la nature du stress lié à chaque site, et les réponses biologiques du poisson aux niveaux de nombreuses voies métaboliques.

Une deuxième approche, de type biosurveillance passive, a été développée dans les milieux estuariens de petites tailles ; elle se propose de déterminer le niveau de vulnérabilité des populations naturelles (ie prélevées dans leur habitat), pour caractériser l'état écologique de ces systèmes estuariens. Cette approche vise à explorer le potentiel d'une espèce ou de populations à se maintenir dans un environnement changeant. Ce maintien dépend de la plasticité phénotypique de l'espèce, mais aussi de ses capacités adaptatives face aux fluctuations de l'environnement. Ainsi, il apparaît essentiel de déterminer cette vulnérabilité en s'appuyant sur les variations phénotypiques de l'espèce qui permettent une certaine plasticité au niveau populationnel, mais aussi sur des variations génotypiques qui peuvent refléter des processus d'adaptation. Nous avons vu précédemment que le flet est une espèce sentinelle d'intérêt majeur, de par son cycle de vie résolument estuarien. La comparaison des réponses individuelles et populationnelles du flet dans des environnements présentant des niveaux de stress contrastés (chimique, thermique, hypoxique...) doit donc nous

permettre de déterminer le niveau de vulnérabilité des populations. Mais cela est-il suffisant pour caractériser l'état écologique de ces divers systèmes estuariens ?

La réponse des organismes du niveau individuel au niveau populationnel devrait être idéalement couplée aussi avec une bonne connaissance :

- sur le fonctionnement physico-chimique de l'écosystème estuarien (variations spatio-temporelles de la salinité, température, oxygène...),
- sur la distribution des différents habitats (oligohalins, méso et polyhalins), et sur la diversité des substrats,
- enfin sur les apports azotés et sur les principaux contaminants métalliques et organiques des eaux et des sédiments.

C'est donc la confrontation entre les données biologiques sur une espèce sentinelle et les caractéristiques de son environnement estuarien qui doit nous permettre d'aller vers une estimation de l'état écologique d'un estuaire. Nous suggérons que l'approche multi-estuaire est d'un intérêt majeur pour comparer les réponses du poisson en habitats contrastés ; l'une des difficultés de cette approche étant que l'on ne dispose pas généralement d'une typologie fine des différents stressseurs qui peuvent interagir dans les milieux estuariens.

Nous proposons donc d'intégrer dans cette nouvelle approche de biosurveillance passive dans les petits estuaires :

- des données hydrobiologiques sur les bassins-versants et estuaires d'intérêt (température, salinité, conductivité, pH, nitrites, nitrates,...) mesurées par notre équipe sur le terrain, et confrontées aux données historiques disponibles

- des approches chimiques et biologiques ciblées sur les populations naturelles de flet, indicatrices de la variabilité environnementale et des différents stressseurs propres à chaque estuaire (contaminants chimiques et éléments traces dans les tissus, isotopes stables, croissance journalière)

- des approches « omiques » sans a priori (protéomique et transcriptomique haut débit) sur les populations naturelles de flet pour identifier de nouveaux marqueurs moléculaires de réponse aux stress.

Au final, dans cette nouvelle approche de biosurveillance passive, nos objectifs seront : (1) caractériser le plus finement que possible différents environnements estuariens de petites tailles,

jusqu'à présent très peu étudiés au niveau national, (2) identifier les différents stressseurs interagissant au sein de chaque système, (3) mesurer l'impact du multi-stress sur la physiologie du poisson (4) explorer par la biologie moléculaire de nouvelles voies métaboliques mise en œuvre par le poisson pour répondre aux stress.

3.2) Spécificité des petits estuaires & choix des estuaires ciblés dans POPEST

Petits estuaires vs grands estuaires

Les petits estuaires présentent généralement des impacts anthropiques directes sur les habitats estuariens (remodelage des côtes, dragages, digues, pertes d'habitats intertidaux, modifications hydrauliques) assez limités, relativement à ceux observés dans les grands estuaires. Ceci se traduit généralement dans les petits systèmes par des altérations moins marquées des paramètres hydro-morpho-sédimentaires, par peu de pertes d'habitats essentiels, et donc par des fonctions trophiques a priori peu affectées par l'anthropisation. Par ailleurs, la zone méso-haline estuarienne à forte productivité biologique, habitat préférentiel de quelques rares espèces très plastiques comme le flet à l'état juvénile, est considérée comme la plus stressante pour de nombreuses espèces de poissons, par ses fortes fluctuations dans la salinité et l'hydrodynamisme (Teichert et al. 2017). La compétition inter-spécifique pour la nourriture dans la zone méso-haline est donc probablement très faible, et doit donc permettre au flet d'y trouver des conditions trophiques très favorables, particulièrement dans les petits estuaires.

Par ailleurs, les petits estuaires présentent une diversité en habitats pour le poisson plus faible relativement aux grands systèmes, de par notamment l'existence de gradients environnementaux plus limités (Elliott and Whitfield 2011, Vasconcelos et al. 2015). Au final une population de poisson dispose d'une plus faible diversité en habitats disponibles au sein d'un petit vs grand estuaire, ce qui se traduit par une variabilité inter-individuelle plus faible des réponses phénotypiques du poisson aux conditions environnementales dans les petits systèmes (Doubleday et al. 2015). Notons que cette variabilité phénotypique interindividuelle plus réduite du poisson au niveau intra-estuarien est un point majeur qui doit donc nous permettre de mieux ségréger les réponses biologiques du flet dans de petits systèmes estuariens à environnements contrastés.

Les estuaires de taille modérée présentent par ailleurs des cocktails polluants nettement moins complexes que les grands systèmes, la source majeure de contamination chimique étant

souvent liée aux activités agricoles, contrairement aux grands estuaires où les pollutions sont très souvent d'origine multiple (domestique, industrielle et agricole).

Stratégie d'échantillonnage en petits estuaires & collaborations sur le terrain avec différents acteurs intervenant sur le continuum bassin versant – estuaire

Notre stratégie a été ici :

- (1) de prélever des flets juvéniles *in natura* dans six petits estuaires (un dans le Pas de Calais, et cinq en Bretagne) en fin de saison estivale (Septembre - Octobre),
- (2) de décrire la situation hydrobiologique de ces systèmes, en se concentrant sur la zone de transition : exutoire du bassin-versant - estuaire,
- (3) de conduire des approches ciblées en chimie et biologie sur le flet (contaminants, isotopes, traits d'histoire de vie), pour explorer la nature des stressseurs et leur impact sur le poisson,
- (4) de mener une double approche « -omique » sans a priori (couplage RNAseq et protéomique shotgun) sur le flet pour identifier des voies métaboliques, des gènes et protéines impliqués dans la réponse du poisson aux stress environnementaux.

Le couplage entre ces différentes approches (hydrobiologie / chimie et biologie ciblées sur le flet / biologie moléculaire sans a priori sur le flet) doit nous permettre d'identifier les différents stressseurs interagissant dans chaque système estuarien, la réponse fine du poisson à ces stressseurs, et au final de caractériser l'état écologique des six estuaires d'intérêt.

Notre choix s'est orienté sur six estuaires de petites tailles (Fig. 2), avec les a priori suivants concernant leur «état écologique» :

- **Canche** (Pas de Calais) : a priori considéré comme peu stressé (bassin versant localisé en partie dans une réserve naturelle, avec cependant de grandes cultures céréalières dans sa partie amont et des activités portuaires et une marina pouvant être une source de pollution non négligeable). Pêche menée avec la collaboration du Laboratoire LOG de Wimereux.
- **Penzé & Horn** (Finistère) : systèmes stressés (situés en zone de production légumière intensive ; apports en intrants agricoles azote - pesticides probablement importants). Les pêches sur ces deux estuaires ont été conduites par le LEMAR, avec le soutien de l'AAPPMA de Morlaix et du

Syndicat Mixte du Haut Léon pour la Penzé, et la collaboration de l'AAPMA de Saint Pol de Léon pour l'Horn.

- **Aven** (Finistère) : estuaire a priori peu stressé, le bassin versant étant a priori modérément anthropisé. Pêche menée par le LEMAR.
- **Scorff** (Morbihan) : estuaire a priori peu stressé (rivière à saumon emblématique de la Bretagne). La pêche a été menée en collaboration étroite avec la Station de Contrôle des Migrateurs de l'INRA (Pont Croix), la Fédération de Pêche du Morbihan (FDPMA56) et la Société de Pêche de Plouay.
- **Noyal** (Golfe du Morbihan) : système stressé (une partie importante du bassin versant est localisée dans la zone artisanale de Vannes; pollution chimique probable; eutrophisation probable en été, lié à des stations d'épuration en limite de capacité). La pêche a été menée par le LEMAR en collaboration étroite avec la Réserve Naturelle des Marais de Séné.



Figure 2 : localisation géographique des 6 estuaires étudiés

3.3) Opérations de pêche sur les petits estuaires, prélèvements d'eau - dosages des nitrites et nitrates, prélèvements de tissus sur les flets

Dates de pêches, hydrobiologie

Tous les prélèvements ont été réalisés en estuaires du 26/9/18 au 15/10/18 ; 20 flets juvéniles (cohorte 0+ ; 7,5 cm < longueur totale du poisson < 10,5 cm) ont été capturés à marée basse dans la partie amont de la grande majorité des estuaires, là où la densité de flets juvéniles est généralement maximale (Tableau 1) ; les pêches étant pratiquées au chalut à main ou avec un appareil de pêche électrique portable.

Pour l'estuaire de Noyal, des opérations de pêches ont été menées de plus dans la partie aval de l'estuaire par un chalut à perche tracté par bateau. Cette partie aval visiblement très eutrophisée et présentant un chenal comblé en grande partie par des algues vertes, nous a conduit à une capture limitée à 3 poissons du fait du colmatage rapide du chalut avec la biomasse algale, rendant l'engin de pêche peu opérant (Tableau 1).

A basse mer, différents paramètres physico-chimiques ont été mesurés sur l'eau par une mallette portable (température, salinité) ; par ailleurs, des échantillons d'eau ont été prélevés puis filtrés sur le terrain, puis mis en congélation, pour des analyses ultérieures de nitrites et nitrates réalisées au laboratoire Lemar.

Tableau 1. Echantillonnage des 6 estuaires retenus dans le projet POPEST, avec les paramètres physico-chimiques mesurés

Estuaire	date de prélèvement	nb de filets prélevés	salinité à basse mer (g/L)	température eau (°C)	NO ₂ (mg/L)	NO ₃ (mg/L)
Noyal aval	09/10/2018	3	28,8	14,2	-	-
Noyal amont	09/10/2018	20	0,4	15	0,31	10,77
Scorff amont	01/10/2018	20	0	15	0,02	18,18
Aven amont	26/09/2018	20	3,8	12,8	0,01	22,17
Penzé amont	28/09/2018	20	0,2	13,5	0,17	39,78
Horn	27/09/2018	20	3,4	14,5	0,47	58,42
Canche amont	15/10/2018	20	0,5	13,5	0,1	25,99

Les salinités mesurées vont de 0 à 3,8 g/L, avec une exception pour Noyal aval qui présente une salinité élevée (28,8 g/L) ; la gamme de température de l'eau est assez étroite (12,8 °C < TP < 15°C). On remarque par contre une grande variabilité dans les concentrations de nitrite (NO₂) et nitrate (NO₃) selon les estuaires (Tableau 1). **Les estuaires de la Penzé et de l'Horn présentent des valeurs en NO₃ > 39 mg/L et en NO₂ > 0,17 mg/L élevées qui caractérisent un système de mauvaise qualité en terme d'apports azotés ; rappelons que des eaux en bon état écologique présentent des concentrations en nitrate < 10 mg/L.** La situation paraît meilleure pour les autres estuaires, les concentrations en nitrate étant < ou = 25 mg/L (Tableau 1). **On note des signatures atypiques pour Noyal amont, où la concentration en nitrate est faible et la concentration en nitrite forte (0,31 mg/L);** il est difficile dans cette première approche hydrobiologique de formuler des hypothèses pour interpréter ce déséquilibre atypique en NO₂/NO₃ au niveau de Noyal amont. Notons que de manière générale, les excès azotés en estuaires peuvent être potentiellement issus de diverses sources agricoles ou industrielles, voire reliés à un dysfonctionnement de stations d'épuration.

Prélèvements sur flets et sédiments

Après la mesure de la longueur totale et du poids total de chaque poisson sur le terrain, différents tissus ont été collectés pour de futures analyses menées au Laboratoire Lemar et sur différentes plateformes analytiques disponibles dans notre Institut (IUEM : Institut Universitaire Européen de la Mer, Plouzané) ; les poissons ont été disséqués sur de la glace.

- échantillons de muscle congelés à -20°C pour l'analyse des polluants métalliques et pour la mesure des isotopes stables: delta N15 & delta C13
- prélèvement d'otolithes conservés à sec pour l'analyse des éléments traces par ICPMS et pour la mesure des isotopes stables: delta O18 & delta C13
- certains otolithes ont été destinés à une inclusion dans la résine ; une coupe transversale passant par le nucleus a été réalisée par otolithe, puis a été polie pour atteindre une épaisseur de 100 microns. L'objectif est ici de lire la lame mince au microscope (x 400), pour estimer la largeur moyenne des incrémentations journalières en bordure d'otolithe, et estimer ainsi le croissance moyenne journalière du poisson.
- prélèvement du foie et congélation en azote liquide sur le terrain, pour les analyses moléculaires (transcriptomique et protéomique haut débit).

Les carcasses de flets après dissection ont aussi été récupérées et congelées, pour des analyses de polluants organiques (HAP et PCB) qui ont été menées au CEDRE (Brest), dans le cadre d'une collaboration avec le Service Recherche (Chef de Service : Stéphane Le Floch). Notons que le CEDRE a aussi réalisé des analyses de polluants organiques sur les sédiments des six estuaires.

3.4) Bilan hydrobiologique sur les estuaires, ces 20 dernières années

Il nous paraît pertinent d'analyser les données historiques disponibles sur l'hydrobiologie des bassins versants - estuaires du projet POPEST, pour diagnostiquer de possibles évolutions dans ces hydrosystèmes sur ces 20 dernières années. Nous avons ainsi travaillé sur les données :

- de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie disponibles sur internet, sur la Canche

- mises à notre disposition par la DREAL de Rennes (Laboratoire d'Hydrobiologie ; directeur : Yves-Marie HENO), sur les hydrosystèmes bretons.

Approche méthodologique pour l'analyse des séries temporelles hydrobiologiques

Un travail de sélection des différentes stations échantillonnées pour l'hydrobiologie a tout d'abord été nécessaire. Nous avons retenu quand cela était disponible par bassin versant, des stations :

- en eau douce (ED), en aval du bassin versant
- dans l'oligohalin (OH) : $0,5 < \text{salinité} < 5 \text{ g/L}$, en estuaire amont
- dans le mésohalin (MH) : $5 < \text{salinité} < 18 \text{ g/L}$, en estuaire médian
- dans le polyhalin (PH) : $18 < \text{salinité} < 30 \text{ g/L}$, en estuaire aval.

Il faut préciser ici que l'habitat majeur des flets juvéniles que nous ciblons pour le projet POPEST (classe 0+, $7 < \text{longueur totale du poisson} < 9 \text{ cm}$) se localise dans la zone de transition entre eau douce et eau marine, ie de l'aval du bassin versant (eau douce), au mésohalin. Nous avons par ailleurs retenu des stations qui présentaient une série temporelle de données hydrobiologiques suffisamment longue, si possible de 2000 à 2019. Les données ont été triées par Hydrosystème-Station-Variable, en se focalisant sur les variables hydrobiologiques les plus communes : Température de l'eau, pH, Salinité, conductivité 20°C, O2 dissous, Ammonium, Nitrite, Nitrate. L'objet est ici de développer une approche hydrobiologique multi-estuaire.

Notons que nous avons ainsi obtenu des données hydrobiologiques sur les 15 à 20 dernières années, sur 16 stations (Tableau 2) : **Canche** : Beutin (ED) / **Penzé** : Coat Toulzac'h Taulé (ED), Taulé 1 (ED), Taulé 2 (MH), Henvic (MH) / **Horn** : St Pol de Léon (ED) / **Aven** : Pont Aven (ED), 29AV18 (OH), 29AV03 (MH), 29AV01(PH) / **Scorff** : Pont Scorff 2 (ED), Pont Scorff 1 (ED), Scorff Quéven 2 (MH) / **Noyal** : Noyal Theix (MH), Noyal 1 (PH), Noyal 2 (PH).

Bilan synthétique sur l'évolution des paramètres hydrobiologiques

Tableau 2 : Bilan synthétique sur l'évolution des paramètres hydrobiologiques dans les six hydrosystèmes de POPEST, ces 20 dernières années. La couleur reflète le niveau actuel du paramètre (du vert à rouge : soit d'un bon état écologique vers un état préoccupant) ; le smiley reflétant l'évolution du paramètre ces deux dernières décennies (dégradation, stabilité, amélioration).

Estuaires	Stations	ED, OH, MH, PH	Températures hivernales minimales	Températures estivales maximales	pH	Salinité	Conductivité 20°C	O2 dissous	Ammonium	Nitrites	Nitrates	
Canche	Beutin	ED	A partir de 2007 plus douces > 7°C		Augmentation du pH. Avant 2007 : 7,5 < pH < 8. Après 2007 : 7,8 < pH < 8,2		1977-1989 : 450 < C < 550 µS/cm 2003-2009 : C=600 µS/cm	RAS O2 = 10 mg/L Saturation = 98 %	1978-2000 : Irrégulier avec des pics à 0,5-0,7 mg/L 2006-2018 : Faible < 0,2 mg/L	1978-2000 : Irrégulier avec des pics à 0,4 mg/L 2006-2018 : Faible < 0,2 mg/L	1978-2018 : Augmentation continue de 15 mg/L à 25-30 mg/L	ED = Eau Douce 0 psu
Penzé	Coat Touzac'h Taulé	ED					2007-2012 : 200 < C < 250 µS/cm			2000-2003 : de 0,1 à 0,5 mg/L 2004-2014 : < 0,1 mg/L	2000-2018 : Baisse significative 50 mg/L (2000) à 30 mg/L (2018)	MH = Mésohalin 5 – 18 psu
	Taulé 1	ED		TP estivales stables < 17°C			2000-2008 : C=200 µS/cm	Augmentation de 2000-2019 : de 9,5 mg/L à 10,5-11 mg/L Saturation de 90-95 % à 100 %	Stable < 0,25 mg/L	2000-2003 : de 0,1 à 0,6 mg/L 2015-2018 : de 0,05 à 0,25 mg/L	Baisse : 50 mg/L (2000) à 30 mg/L (2019)	PH = Polyhalin 18 – 30 psu
	Taulé 2	MH							2000-2013 : Peu variable 0,15 mg/L	2000-2003 : de 0,1 à 0,6 mg/L 2015-2018 : de 0,05 à 0,25 mg/L	Années 2000 : 40 à 50 mg/L 2011-2013 : 30 mg/L	
	Henvic	MH								2000-2013 : Peu variable 0,15 mg/L	Avant 2004 : entre 0,1 et 0,4 mg/L Baisse post 2004 : entre 0,05 et 0,2 mg/L	2002-2010 Parfois supérieur à 70 mg/L 2013-2017 : 50 mg/L
Horn	St Poi de Léon	ED					2009-2013 : 400 < C < 500 µS/cm 2014-2019 : C=400 voire 300 µS/cm	RAS O2 = 10 mg/L Saturation = 95%		Pas de tendance temporelle 2009-2019 : 0,10 mg/L à 0,60 mg/L	Baisse régulière 2009 : 80 mg/L 2019 : 65 mg/L	
Aven	Pont Aven	ED		2000-2006 : < 18°C			Stable entre 200 et 300 µS/cm		Faible		Stable 2000-2006 = 30 mg/L en moyenne	
	29AV18	OH	2007 = + douces > 8°C	Stables < 18°C	7 < pH < 8	De 0 à 10 g/L		Légère augmentation à partir de 2009 : 9-13 mg/L	Faible	Diminution depuis 2011 : de 0 à 0,05 mg/L	2000-2011 : 25-30 mg/L 2012 : 20 mg/L	
	29AV03	MH					Augmentation modérée à partir de 2011 : 15 g/L en moyenne	Légère augmentation à partir de 2009 : 7 < O2 < 12 mg/L	Faible		Baisse à partir de 2011 : entre 5 et 25 mg/L	
	29AV01	PH					Avant 2011 : 15 < S < 35 g/L Après 2011 : 25 < S < 35 g/L		Faible			
Scorff	Pont Scorff 2	ED		Pics estivaux > 20°C en 2017-2018	Fortes variabilités entre 2007-2012 : 6,7-8,7 pH plus stable entre 2012-2018 : 7,2-7,7		Faible : C = 200 µS/cm	Très variable entre 2007 et 2012, puis retour à la normale certaine variabilité entre 2017 et 2018 : 6-12 mg/L	2000-2005 : entre 0,01 et 0,2 mg/L 2006-2018 : < ou égal à 0,05 mg/L	2001-2018 : < ou égal à 0,05 mg/L	2000 : 25 mg/L en moy 2018 : entre 25 et 15 mg/L	
	Pont Scorff 1	ED		Augmentation entre 2007 et 2015 à partir de 2008 : > 18°C avec pic à 23°C	2000-2007 : 6,8 < pH < 7,3 2008-2015 : 7,3 < pH < 9,3			2012-2015 : > ou égal à 9 mg/L	2000-2005 : < 0,2 mg/L 2007-2015 : < ou égal à 0,05 mg/L	2000-2005 : 0,01-0,15 mg/L Après 2005 : 0,025 mg/L	Baisse régulière 2000 : 35 mg/L 2015 : 20mg/L	
	Scorff Quéven 2	MH		2000-2007 : < 18°C 2009-2015 : 18-23°C	2000-2007 : pH=7,4 2008-2015 : 7 < pH < 8,9		A partir de 2009 salinisation plus poussée : Moyenne = 15 g/L	Meilleure oxygénation à partir de 2011 : 8-13 mg/L	2011-2015 : 0,05-0,2 mg/L	Après 2004 : 0,05 mg/L	Baisse : 2000 : 35 mg/L 2012-2015 : 10-25 mg/L	
Noyal	Noyal Theix	MH	Augmentation : > ou égales à 10°C entre 2009-2015	Augmentation : > à 20°C entre 2009-2015			Très variable : 15-20 g/L en moyenne	Augmentation : à partir de 2012 O2 > 9 mg/L	Augmentation entre 2000 et 2015 : 0,10 à 0,5 voire 1,5 mg/L	Assez élevée entre 2000-2015 : 0,1 à 0,2 mg/L	Très irrégulier avec "pics" à 10 voire 20 mg/L	
	Noyal 1	PH		Augmentation à partir de 2008 : > 20°C mais peut atteindre 22°C en 2012-2014-2015			Augmentation à partir de 2008-2009 : > ou égale 25 g/L		2000-2015 : 0,1-0,7 mg/L	Assez faible à partir de 2007 : 0,05-0,1 mg/L	Faible : < 5 mg/L en 2007-2014	
	Noyal 2	PH		Augmentation à partir de 2008 : > 20°C mais peut atteindre 22°C en 2012-2014-2015			Augmentation à partir de 2008-2009 : > ou égale 25 g/L	Augmentation et maintien de fortes valeurs à partir de 2012 O2 > 9 mg/L	Relativement élevé entre 2012-2015 : 0,25-1 mg/L	Assez faible entre 2012 et 2015 : 0,05-0,1 mg/L	Faible : < ou égal à 5 mg/L en 2007-2015	

Les séries hydrobiologiques temporelles ont été exprimées en graphiques, paramètre par paramètre. Notre démarche consiste alors à décrire les différentes tendances temporelles détectables à l'œil nu sur ces graphiques, et à les résumer dans un tableau synthétique unique (Tableau 2). On peut ainsi décrire à partir de ce tableau, les grandes tendances dans l'évolution des paramètres hydrobiologiques (température, pH, salinité, conductivité, oxygène dissous, ammonium, nitrite et nitrate), ceci dans les six hydrosystèmes du projet POPEST.

Température de l'eau

On cible ici l'évolution dans le temps des températures minimales hivernales, et maximales estivales. Du Pas de Calais (Canche) à la latitude de l'Aven, on peut détecter sur uniquement deux systèmes (Canche et Aven) des températures minimales hivernales plus douces à partir de 2007, les températures maximales estivales restant a priori stables (ne dépassant pas 17 à 18°C), quel que soit l'estuaire considéré. Par contre, plus au Sud, du Scorff à Noyal, on observe une tendance nette à une augmentation des températures maximales estivales à partir de 2008-2009, avec des pics de température estivaux pouvant atteindre 22 à 23°C. **Le réchauffement climatique impacte donc les eaux de transition plus particulièrement en été dans la partie Sud de notre gradient latitudinal, la partie la plus Nord présentant quant-à elle des hivers plus doux.**

pH

Une augmentation modérée du pH est détectable en Canche après 2007 ; nous n'avons pas d'éléments pour considérer si cette augmentation peut être mise en relation avec le changement global. Le Scorff présente une variabilité forte de son pH à partir de 2008, particulièrement en aval de Pont Scorff (en eau douce, comme en mésohalin) ; cette variabilité est peu vraisemblablement liée aux effets possibles du changement global, mais pourrait être lié à des rejets liés aux activités anthropiques. Des informations environnementales complémentaires doivent être acquises pour interpréter cette variabilité du pH atypique.

Salinité

Une salinisation plus poussée des secteurs mésohalins et polyhalins est observée à partir de 2009-2011, pour les hydrosystèmes les plus au Sud (Aven, Scorff, Noyal) ; elle est très vraisemblablement liée à la baisse de la pluviométrie en relation avec le changement global.

Conductivité

On observe une **augmentation de la conductivité moyenne en Canche (500 micro-siemens/cm en 1977-1989) qui atteint 600 micro-siemens/cm en 2003-2009** ; cette augmentation pourrait résulter d'activités anthropiques accrues sur le bassin versant. **Sur le bassin de l'Horn, on pourrait imaginer un scénario inverse, ie une relative décroissance des intrants d'origine agricole générant une baisse sensible des apports en particules ionisées**, et donc une baisse de la conductivité de 100 micro-siemens à partir de 2014.

Oxygène dissous

Les teneurs en O₂ restent élevées dans la plus-part des hydro-systèmes ; certains systèmes présentant une augmentation de leur teneur en oxygène, généralement après 2010 (Penzé ED, Aven OH-MH, Scorff MH, Noyaló MH-PH). **Sur le Scorff ED, on observe une variabilité forte de l'oxygène dissous en 2017-2018 (6-12 mg/L) ; cet hydrosystème est visiblement soumis à des épisodes hypoxiques.**

Ammonium

Les plus fortes teneurs des eaux en ammonium sont clairement observées dans l'hydro-système de Noyaló (MH-PH) avec des valeurs qui restent soutenues sur la période 2012-2015 et qui peuvent présenter des pics à 0,7 à 1,5 mg/L. Ces fortes concentrations sont vraisemblablement liées à une forte anthropisation du bassin versant (activités industrielles et rejets de STEP soutenus).

Nitrite

Les teneurs en nitrite restent relativement modérées dans la plus-part des hydrosystèmes ; on remarque cependant des **valeurs soutenues en estuaire de Penzé en 2009-2019 (de 0,10 à 0,60 mg/L)** un système eutrophisé. On trouve également des **concentrations soutenues en nitrite à Noyaló (MH), entre 0,1 et 0,2 mg/L** sur la période 2000-2015, confirmant ainsi le niveau de nitrite élevé détecté par le LEMAR en septembre 2018.

Nitrate

Les concentrations en nitrates sont clairement en baisse depuis les années 2000 dans la grande majorité des hydro-systèmes, compris pour les plus eutrophisés, comme la Penzé et l'Horn ; notons que pour ces derniers systèmes, elles restent encore fortes (30 à 60 mg/L) ; cette baisse générale étant très vraisemblablement liée à une meilleure efficacité des STEP et surtout à une réduction progressive des apports azotés dans les zones agricoles. On observe une tendance atypique pour la Canche, une augmentation continue de 1978 à 2018 des taux de nitrate, de 15 à 25-30 mg/L ; nous n'avons pas actuellement d'éléments pour interpréter ce pattern. On peut détecter pour les systèmes peu eutrophisés de l'Aven et du Scorff des valeurs de nitrates stables autour de 25 mg/L ; alors que Noyaló présentant un bassin versant avec peu d'activités agricoles et présente en conséquence des taux de nitrate faibles, souvent inférieurs à 10 mg/L.

3.5) Signatures chimiques et biologiques sur le flet

Analyses chimiques sur les polluants organiques (PAH & PCB)

Des dosages de HAP et PCB ont été menés par le CEDRE, sur les carcasses de flet issues des estuaires du projet POPEST ; notons de plus que des explorations sur les PAH ont aussi été menées par le CEDRE sur les sédiments des mêmes estuaires (Fig. 3).

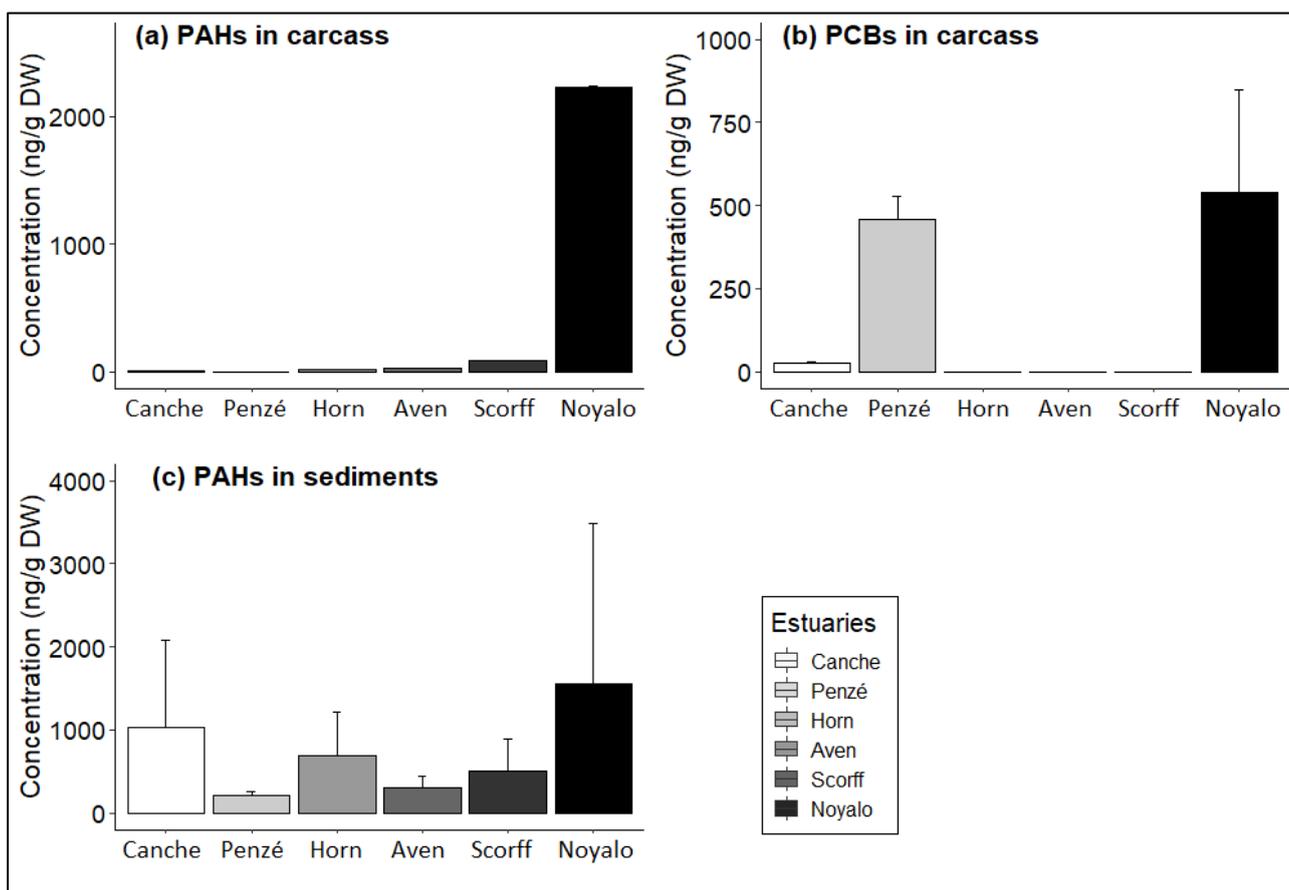


Figure 3. Analyse des PAH et PCB sur les carcasses de flets et sur les sédiments

Des signatures importantes en PAH dans les carcasses de flets ont été détectées particulièrement dans l'estuaire de Noyalo, les autres estuaires présentant des valeurs très faibles en hydrocarbures (Fig. 3). On confirme la présence de signatures en PAH élevées dans l'estuaire de Noyalo, aussi au niveau des sédiments ; les sédiments en Canche présentant également des valeurs en PAH soutenues. Nous émettons l'hypothèse que ces signatures significatives en PAH sont liées principalement au réseau routier particulièrement sur la partie basse du bassin versant de Noyalo qui collecte vraisemblablement une partie des hydrocarbures liés au trafic routier ; les signatures en hydrocarbures en Canche pouvant être potentiellement liées aux activités portuaires et nautiques.

On détecte des signatures élevées en PCB pour les flets de Noyalo et de Penzé (Fig. 3). Ces polluants historiques sont généralement liés à des activités industrielles et artisanales qui sont bien présentes notamment sur le bassin de Noyalo. Les signatures PCB pour la Penzé sont plus difficiles à expliquer de par les activités artisanales a priori réduites sur ce bassin.

Chimie des métaux sur le muscle par ICP-MS

Les concentrations de 10 métaux dans le muscle (en $\mu\text{g/g}$ de poids sec) ont été dosées au niveau individuel sur 10 poissons par estuaire ; 3 poissons seulement étant analysés pour Noyalo aval. Les concentrations métalliques sont présentées Figure 4.

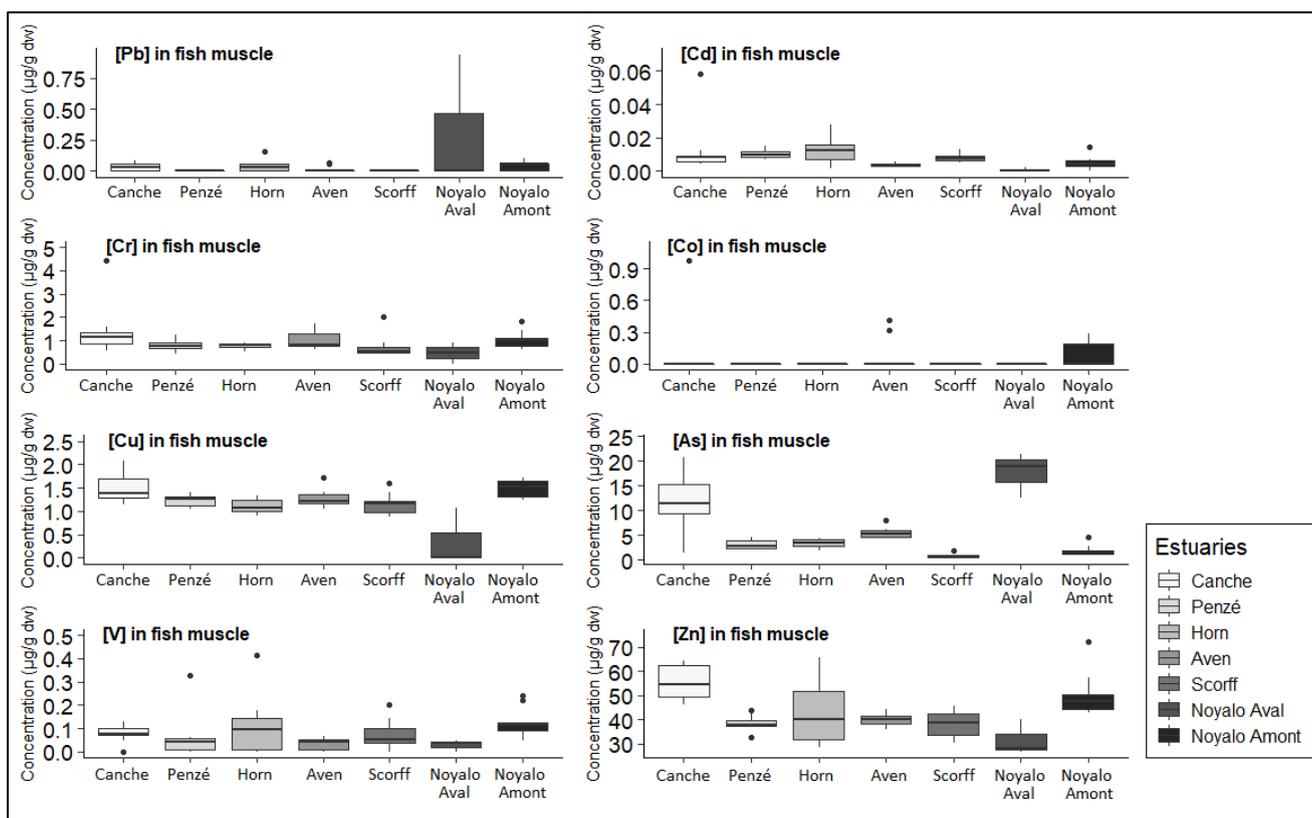


Figure 4. Concentrations en métaux dans le muscle de flet

Globalement, on peut observer des concentrations en métaux plus élevées dans le muscle des flets de Noyalo amont et Canche (Fig. 4) ; les autres populations de poissons (Aven, Penzé, Horn, Scorff) présentant des signatures chimiques moins marquées et relativement proches. On observe par ailleurs des signatures métalliques contrastées entre Noyalo amont vs Noyalo aval, avec notamment en aval des concentrations nettement plus fortes pour le plomb et l'arsenic et nettement

plus faibles pour cobalt, vanadium, manganèse, chrome, cuivre, zinc. **Les poissons de la Canche présentent le plus large spectre de contaminations métalliques.**

Analyse des éléments traces dans les otolithes par ICP-MS

Les otolithes sont des formations calcifiées de l'oreille interne du poisson qui sont associées à la perception des vibrations sonores et à l'équilibration. Ces pièces calcifiées vont grandir chez le poisson de sa naissance à sa mort, sans aucun remaniement ; elles vont ainsi pouvoir s'imprégner des différents éléments propres à l'environnement du poisson, durant toute sa vie. Les otolithes du poisson constituent donc des formations particulièrement utiles, en tant que bon enregistreurs de la nature des masses d'eau estuariennes.

L'otolithe gauche a été prélevé par poisson, ceci pour 5 individus par estuaire. Chaque otolithe a été dissous par un traitement à l'acide ; nous allons donc mesurer une signature moyenne enregistrée par le poisson au cours de son existence (2 mois de vie pélagique à l'état larvaire suivie de 5 mois de vie juvénile dans son estuaire). Les analyses élémentaires ont été réalisées sur le spectromètre de masse à plasma inductif ICP-MS Thermo Element XR, en basse et en moyenne résolution selon les isotopes sélectionnés :

- ✓ Basse résolution : Lithium (^7Li), Bore (^{11}B), Molybdène (^{97}Mo), Cadmium (^{111}Cd), Etain (^{118}Sn), Antimoine (^{121}Sb), Baryum (^{135}Ba), Baryum (^{138}Ba), Plomb (^{208}Pb), Uranium (^{238}U)
- ✓ Moyenne résolution : Magnésium (^{25}Mg), Vanadium (^{51}V), Chrome (^{52}Cr), Manganèse (^{55}Mn), Fer (^{56}Fe), Cobalt (^{59}Co), Nickel (^{60}Ni), Cuivre (^{63}Cu), Zinc (^{66}Zn), Strontium (^{86}Sr), Baryum (^{138}Ba), et Arsenic (^{75}As)

Les moyennes et écart-types des éléments traces mesurés dans les otolithes sont données, par estuaire, dans le Tableau 3.

Tableau 3. Moyennes et écart-types des éléments traces mesurés dans les otolithes de flet issus des estuaires POPEST

Site		Li7(LR)	B11(LR)	Mo97(LR)	Cd111(LR)	Sn118(LR)	Sb121(LR)	Ba135(LR)	Ba138(LR)	Pb208(LR)	U238(LR)	Li7(MR)	Mg25(MR)
Aven	Moyenne	2,36	26,23	0,0043	0,0005	0,0030	0,0018	4,74	4,18	0,0234	0,0009	2,51	71,68
	ET	0,36	7,19	0,0006	0,0002	0,0007	0,0005	0,88	0,83	0,0065	0,0001	0,39	6,11
Horn	Moyenne	1,14	21,39	0,0063	0,0018	0,0039	0,0026	6,98	6,12	0,0458	0,0017	1,19	84,07
	ET	0,16	4,68	0,0041	0,0013	0,0014	0,0009	1,70	1,51	0,0226	0,0008	0,16	30,40
Penzé	Moyenne	0,71	20,93	0,0047	0,0015	0,0071	0,0023	24,35	21,78	0,0338	0,0006	0,69	52,93
	ET	0,06	2,92	0,0019	0,0006	0,0051	0,0004	4,46	4,83	0,0106	0,0001	0,04	5,07
Scorff	Moyenne	1,36	31,65	0,1734	0,0055	0,0074	0,0023	91,38	99,34	0,0511	0,0175	1,32	365,16
	ET	0,51	16,11	0,2476	0,0059	0,0028	0,0005	28,97	33,61	0,0426	0,0252	0,49	442,15
Noyal	Moyenne	0,60	13,20	0,0223	0,0014	0,0048	0,0015	24,77	23,00	0,0278	0,0007	0,59	74,34
	ET	0,05	9,88	0,0203	0,0002	0,0008	0,0003	8,46	8,15	0,0061	0,0002	0,06	9,14
Canche	Moyenne	0,60	13,87	0,1306	0,0035	0,0046	0,0012	3,95	3,89	0,0282	0,0139	0,54	250,88
	ET	0,26	16,22	0,1402	0,0027	0,0016	0,0007	1,48	1,50	0,0162	0,0143	0,24	269,55

Site	Individu	V51(MR)	Cr52(MR)	Mn55(MR)	Fe56(MR)	Co59(MR)	Ni60(MR)	Cu63(MR)	Zn66(MR)	Sr86(MR)	Ba138(MR)	As75(HR)
Aven	Moyenne	0,0186	0,1023	2,13	1,31	0,0069	0,1024	0,1600	11,77	1875,03	4,80	0,0076
	ET	0,0015	0,0262	0,66	0,20	0,0014	0,0591	0,0609	1,16	153,55	0,87	0,0012
Horn	Moyenne	0,0305	0,1580	4,02	2,34	0,0130	0,2253	0,3648	16,30	950,79	6,97	0,0083
	ET	0,0172	0,0591	1,78	0,59	0,0083	0,0832	0,1788	6,57	127,23	1,86	0,0035
Penzé	Moyenne	0,0105	0,1787	7,55	1,54	0,0063	0,2778	0,5935	5,90	1121,15	23,61	0,0064
	ET	0,0035	0,1568	2,15	0,65	0,0015	0,1464	0,2432	0,79	79,06	3,94	0,0012
Scorff	Moyenne	1,0491	0,2337	26,83	10,88	0,1379	1,7871	0,7052	6,03	817,71	95,29	0,0204
	ET	1,5575	0,1630	9,58	11,32	0,1631	1,9443	0,3269	3,72	112,25	29,99	0,0188
Noyal	Moyenne	0,0590	1,4996	21,14	10,61	0,0476	0,4151	0,5512	2,42	487,46	24,85	0,0074
	ET	0,0094	2,3977	13,39	15,88	0,0675	0,2462	0,1836	0,67	97,46	8,03	0,0032
Canche	Moyenne	0,6086	0,1656	2,51	16,78	0,0432	0,4802	0,3080	1,12	320,66	4,05	0,0219
	ET	0,7005	0,1355	1,03	18,35	0,0472	0,4696	0,1363	0,60	112,08	1,44	0,0295

On peut réaliser une synthèse des données du Tableau 3, en faisant un focus sur les éléments traces qui permettent de bien ségréger les différents estuaires POPEST : Ba, Cd, Mn, Sr, Cu, Pb, Zn (Fig. 5).

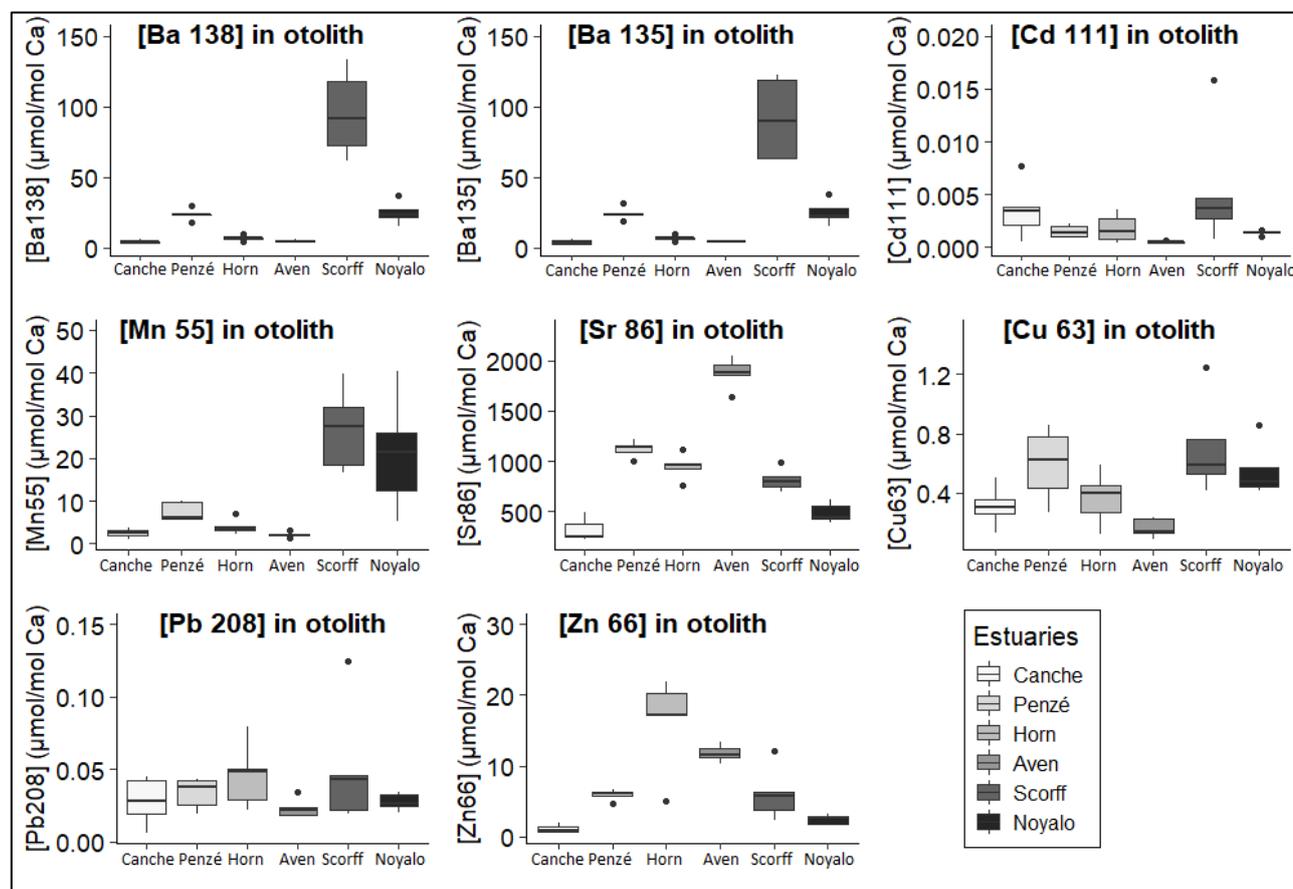


Figure 5. Eléments traces dosés dans les otolithes de flet

Le strontium Sr (Fig. 5) permet de différencier significativement les 6 estuaires : **Aven**> **Penzé**> **Horn**> **Scorff**> **Noyal**> **Canche**.

Le strontium a été précédemment utilisé pour retracer les migrations de poissons entre la pleine mer et les rivières et ainsi définir différents patterns de migration (Secor et al, 1995a ; Secor et al. 2001). Le niveau de strontium est plus élevé dans les otolithes de poissons océaniques relativement aux poissons d'eau douce et peut être utilisé comme proxy de la salinité (Secor et al. 1995b ; Secor and Piccoli 1996 ; Secor and Rooker 2000). **Dans notre étude, on émet donc l'hypothèse que les flets de l'Aven, et de la Penzé seraient les plus exposés à l'influence marine, alors que ceux de Noyal et Canche seraient plus soumis à l'influence eau douce ; les flets issus des autres estuaires seraient exposés à des salinités intermédiaires.**

Le manganèse Mn (Fig. 5) semble discriminer les estuaires avec le gradient suivant : **Scorff**>

Noyal > **Penzé** > **Horn** > **Aven/Canche** ; ce gradient étant comparable à celui obtenu avec le baryum Ba. Les teneurs en manganèse dans les otolithes sont souvent considérées comme un bon proxy de la concentration en oxygène dissous (Thorrold & Shuttleworth 2000) et plus récemment utilisées pour décrire les modèles d'exposition à l'hypoxie des poissons (Limburg et al. 2011, 2015, Mohan & Walther 2015, Altenritter et al. 2018). **Nous émettons ici l'hypothèse que les estuaires du Scorff et de Noyal pourraient être soumis à des épisodes hypoxiques.**

Concernant les métaux lourds (Fig. 5), les estuaires présentant les plus fortes signatures en métaux sont : pour le Cd, Canche & Scorff / Cu, Penzé & Scorff / Pb, Horn & Scorff / Zn, Horn. On peut remarquer que considérés globalement, les gradients de signatures croissantes observés dans les estuaires diffèrent pour **plomb, cuivre, cadmium et zinc** souvent liés à des pollutions, hormis les extrémités des gradients qui sont souvent **le Scorff pour les fortes concentrations, et l'Aven pour les plus faibles concentrations.**

Dans la **Canche** considérée comme un estuaire peu contaminé par les rejets domestiques, agricoles et industriels, des études ont ainsi mesuré des concentrations faibles dans les sédiments en Cd, Cr, Cu, Pb, Zn (Amara et al. 2009 ; Henry et al. 2012). Dans la présente étude, la composition en éléments traces mesurés dans les otolithes de flet de Canche présente des concentrations parmi les plus faibles de Cuivre, Zinc, Plomb, Bore, Etain, Antimoine, et à l'inverse des **concentrations en cadmium, vanadium et fer qui font partie des plus élevées** (Tableau 3). La forte présence de cadmium est étonnante car non détectée par Henry et al. (2012) dans les sédiments ; elle confirme la forte valeur en Cd aussi identifiée dans notre analyse précédente portant sur les métaux dans le muscle.

Analyse des isotopes stables $\delta^{13}C$ & $\delta^{15}N$ dans le muscle par IRMS

Le muscle est un tissu qui présente un turnover non négligeable, aussi les signatures isotopiques détectées ici reflètent l'environnement dans lequel vit le poisson sur les quelques dernières semaines de son existence. On remarque (Fig. 6) un niveau particulièrement élevé en $\delta^{15}N$ pour les flets de Noyal (amont comme aval), relativement à de faibles valeurs observées particulièrement pour les populations de Canche, Scorff et de Penzé ; on peut aussi observer un niveau de $\delta^{15}N$ intermédiaire caractérisant les populations de l'Horn et de l'Aven.

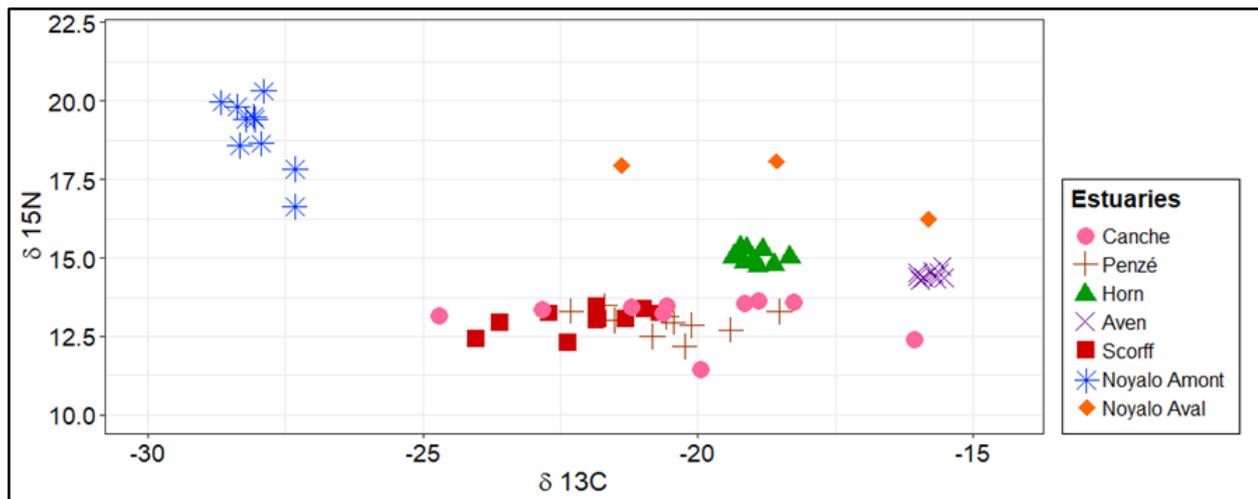


Figure 6. Composition en isotopes stables du muscle de flet (d13C & d15N)

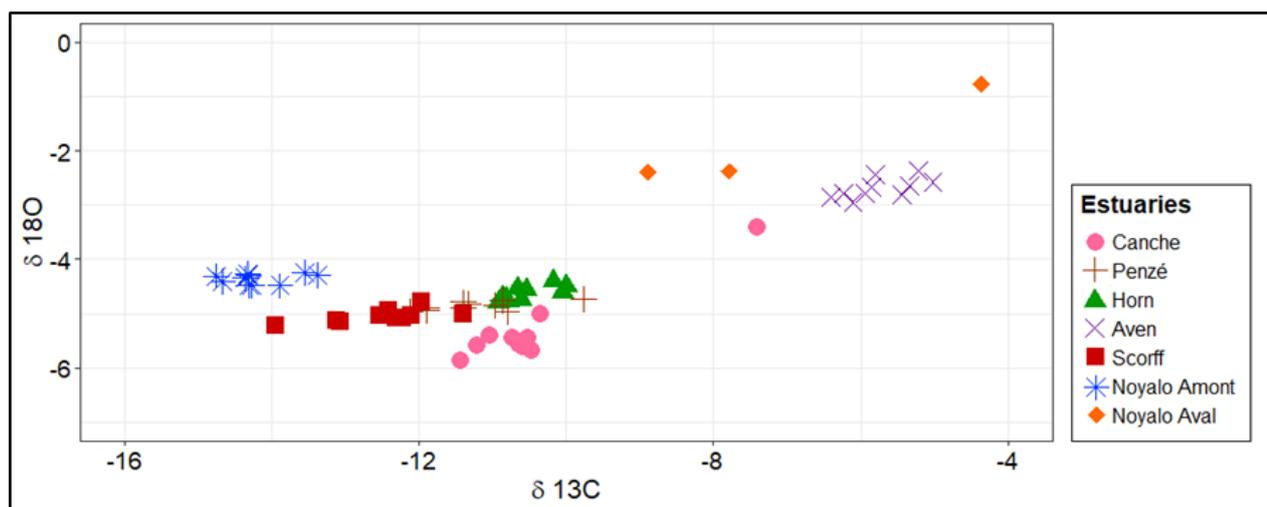
L'enrichissement en $\delta^{15}\text{N}$ de la faune benthique est classiquement observé dans les zones estuariennes très eutrophisées, fortement enrichies par de gros apports en azote d'origine anthropique (Nerot et al. 2012 ; Carmichael et al. 2012). Nous formulons ici l'hypothèse que **l'estuaire de Noyalo serait vraisemblablement le plus enrichi en azote particulièrement issu des rejets de station d'épuration**, et pourrait être caractérisé comme un système particulièrement eutrophisé du projet POPEST.

Les valeurs les plus faibles en $\delta^{13}\text{C}$ dans le muscle (Fig. 6) sont observées sur le côté gauche du diagramme pour la population de Noyalo amont, en opposition aux valeurs les plus fortes sur le côté droit caractérisant Noyalo aval, Horn et Aven. On remarque par ailleurs différentes populations à niveau intermédiaire en $\delta^{13}\text{C}$: Canche, Penzé et Scorff.

Le déficit en $\delta^{13}\text{C}$ observé chez les poissons côtiers est généralement associé à un régime alimentaire principalement issu d'apports continentaux (Day et al. 2021). Nos résultats indiquent donc que **la population de flets de Noyalo se nourrit principalement à partir d'apports terrestres, les populations de Noyalo aval, Horn et Aven se développant, quant à elles, à partir d'apports de proies principalement d'origine marine. Les autres populations présentent quant à elles un régime alimentaire mixte entre eaux douces et eaux marines.** On remarque particulièrement pour les poissons de la Canche une distribution très étalée des valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ qui indiquerait différents profils de poissons fréquentant une gamme d'habitats variés, des eaux saumâtres aux eaux marines.

Analyse des isotopes stables $\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{18}\text{O}$ dans l'otolithe par IRMS

La composition en $\delta^{13}\text{C}$ & $\delta^{18}\text{O}$ a été mesurée sur l'otolithe droit du flet, à raison de 10 poissons analysés par estuaire, sauf pour Noyalò Aval avec 3 poissons analysés. Les signatures mesurées sur l'otolithe *in toto* intègrent donc là toute la vie de l'animal, de sa naissance à sa capture. De manière générale, les valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ dans les otolithes de poissons sont dépendantes de la composition isotopique de la nourriture (apport terrestre vs apport marin), mais aussi du taux d'activité métabolique de l'individu (Hoie et al. 2003 ; Dufour et al. 2007) ; on a ainsi détecté chez les flets juvéniles, dans les estuaires européens, un déficit en $\delta^{13}\text{C}$ bien marqué dans les otolithes d'individus présentant une activité métabolique de routine élevée (résultats non publiés : projet ANR EVOLFISH 2009-2012). Par ailleurs, les valeurs de $\delta^{18}\text{O}$ dans les otolithes de poissons sont généralement positivement corrélées avec la salinité, et secondairement négativement corrélées avec la température ambiante (Dierking et al. 2012 ; Darnaude et al. 2014 ; Morat et al. 2014).



7) reflète probablement des stratégies d'occupation de l'espace différentes selon les individus de la population de flet ; certains poissons font visiblement le choix de la dessalure et alors que d'autres restent en milieu saumâtre. Ces stratégies peuvent être en relation avec de possibles performances physiologiques différentielles de poissons d'une même population, vis-à-vis des stressés environnementaux propres aux différents micro-habitats estuariens ; cette tendance ayant été détectée dans le passé par notre équipe, en analysant les réponses du flet dans l'estuaire de Vilaine (ANR EVOLFISH 2009-2012).

Les signatures $\delta^{18}\text{O}$ sur les otolithes (Fig. 7) permettent également de ségréger le groupe Aven - Noyal aval à eaux salées et températures modérées, des autres estuaires caractérisés par des eaux dessalées et des températures probablement plus élevées.

Lecture des coupes transversales d'otolithes & estimation de la croissance moyenne journalière du poisson

Les inclusions des otolithes en résine, puis leur coupe transversale et le polissage des lames minces à 100 μm d'épaisseur ont été achevés sur 10 poissons / estuaire pour Noyal amont, Scorff, Aven, Penzé, Horn, Canche et sur 3 poissons pour Noyal aval.

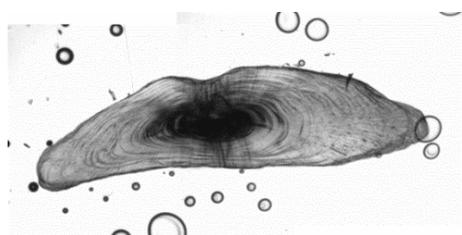


Figure 8. Coupe transversale d'otolithe du flet NP3 - Noyal aval

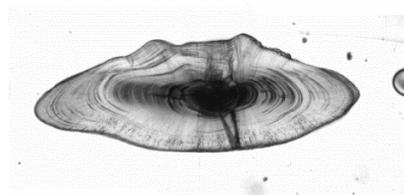


Figure 9. Coupe transversale du flet NP19 - Noyal amont

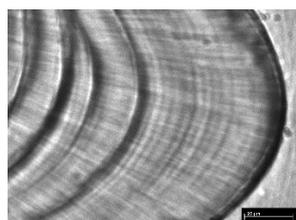


Figure 10. Détail de la périphérie de l'otolithe du flet NP19 - Noyal amont (x 400), mettant en évidence des microstructures journalières bien visibles

Sur les deux coupes transversales d'otolithes (Fig. 8 et 9), on peut observer une différence de formes notable entre NP3 Noyalo aval et NP19 Noyalo amont, ce pattern étant confirmé sur les autres flets aval vs amont de Noyalo. Nous mettons donc ici en évidence sur cet estuaire, qu'une stratégie différente d'utilisation de l'espace par les poissons (salé vs saumâtre) se traduit par une différence de forme très significative de leurs otolithes. Nous confirmons ainsi la tendance détectée pour une autre espèce de poisson plat, la sole, sur la différenciation de la forme de l'otolithe suivant la provenance du poisson d'une lagune côtière dessalée ou de la zone côtière plus salée.

On remarque Figure 10, un agrandissement réalisé sur la périphérie de l'otolithe du flet NP19, qui met en évidence les incrémentations journalières qualifiées de microstructures ; l'épaisseur d'une bande claire + de la bande sombre suivante correspond à une incrémentation journalière.

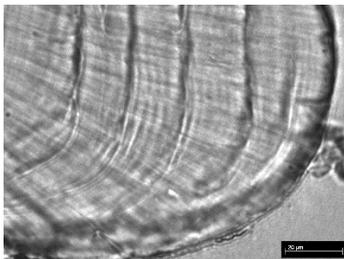


Figure 11. Périphérie de l'otolithe du flet SCP5 -Scorff (X 400) mettant en évidence des microstructures journalières peu visibles et plusieurs interruptions de croissance (anneaux foncés bien marqués : check)

Si les microstructures journalières sont globalement correctement visibles en périphérie pour certaines populations (Canche, Penzé, Horn, Aven), **on observe une proportion importante d'otolithes non « lisibles » particulièrement pour le Scorff (77%) et pour Noyalo amont (50%)** ; les poissons de ces dernières populations présentant des microstructures peu visibles, ainsi que des discontinuités structurales appelées « check » qui interrompent la succession des accroissements journaliers (Fig. 11). Un check est généralement associé à un choc physiologique induit par un stresser de l'environnement, une variation des conditions de température ou de la disponibilité en nourriture. **Nous émettons l'hypothèse que les témoins de ces chocs physiologiques observés sur le Scorff et Noyalo soient principalement liés aux épisodes hypoxiques caractérisant ces deux systèmes estuariens.**

Sur les otolithes présentant des microstructures journalières bien visibles, nous avons ensuite mesuré la largeur d'une vingtaine d'incrémentations journalières par poisson, pour estimer

la croissance moyenne journalière du poisson sur ses dernières semaines de vie avant la capture. Les estimations de croissance moyenne journalières du poisson par estuaire, exprimées en microns/jour (Fig. 12), mettent en évidence la plus faible croissance dans la Canche, la plus forte croissance à Noyal et enfin des valeurs de croissances intermédiaires pour les autres estuaires (Penzé, Horn, Aven, Scorff).

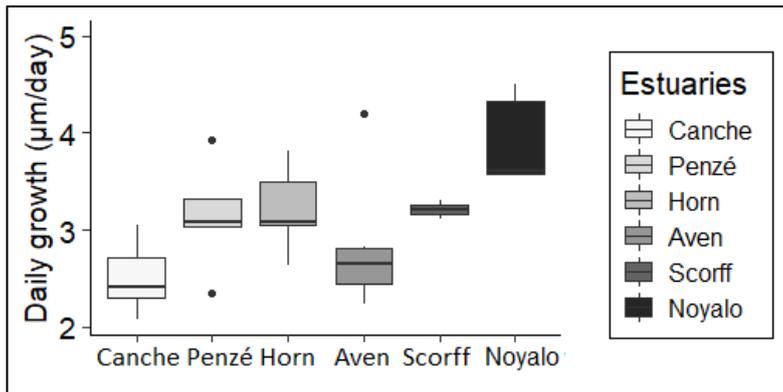


Figure 12. Estimation de la croissance moyenne journalière par la lecture d'otolithe

Les flets juvéniles sont caractérisés par un potentiel de croissance très fort lors de leur première saison estivale en estuaire ; rappelons qu'au moment de leur recrutement en estuaires en Mai, la taille de ces poissons est 2 à 3 cm, pour des valeurs de 9 à 10 cm atteintes en septembre-Octobre. Les facteurs majeurs qui régulent la croissance sont très probablement pour le flet juvénile la température et la disponibilité en proies. **Nous suggérons donc que la faible performance de croissance en Canche pourrait être liée à des eaux de température relativement modérées en été, et surtout à une faible disponibilité en nourriture ; à l'inverse, la croissance forte du flet à Noyal serait liée à une température estivale élevée et une forte disponibilité en proies** identifiée sur le terrain par une grosse abondance de crustacés de type amphipodes dans ce système très eutrophisé.

Génotoxicité mesurée sur le sang (test des comètes)

Des prélèvements de sang ont été effectués sur le terrain, dilués dans une solution tampon, puis immédiatement congelé à l'azote liquide. Ces échantillons ont été ensuite stockés au laboratoire à -80°C , jusqu'à leur analyse. Une mesure de la génotoxicité a été réalisée sur ces échantillons de sang par le test des comètes (Laboratoire TOXEM, Montivilliers).

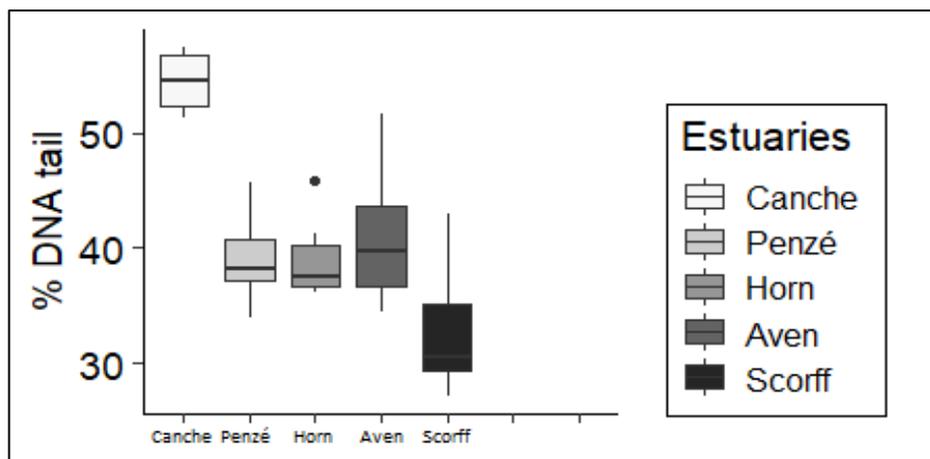


Figure 13. Génotoxicité mesurée sur le sang par le test des comètes

L'échantillon de sang de Noyalo a été détérioré accidentellement, aussi nous ne présenterons les résultats du test des comètes que sur les cinq autres estuaires (Fig. 13). On remarque la plus forte génotoxicité pour la population de flet de Canche, des valeurs intermédiaires pour les populations de Penzé, Horn et Aven, et enfin une faible valeur de génotoxicité pour le Scorff. Une génotoxicité marquée chez le flet, soit le niveau de dommages primaires à l'ADN des cellules sanguines (cassures simples et doubles brins de l'ADN), est généralement observée dans des estuaires caractérisés par des contaminations chimiques significatives par certains métaux et/ou polluants organiques (HAP, pesticides, ...) ; les milieux hypoxiques pouvant aussi conduire à une génotoxicité élevée (Evrard et al. 2010). **Nous suggérons que le cocktail polluant particulier de La Canche puisse induire une génotoxicité non négligeable chez le flet, comme cela a été observée dans le projet HQFish-Seine Aval (2018-2020).** On pourrait également s'attendre à une génotoxicité soutenue dans le Scorff, de par la tendance hypoxique caractérisant ce système ; **la faible génotoxicité que l'on observe en réalité, pourrait alors témoigner ici d'une aptitude particulière des flets du Scorff à protéger-réparer leur ADN face au stress hypoxique, par adaptation physiologique et/ou sélection génétique d'individus résistants à l'hypoxie.**

4) Pertinence de l'approche protéo-génomique sur le flet, dans les petits estuaires

Une part importante du projet POPEST a consisté à développer une démarche de protéo-génomique afin de caractériser l'état de santé des poissons prélevés dans les six estuaires d'intérêt. Il faut noter que nous n'avions jusqu'à présent développé que des approches protéomiques sur cette espèce. Ici, nous avons utilisé les dernières technologies de séquençage d'ADN et de protéines à très haut débit, nous permettant d'obtenir le premier transcriptome de référence annoté de l'espèce *Platichthys flesus*, ainsi qu'une vision quasi holistique du métabolisme hépatique des poissons évoluant dans les différents estuaires, en caractérisant l'expression des gènes (approche transcriptomique) et l'abondance des protéines (approche protéomique).

4.1) Méthodologie

Les ARN et protéines totaux d'un minimum de 5 poissons par estuaire ont été extraits. Pour l'approche transcriptomique, les ARN ont été rétro-transcrits puis ribodéplétés, avant d'être expédiés à la plateforme Génome Québec (Montréal) pour séquençage. Le séquençage des cDNA par Illumina NovaSeq PE100 a été effectué sur 30 bibliothèques, permettant d'obtenir quasiment 3 milliards de reads appairés (soit plus de 500 milliards de paires de bases d'ADN séquencées au total). Nous avons assemblé ces reads en 109122 contigs, qui ont été annotés par comparaison aux bases de données non redondante Swissprot/Uniprot, et au génome complet de *Paralichthys olivaceus*, permettant d'annoter 25034 contigs. Ce transcriptome de référence constitue la première base de données génomique de grande qualité pour cette espèce. L'identification des gènes montrant des différences d'expression entre les estuaires a été menée par une analyse différentielle en retenant un seuil de significativité $FDR < 0,05$ et un facteur minimal (Tfold) de 1,5.

Concernant l'approche de protéomique à haut débit, les protéines extraites ont été digérées par de la trypsine recombinante, et les peptides récupérés analysés en nano LC-MS2 (Q Exactive HF). Au total, 1,084 millions de spectres MS2 ont été acquis, permettant d'identifier (MASCOT, database *P. olivaceus*) 2313 protéines communes à l'ensemble des échantillons. Nous avons retenu un seuil significativité $Pvalue < 0,05$ et un Tfold 1,5 pour l'analyse différentielle (PatternLab).

4.2) Choix d'un estuaire de référence

Il est toujours délicat, dans ce type d'étude s'intéressant à des populations naturelles prélevées *in natura*, de définir une référence. Dans nos précédentes études concernant les grands estuaires, nous prenions systématiquement l'estuaire de la Canche, qui est considéré comme un système peu anthropisé (Amara et al., 2009). Néanmoins, nous avons récemment montré que cet estuaire n'était pas totalement dépourvu de contaminations par des métaux et xénobiotiques organiques (Borcier et al. 2019), et avons décidé de reconsidérer ce choix.

Eu égard aux premiers résultats des analyses physico-chimiques effectuées pour les 6 estuaires étudiés dans POPEST, l'estuaire de l'AVEN semblait dans ce contexte être un bon candidat. Les premiers résultats des analyses protéomiques, obtenus en croisant les données de l'ensemble des estuaires, ont montré que les comparaisons Aven/Canche (et Canche/Aven) étaient celles générant le moins de protéines dérégulées, et que l'Aven était l'estuaire présentant le moins de signatures protéomiques spécifiques. Ce premier résultat nous a donc conforté dans notre choix. Les résultats présentés ci-dessous sont donc issus des comparaisons deux à deux, de chacun des estuaires étudiés contre l'estuaire de l'Aven (Tableau 4).

Tableau 4. Nombre de gènes et protéines différentiellement régulés dans les foies de poissons prélevés dans les estuaires d'intérêt (relativement à ceux prélevés dans l'estuaire de l'Aven)

Estuaire	Canche	Horn	Noyalo	Penzé	Scorff
	<u>Transcriptomique</u>	(nb. transcrits)			
Sur-produits	152	230	239	175	286
Sous-produits	113	258	510	234	419
	<u>Protéomique</u>	(nb. protéines)			
Sur-produits	39	201	313	118	154
Sous-produits	65	104	103	125	83

Pour chaque estuaire, les jeux de données obtenus (protéomique et transcriptomique, et la combinaison des deux) ont été soumis à une analyse fonctionnelle impliquant un classement COG (Cluster of orthologous group) complet, une analyse des réseaux moléculaires utilisant STRING 11.0 (voir pour exemple la Figure 14) couplée à des expériences d'enrichissements GO (Gene Ontology) et KEGG. La combinaison de ces approches a vocation à nous aider à faire le tri dans ces données extrêmement abondantes – il s'agit d'identifier les différences significatives parmi 25000 gènes et

2300 protéines – dans le but d’identifier les réseaux métaboliques différentiellement régulés dans les différents estuaires. Les signatures proté- et transcript-omiques spécifiques de l’Aven ont quant à elles été définies par l’identification des protéines et/ou transcrits apparaissant dérégulés dans la totalité des analyses réalisées.

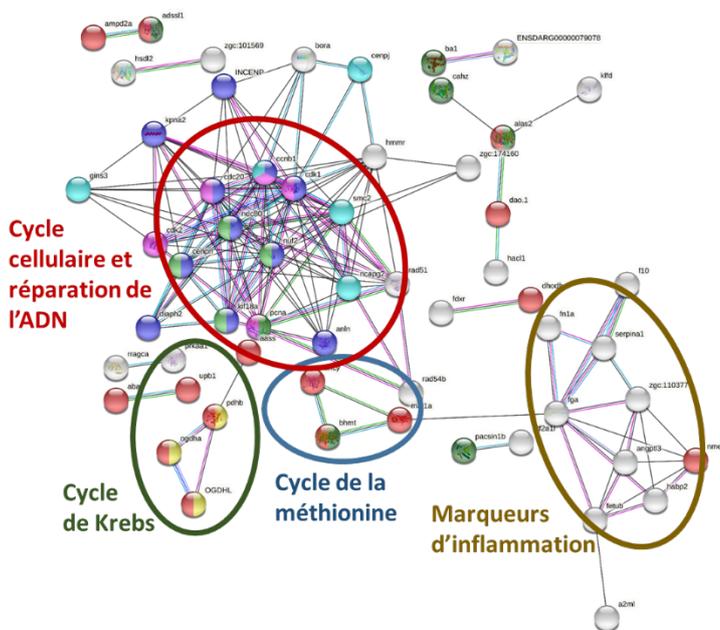


Figure 14. Exemple d’analyse de réseaux moléculaires obtenue dans String 11.0 ; gènes et protéines sous-représentés dans le foie des poissons en Canche vs Aven

4.3) Signatures moléculaires spécifiques détectées dans les différents estuaires

Signatures –omiques spécifiques de l’Aven

Comme évoqué plus haut, l’Aven était l’estuaire présentant le moins de signatures –omiques spécifiques. De fait, seuls trois systèmes protéiques se sont révélés systématiquement dérégulés dans toutes les analyses effectuées.

Le premier système concerne une Arsenic méthyltransférase. La dérégulation positive de cette protéine, impliquée dans la détoxification par méthylation de l’Arsenic, évoque une possible contamination de l’estuaire de l’Aven par l’Arsenic. De manière intéressante, le second système systématiquement dérégulé (positivement) dans les poissons prélevés dans l’Aven est le cycle de la méthionine (représenté par les protéines bêtaïne-homocystéine-méthyltransférase, adénosyl-homocystéinase et S-adénosyl-méthionine synthase et glycine-N-méthyltransferase). Ce cycle représente le centre du métabolisme des groupements méthyles dans la cellule.

Un troisième système concerne une enzyme qui a été nommée Valacyclovir hydrolase, en raison de son activité de clivage de certains anti-rétroviraux chez l'homme. Néanmoins, cette enzyme est connue pour posséder une spécificité plus large, une activité biphenyle hydrolase, et sa surproduction dans les poissons de l'Aven pourrait par conséquent indiquer la présence de xénobiotiques/pesticides présentant des caractéristiques structurales similaires à ces médicaments.

Enfin, un dernier système semble plus actif dans les poissons de l'Aven que ceux prélevés dans les estuaires de l'Horn et de Noyal ; il s'agit de la synthèse du glycogène indiquant que les poissons de l'Aven seraient donc plus aptes à produire des réserves carbonées.

Signatures –omiques spécifiques de la Canche

Il y a relativement peu de protéines et gènes différentiellement régulés dans les poissons prélevés dans cet estuaire, en comparaison de ceux prélevés dans l'estuaire de l'Aven. On note néanmoins quelques modifications importantes et très significatives :

- (i) **un remodelage quasi complet du métabolisme énergétique, impliquant une bascule vers un métabolisme fermentaire** (révélé par l'accumulation de la lactate déshydrogénase, une augmentation de la néoglucogénèse, et la diminution de nombreuses enzymes du cycle de Krebs). Ce remaniement implique également une déviation du métabolisme carboné vers la voie des pentoses-phosphates, révélé notamment par la **surproduction de l'enzyme G6PDH**. Il faut noter que la vocation principale de cette dernière voie métabolique dans la cellule est de produire du NADPH₂, équivalent réducteur (cofacteur) associé principalement aux anabolismes (biosynthèses), ou à de nombreuses enzymes impliquées dans l'ajustement redox en situation de stress oxydatif. De fait, **plusieurs protéines liées à l'adaptation au stress oxydant apparaissent surproduites dans les poissons de la Canche (GST, GPx, phospholipid hydroperoxide reductase, etc.)**. Collectivement, ces résultats montrent un **état de stress oxydatif supérieur dans les poissons de la Canche**, par rapport à ceux prélevés dans l'Aven.
- (ii) Un grand nombre de protéines et gènes impliqués dans la division cellulaire et la réplication de l'ADN apparaissent moins exprimés/accumulés dans les poissons prélevés en Canche, comparativement à l'Aven. Il faut noter dans ce contexte un enrichissement significatif de **gènes codant des protéines liées à la réparation de l'ADN (ie RAD51, RAD52, RAD54 et SW15) sous exprimés dans ces poissons**.

- (iii) On ne note pas dans la Canche de surexpression /surproduction de gènes / protéines impliqués dans la détoxification relativement aux polluants organiques.

Signatures –omiques spécifiques du Scorff

Les principales signatures moléculaires observées dans les poissons prélevés dans l'estuaire du Scorff sont les suivantes :

- (i) **Perturbation majeure du métabolisme lipidique** avec une répression de nombreux systèmes de synthèse des lipides complexes (sphingomyelin, céramides, prospholipides), **couplé à une nette augmentation de la dégradation (beta oxydation) des acides gras.**
- (ii) Parallèlement, **nette augmentation de la synthèse des stérols.**
- (iii) Perturbations majeures de plusieurs systèmes de signalisation/regulation génique : le système AP1 (cJUN, cFOS et plusieurs autres) est notamment sous-produit, de même que plusieurs composantes de STAT, et protéines reliées à la voie des phosphoinositides (PIP).
- (iv) **Plusieurs marqueurs d'un stress hypoxique : la régulation négative d'un inhibiteur du régulateur Hypoxia Inducible Factor 1a (HIF1a)**, couplée à l'accumulation d'érythropoïétine (EPO), qui est l'une des principales cibles d'HIF1a (et protéine cruciale dans l'adaptation à l'hypoxie en modulant les taux d'hématocrite dans le sang).
- (v) **Augmentation du cycle de Krebs (ie du métabolisme respiratoire).**
- (vi) Augmentation de la dégradation des acides aminés ramifiés.
- (vii) Enfin, on notera la **dérégulation positive de nombreux marqueurs écotoxicologiques, ie. Des protéines inductibles par les xénobiotiques et/ou impliquées dans les réactions de détoxification** (eg. Plusieurs Cyt P450 et UDP-glucuronosyltransférases, dimethylaniline monooxygenase, GST, estrogen receptor beta...).

Signatures –omiques spécifiques de la Penzé

L'analyse des poissons prélevés dans l'estuaire de la Penzé révèle les orientations suivantes :

- (i) Perturbations majeures de plusieurs systèmes de signalisation/regulation génique : le système AP1 (cJUN, cFOS et plusieurs autres) est notamment sous-produit, de même que plusieurs composantes de STAT, et quelques voies de transduction MAPK.

- (ii) **Augmentation nette de la voie glycolytique, a priori sans indice d'une bascule vers un métabolisme fermentaire.**
- (iii) **Augmentation de la beta oxydation (dégradation) des acides gras.**
- (iv) Augmentation de la dégradation des acides aminés ramifiés.
- (v) **Baisse des assemblages ribosomiaux traduisant une baisse de la traduction, ie de la biosynthèse des protéines.**
- (vi) **Signes clairs de situation hypoxique : augmentation de l'EPO, hémoglobine et ferritine.**
- (vii) **Système immunitaire : diminution de 5 protéines du complément B, H, C6, C1q et une dernière non caractérisée**

Signatures –omiques spécifiques de Noyal

L'analyse des poissons prélevés dans l'estuaire de Noyal révèle les orientations suivantes :

- (i) **Perturbation majeure du métabolisme lipidique avec une augmentation de la synthèse et de la désaturation des acides gras, ainsi qu'une nette augmentation de la synthèse des stérols.**
- (ii) **Activation du métabolisme de la réponse au stress** avec notamment l'induction d'HSP70 et du protéasome, ainsi que de protéines de stress oxydatif (eg. catalase, peroxyredoxine...).
- (iii) La surexpression de nombreuses protéines liées à la **détoxification des xénobiotiques organiques** (eg. Au moins 6 cytochromes P450, une DMA monooxygénase, UDP-glucuronosyl transférase, GST...).
- (iv) La **surexpression de quelques protéines du cycle de l'urée** (argininosuccinate synthase, carbamoyl-P synthétase), très probablement liée aux fortes charges en nitrite dans l'eau. Rappelons que l'urée est un déchet azoté provenant de la dégradation des protéines par le foie, filtré par les reins et éliminé dans l'urine des vertébrés.

Signatures –omiques spécifiques de l'Horn

L'analyse des poissons prélevés dans l'estuaire de l'Horn révèle les orientations suivantes :

- (i) Une **surproduction très nette des systèmes de détoxification des xénobiotiques organiques** (eg. NADPH cytP450 reductase, au moins 10 cyt P450, 3 UDP-glucuronosyl transférases, epoxyde hydrolase...), très probablement liée à une surexposition à un cocktail concentré de pesticides.

- (ii) **Surproduction très nette de quasiment toutes les protéines du cycle de l'urée.** (transporteur citrulline/ornithine, argininosuccinate synthetase, argininosuccinate lyase, carbamoyl P synthetase, ornithine carbamoyl transférase...), très probablement liée aux fortes charges en nitrite et nitrate dans l'eau.
- (iii) Une **augmentation du métabolisme respiratoire.**

Bilan multi-estuaire sur les principales tendances décryptées par les approches -omiques, sur la réponse du flet aux stress

Avant de faire le bilan sur les marqueurs détectés par les approches -omiques sur l'ensemble des estuaires du projet POPEST, il nous paraît important de rappeler que si la biologie moléculaire devient un outil extrêmement puissant pour détecter les réponses fines du poisson aux stress sans a priori, les signatures mesurées ici reflètent la réponse du flet instantanée à son environnement (cas de la transcriptomique), voire intégrée sur 1 à 2 jours (cas de la protéomique).

L'Aven est caractérisé par une exposition des poissons à l'Arsenic qui se traduit par l'activation d'un système de détoxification spécifique de ce métal.

L'exposition aux nitrites et nitrates des poissons de l'Horn et de Noyalò entraîne essentiellement deux conséquences au niveau hépatique : (i) une surcharge azotée (ammoniacal et acides aminés) qui se traduira par une stimulation des protéines/enzymes du cycle de l'urée, et (ii) la stimulation de la protéine NADH cytb5 reductase, permettant de transformer la met-hémoglobine (incapable de transporter l'oxygène) en hémoglobine. Ces marqueurs sont nettement surproduits dans les poissons prélevés dans l'Horn et aussi détectables, bien que dans une moindre mesure, à Noyalò.

Les marqueurs de stress hypoxique sont particulièrement bien identifiés dans le Scorff, leur présence est aussi relevée sur la Penzé, l'hypoxie étant probablement nettement moins marquée dans ce dernier estuaire.

Nous mettons en évidence une forte diminution des systèmes de réparation de l'ADN particulièrement dans la Canche qui pourrait conduire à des signatures génotoxiques élevées, notamment dans le sang des poissons.

Nous émettons l'hypothèse d'une **forte contamination par des xénobiotiques organiques particulièrement dans l'Horn, un peu moins marquée pour l'estuaire de Noyal** ; cette contamination est révélée par les marqueurs écotoxicologiques classiques (nombreuses cytP450, NADPH P450 reductase, UDPGT, GST, etc...). Il est très probable que les polluants organiques soient dominés par des pesticides pour le premier, et par des contaminants d'origine industrielle et domestique pour le second.

De manière générale on observe dans les **cinq estuaires (Canche - Penzé - Horn - Scorff - Noyal) une augmentation des signatures liées à l'inflammation**, avec une élévation significative des biomarqueurs de type fibrinogène & fibronectine, relativement à ce qui est détecté dans l'Aven.

5) Intégration de l'approche multidisciplinaire (Hydrobiologie - Biologie du flet - Géographie des bassins versants) pour le diagnostic écologique des petits estuaires

Nous avons décrit dans les chapitres précédents, les apports majeurs de nos approches en Ecologie du Stress et en Protéo-génomique, pour explorer l'état écologique de différents petits systèmes estuariens. Ces deux approches ont été complétées par une **collaboration que nous avons développée avec Iwan LE BERRE, Enseignant-Chercheur au Laboratoire de Géographie LETG UMR 6554 (Littoral, Environnement, Géomatique, Télédétection), IUEM de Plouzané. Un travail a été ainsi mené sur l'anthropisation des bassins versants de POPEST par une analyse de données SIG** ; il a fait l'objet d'un mémoire de Master 1 (Sahuquet 2020). Les objectifs de cette approche étaient de fournir des indicateurs géographiques permettant la comparaison des différents bassins versants, d'estimer leur niveau d'anthropisation, et de réaliser une première étude interdisciplinaire explorant les liens entre Hydrobiologie, Biologie-Chimie du flet et Géographie des bassins versants.

Nous allons présenter succinctement, dans un premier temps, les métriques géographiques retenues :

- métriques liées à la pression agricole : surface couverte par une activité agricole (importance relative de l'agriculture dans les différents bassins versants), élevage (importance relative de l'élevage par bassin versant, tous cheptels confondus), traitement phytosanitaire (indice de

fréquence de traitements (IFT) appliqués aux types de culture), taille moyenne des parcelles agricoles.

- métriques liées à l'urbanisation : densité de population (en nombre d'habitants par Km²), imperméabilisation du sol (estimation de la proportion de surface artificialisée, diminuant le pouvoir filtrant des sols),

- métriques liées au « bon état écologique » : habitats naturels à proximité de l'eau (pourcentage d'occupation du sol dans une zone tampon de 100 mètres de part et d'autre des cours d'eau), proportion de zones humides, bocage (densité des haies)

Nous présentons ici les résultats d'une Analyse en Composantes Principales (ACP) menée sur un tableau de données constitué de différentes colonnes : variables géographiques en rouge (citées précédemment) / variables hydrobiologiques en bleu (pH et Conductivité moyens sur la période 2010-2015, teneurs moyennes en Nitrite et Nitrate en 2018) / variables chimiques & biologiques sur le flet, en vert (métaux - muscle ; isotopes stables - muscle et otolithe ; éléments traces - otolithe ; croissance journalière du flet ; indice de condition du flet : état d'embonpoint du poisson ; % d'otolithes peu visibles en coupe transversale) (Fig. 15). Les lignes de la matrice de données correspondent aux différents estuaires du projet POPEST. Notons que les données ont été centrées-réduites, afin de les rendre compatibles dans une analyse de type ACP ; les résultats obtenus sont représentés sous la forme d'un graphique sur les variables (distribuées dans un cercle de corrélation : Fig. 15), et d'un graphique sur les individus (distribués dans le plan factoriel principal : Fig. 16).

surfaces agricoles et des traitements phytosanitaires (IFT)), une conductivité des eaux forte, et pour les poissons un état d'embonpoint et un taux de croissance relativement faibles.

Le cercle de Corrélation (Fig. 15) oppose sur l'axe 2 (vertical) :

* en bas des parcelles agricoles de tailles relativement petites, une pression forte liée à l'élevage et des valeurs en azote inorganique (nitrite et nitrate) élevées dans les eaux.

* en haut et à l'inverse, des parcelles agricoles de grandes tailles, un élevage réduit, des charges en azote inorganique faibles ; on y observe de plus un pH élevé.

L'analyse de la distribution des individus dans le même espace factoriel (Dimensions 1 et 2) permet de décrypter les grandes tendances de chaque bassin versant (Fig. 16). En superposant les Figures 15 et 16, on observe que l'Horn est clairement un bassin versant caractérisé par une pression agricole très forte (petites parcelles dévolues à une production légumière intensive et importance de l'élevage), impliquant l'utilisation massive de pesticides et d'engrais azotés. Notons que les milieux naturels sont rares dans ce bassin versant, tout comme les zones urbanisées. L'approche -omique confirme donc la situation très particulière de cet hydro-système, avec une surproduction des systèmes de détoxification du poisson vis-à-vis de ces pesticides, et une activation forte du cycle de l'urée pour répondre aux excès d'azote (nitrite et nitrate). Le coût du stress est probablement élevé pour le poisson dans ce système, ce qui explique probablement une activation de son métabolisme respiratoire, pour répondre à ce stress.

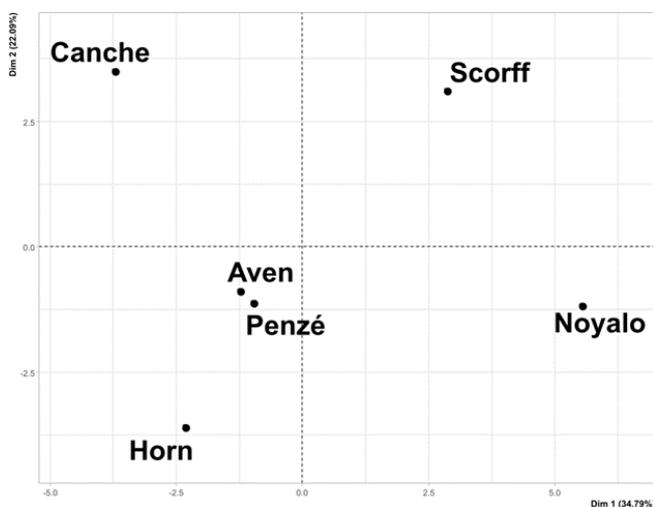


Figure 16. ACP : Distribution des individus (estuariens) dans le plan principal.

La Canche est lui aussi un bassin à dominante agricole (Fig. 15, 16), mais d'une toute autre nature. Les grandes parcelles témoignent de zones essentiellement céréalières. On y observe des signatures métalliques particulières dans l'otolithe (chrome et arsenic), et dans le muscle (Cr, Cu) du flet dont l'origine est incertaine, mais qui pourraient être liées aux activités portuaires de la ville estuarienne d'Étaples-sur-mer. On peut remarquer par ailleurs que la croissance du poisson est faible dans ce système ; nous ne savons pas si ce déficit en terme de fitness est lié au stress métallique, et/ou à une faible productivité biologique conduisant à une disponibilité en proie limitée pour le poisson. **L'approche -omique n'indique pas de détoxification claire du poisson vis-à-vis de polluants organiques ; elle met par contre en évidence une réponse du poisson à un stress oxydatif bien marqué qui pourrait être mis en relation avec cette pollution métallique. L'exposition à ces métaux pourrait conduire à une sous-expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, et donc à une génotoxicité élevée au niveau du sang.**

Le Scorff se rapproche du « pôle naturel » (zones humides, habitats naturels, bocage) du fait de la bonne qualité globale de son bassin versant. On y retrouve cependant des concentrations significatives en contaminants métalliques (cadmium, cuivre) dans les otolithes et muscles du flet (Fig. 15, 16). Il semblerait que ces contaminations ne soient pas liées à des activités en amont de l'estuaire (bassin versant relativement peu anthropisé), mais plus aux activités portuaires de la rade de Lorient. Nous suggérons que la forte proportion d'otolithes peu lisibles chez le poisson ainsi que leur taux élevé en manganèse (indicateur d'épisodes hypoxiques fréquents) pourraient être liés à des rejets ponctuels de matière organique par une laiterie au niveau du village de Pont-Scorff. **L'approche -omique confirme un stress hypoxique bien marqué dans cet estuaire, ainsi que des signatures de détoxification relativement à des polluants organiques.**

L'estuaire de Noyal est pleinement localisé à l'intérieur du « pôle urbanisé » (Fig.15, 16) (densité de population et pourcentage d'artificialisation du sol élevés). On y trouve des signatures particulières de métaux (chrome dans l'otolithe) et des rejets azotés d'origines industriels et domestiques, matérialisés par des signatures élevées de delta N15 dans le muscle de flet. La contamination par les polluants organiques y est aussi bien détectée par les niveaux élevés de HAP et PCB mesurés dans la carcasse du flet. Les poissons y présentent cependant des indicateurs de conditions physiques apparemment satisfaisants (croissance rapide et niveau d'embonpoint élevés), liés à la température élevée de ce système, et à la forte disponibilité en proies pour le poisson (probablement en

lien avec l'enrichissement en matière organique produit par la station d'épuration en été). L'approche -omique a mis en évidence à Noyal un système particulièrement stressé : activation de protéines de stress (HSP70), de protéines liées à la réponse au stress oxydatif et à la détoxification vis-à-vis des polluants organiques. L'activation du cycle de l'urée y est aussi observée chez le poisson pour répondre à la forte charge en nitrite des eaux.

L'Aven est très probablement le système le moins impacté par les activités anthropiques, comme évoqué précédemment (Fig. 15, 16) ; il présente notamment des teneurs en polluants métalliques et organiques réduites dans les tissus du flet, des charges en nitrites et nitrates faibles dans ses eaux, une densité bocagère élevée, une pression agricole assez modérée orientée sur la production de légumes de conserves essentiellement dans sa partie aval. Il n'est donc pas étonnant de retrouver l'Aven proche du centre du plan factoriel (Fig. 16). Un métal a cependant retenu notre attention, l'arsenic est retrouvé en 3^{ième} position dans le muscle de flet dans l'Aven, relativement aux plus fortes valeurs observées à Noyal et Canche ; cette tendance ayant été confirmée dans un nouvel échantillonnage de flet, réalisé dans l'Aven en Septembre 2020. L'approche -omique a confirmé que les poissons de l'Aven étaient bien exposés à l'arsenic et activaient spécifiquement une arsenic méthyltransférase pour se détoxifier vis-à-vis de ce métal. La source de contamination des flets de l'Aven par l'arsenic n'est pas clairement identifiée actuellement ; il est clair qu'un monitoring de la contamination par ce métal doit être mis en place dans cet hydrosystème, très peu pollué par ailleurs.

La Penzé présente a priori les caractéristiques d'un estuaire modérément impacté par l'anthropisation (Fig. 15, 16); il se rapproche cependant du « pôle agriculture et élevage intensifs », tout en étant nettement moins impacté par la pression agricole que le bassin versant de l'Horn. L'approche -omique a permis de mieux caractériser ce système, en mettant en évidence des signes clairs de situation hypoxique, cependant nettement moins marquée relativement au Scorff, mais aussi un ralentissement de la biosynthèse des protéines et une altération du système immunitaire chez le flet ; ie des éléments qui indiquent que les poissons sont aussi stressés dans ce système.

6) Perspectives en termes de recherche en écologie du stress, et de production d'indicateurs de la qualité écologique des milieux estuariens

Perspectives de recherche en écologie du stress dans les milieux estuariens

Le projet POPEST met clairement en évidence la pertinence des outils de la biologie moléculaire (transcriptomique et protéomique haut débit), développés sur un poisson estuarien, le flet, pour aller vers le diagnostic écologique des grands et petits systèmes estuariens.

Nous pensons que ces outils sont particulièrement performants dans les grands estuaires européens, pour qualifier l'état éco-toxico-logique d'un système donné à micro-échelle (ie de l'ordre du kilomètre), par une approche de biosurveillance active impliquant le couplage : caging de flet / approche -omique. La forte plasticité du flet face à la salinité, permet en effet de placer des cages dans la grande variété de micro-habitats caractérisant ces grands systèmes ; elle permet donc d'étudier potentiellement les variations spatiales du multistress dans un grand estuaire d'intérêt, et son impact sur le poisson. Notons qu'un suivi temporel peut être envisagé aussi par le couplage caging/omique : (1) pour mesurer l'impact réel d'opérations de restauration dans des habitats dégradés (maintien, dégradation, amélioration ?), (2) pour analyser l'impact de pollutions accidentelles ou d'évènements extrêmes sur l'hydro-système, comme nous l'avons fait en situation de post-accident LUBRIZOL en estuaire de Seine.

Dans le contexte des petits estuaires, nous avons vu que la diversité environnementale est beaucoup plus réduite en terme de micro-habitats disponibles pour le poisson. Nous pensons en conséquence que la biosurveillance passive impliquant le suivi de la population native de flet du système d'intérêt, par le couplage d'approches ciblées en chimie - biologie sur le flet et d'une approche -omique est particulièrement pertinente, comme nous venons de le démontrer dans POPEST :

- (1) pour définir la nature des stressseurs interagissant dans les petits estuaires
- (2) pour analyser les réponses fines du poisson à ces stressseurs
- (3) enfin, pour aller vers un diagnostic écologique des petits systèmes estuariens.

L'approche multidisciplinaire que nous venons de mener (évolution hydrobiologique de l'hydro-système / chimie et biologie ciblées sur le flet / approche sans a priori de type -omique sur le flet / analyse géographique de l'anthropisation des bassins versants) nous paraît d'un intérêt majeur, pour mettre en vis-à-vis : une connaissance approfondie de l'environnement estuarien et les

réponses fines du poisson, en identifiant notamment les gènes, protéines et voies métaboliques impliquées dans la réponse aux stress environnementaux.

Nous projetons maintenant d'approfondir notre analyse comparative sur l'état écologique de petits estuaires, en validant notre approche multidisciplinaire (hydrobiologie, physiologie du poisson, géographie et chimie) sur de nouveaux hydro-systèmes, particulièrement en Bretagne qui présente une très forte diversité de « fleuves côtiers » ; ces petits estuaires présentent en effet des niveaux d'eutrophisation contrastés par les différentes pressions de l'agriculture et de l'élevage, et pour certains des contaminations chimiques très significatives. Notre objectif final sera ainsi de développer une vision approfondie sur la qualité écologique de 11 hydro-systèmes à l'échelle de la Région Bretagne.

Perspectives sur la production d'indicateurs de la qualité écologique des milieux estuariens

Depuis 3 ans, nous développons une collaboration avec les syndicats de gestion des différents bassins versants, particulièrement avec les animateurs des SAGE concernés par notre projet sur les petits estuaires ; elle est pour nous d'un intérêt majeur pour bénéficier de la connaissance acquise par ces structures sur les usages dans les bassins versants, et particulièrement sur les données disponibles au niveau de l'occupation du sol et sur la qualité de l'eau. Dans le cadre de cette collaboration, nous observons clairement que la construction de ces relations entre scientifiques et gestionnaires des milieux aquatiques est féconde, et favorise une inter-compréhension mutuelle ; elle devrait faciliter à terme l'appropriation des connaissances scientifiques par les gestionnaires.

Nous nous proposons d'explorer les questions suivantes dans notre futur projet :

- l'identification de signatures biologiques spécifiques en relation avec le niveau d'eutrophisation des hydro-systèmes
- l'identification de signatures biologiques spécifiques dans les hydro-systèmes déclassés par des contaminations chimiques lourdes.

La réponse aux deux questions précédentes devrait nous permettre de proposer aux gestionnaires des milieux aquatiques des marqueurs biologiques pertinents sur le flet :

(1) pour évaluer la qualité écologique des écosystèmes estuariens à l'échelle de la Bretagne,

(2) comme outils d'aide à la décision, pour gérer les hydro-systèmes dégradés et mesurer les impacts de mesures de restauration.

7) Travaux, publications et communications réalisées dans le cadre du projet POPEST

Publication scientifique :

Borcier E, Artigaud S, Gaillard J.C., Armengaud J., Charrier G., Couteau J., Receveur J., Ouddane B., Amara R., Laroche J., Pichereau V. (2019) Coupling caging and proteomics on the European flounder (*Platichthys flesus*) to assess the estuarine water quality at micro-scale. *Science of the Total Environment* 695: 133760.

Thèse de Doctorat :

Vulnérabilité de populations de poisson (*Platichthys flesus*) face aux multistress en estuaires : une approche intégrative. Elodie BORCIER. Thèse de Doctorat, soutenue le 6 mars 2019, Université de Bretagne Occidentale.

Communications scientifiques :

Borcier E., Artigaud S., Pichereau V., Gaillard J-C., Armengaud J., Charrier G., Couteau J., Amara R., Laroche J. Evaluation de la qualité des habitats estuariens par les réponses d'un poisson plat encagé : indicateurs physiologiques, génotoxicité et protéomique shotgun. Conférence plénières Journées du GDR Ecotoxicologie Aquatique. IRSTEA : 4-5 décembre 2018, Antony.

Laroche J., Amara R., Borcier E., Charrier G., Pichereau V., Lasram F., Cahot J., Davail B., Minier C., Devaux A., Bony S., Le Floch S., Ouddane B. Etat écologique de la population de flet en Seine & recherche de facteurs de stress à l'échelle des habitats. Séminaire Scientifique Seine-Aval, 16-17 mai 2019, Rouen.

Charrier G., Pichereau V., Borcier E., Laroche J. Vulnérabilité de populations de flet estimée par une approche multidisciplinaire, pour le diagnostic de la qualité écologique des petits estuaires (biologie moléculaire, hydrobiologie, chimie des polluants, géographie des bassins versants). Journées plénières du GDR en Ecotoxicologie Aquatique, 19-20 novembre 2019, Bordeaux.

Laroche J., Laurent J., Pichereau V., Charrier G., Lavergne E., Artigaud S., Le Floch S., Le Berre I. « Approches multidisciplinaires pour identifier les facteurs de stress dans les milieux estuariens (projets HQFish & POPEST) ». Estuaires : traits généraux et spécificités de ces socio-écosystèmes pour l'appui à la gestion - Webinaire du 15 décembre 2020, organisé par la Coordination Inter-Estuaires, l'Office Français de la Biodiversité, le GIP Seine-Aval.

Laroche J., Amara R., Laurent J., Pichereau V., Charrier G., Couteau J., Maillet G., Le Floch S., Ouddane B., Cachot J., Fisson C., Bonny S., Devaux A. « Risque écologique pour un poisson estuarien soumis à la contamination chimique de l'estuaire et au changement climatique - Projet Seine-Aval 6 : HQFish ». Bilan de 4 ans de Recherche Scientifique pour la gestion de l'estuaire de Seine - Webinaire du 8 avril 2021, organisé par le GIP Seine-Aval.

Rapport scientifique :

Amara R., Laroche J., Cachot J., Couteau J., Devaux A., Devin S., Le Floch S., Minier C., Ouddane B. (2020). Impact de la qualité des habitats estuariens de la Seine sur le fonctionnement d'une population de poisson (du recrutement des juvéniles, au processus de reproduction). Projet HQFish - GIP Seine-Aval (64 pp).

8) Bibliographie

- Altenritter, M. E., Cohuo, A., Walther, B. D., 2018. Proportions of demersal fish exposed to sublethal hypoxia revealed by otolith chemistry. *Marine Ecology Progress Series*, 589, 193-208.
- Amara, R. & C. Paul, 2003. Seasonal patterns in the fish and epibenthic crustaceans community of an intertidal zone with particular reference to the population dynamics of plaice and brown shrimp. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 56: 807–81
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., Minier, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia*. 627(1):87-98
- Borcier, E., Artigaud, S., Gaillard, J.C., Armengaud, J., Charrier, G., Couteau J., Receveur, J., Ouddane, B., Amara, R., Laroche J., Pichereau, V., 2019. Coupling caging and proteomics on the European flounder (*Platichthys flesus*) to assess the estuarine water quality at micro-scale. *Science of the Total Environment* 695: 133760.
- Borcier, E., Charrier, G., Couteau, J., Maillet, G., Le Grand, F., Bideau, A., Waeles, M., Le Floch, S., Amara, R., Pichereau, V., Laroche, J., 2020. An integrated biomarker approach using flounder to improve chemical risk assessment in the heavily polluted Seine estuary. *J. Xenobiot.* 10:14-35
- Broeg, K., Westernhagen, H.V., Zander, S., Körting, W., Koehler, A., 2005. The “bioeffect assessment index” (BAI) A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Mar. Poll. Bull.* 50:495-503
- Burke, M.D., Mayer, R.T., 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.* 2(6):583-588
- Capela, R., Raimundo, J., Santos, M.M., Caetano, C., Vale, C., Guimaraes, L., Reis-Henriques, M.A., 2016. The use of biomarkers as integrative tools for transitional water bodies monitoring in the Water Framework Directive context – A holistic approach in Minho river transitional waters. *Sci. Total Environ.* 539: 85-96
- Carmichael, R.H., Shriver, A.C., Valiela, I., 2012. Bivalve response to estuarine eutrophication : the balance between enhanced food supply and habitat alterations. *Journal of Shellfish Research*. 31(1):1-11
- Dabrowska, H., Kopko, O., Lehtonen, K.K., Lang, T., Waszak, I., Balode, M., Strode, E., 2017. An integrated assessment of pollution and biological effects in flounder, mussels and sediment in the southern Baltic Sea coastal area. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24:3626-3639
- Darnaude, A.M., Sturrock, A., Trueman, C.N., Mouillot, D., EIMF, Campana, S.E., Hunter, E., 2014. Listening in on the past: what can otolith $\delta^{18}\text{O}$ values really tell us about the environmental history of fishes ? *PLOS ONE*. 9(10):e108539
- Day, L., Brind'Amour, A., Cresson, P., Chouquet, B., Le Bris, H., 2021. Contribution of estuarine and coastal habitats within nursery to the diets of juvenile fish in spring and autumn. *Estuaries and Coasts*. 44:1100-1117

- Dierking J., Morat, F., Letourneur, Y., Harmelin-Vivien, M., 2012. Fingerprints of lagoonal life : migration of the marine flatfish *Solea solea* assessed by stable isotopes and otolith microchemistry. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 104-105:23-32
- Doubleday, Z.A., Izzo, C., Haddy, J.A., Lyle, J.M., Ye, Q., Gillanders, B.M., 2015. Long-term patterns in estuarine fish growth across two climatically divergent regions. *Oecologia*. 179:1079-1090
- Dufour, E., Gerdeaux, D., Wurster, C.M., 2007. Whitefish (*Coregonus lavaretus*) respiration rate governs intra-otolith variation of $\delta^{13}\text{C}$ values in Lake Annecy. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 64/1736-1746
- Elliott, M., Whitfield, A.K., 2011. Challenging paradigms in estuarine ecology and management. 94:306-314
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Le Du, M., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 15(2):111-127
- Fangue, N.A., Richards, J.G., Schulte, P.M., 2009. Do mitochondrial properties explain intraspecific variation in thermal tolerance? *J. Exp. Biol.* 212:514-522
- Galland, C., Dupuy, C., Loizeau, V., Danion, M., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., Pichereau, V., 2015. Proteomic analysis of the European flounder (*Platichthys flesus*) after experimental PAH/PCB contamination. *Marine Pollution Bulletin*, 95 :646-657
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Calves, I., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., Pichereau, V., 2013. Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *Journal of Sea Research*, 75, 135-141
- Gallien-Landriau, I., 2003. Etude de l'altération fonctionnelle du système reproducteur par les perturbateurs endocriniens. Caractérisation des effets, identification des xéno-estrogènes impliqués et conséquences sur les populations de poissons en estuaire et Baie de Seine. Ph.D. Thesis, Université du Havre
- Henry, H., Filipuci, I., Billon, G., Courcot, L., Kerambrun, E., Amara, R., 2012. Metal concentrations, growth and condition indices in European juvenile flounder (*Platichthys flesus*) relative to sediment contamination levels in four Eastern English Channel estuaries. *J. Environ. Monit.* 14:3211-3219
- Hoie, H., Folkvord, A., Otterlei, E., 2003. Effect of somatic and otolith growth rate on stable isotopic composition of early juvenile cod (*Gadus morhua* L) otoliths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 289:41-58
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., Amara, R., 2013. A combined measurement of bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounders, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chem.* 91: 498-505
- Kleinkauf, A., Scott, A.P., Stewart, C., Simpson, M.G., Leah, R.T., 2004a. Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) - a continuing problem. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58:356-364
- Koehler, A., 2004. The gender-specific risk to liver and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquat. Toxicol.* 70:257-276
- Laroche, J., Gauthier, O., Quiniou, L., Devaux, A., Bony, S., Evrard, E., Cachot, J., Chérel, Y., Larcher, T., Riso, R., Pichereau, V., Devier, M.H., Budzinski, H., 2013. Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(2):738-748

- Limburg, K.E., Olson, C., Walther, Y., Dale, D., Slomp, C.P., Hoie, H., 2011. Tracking Baltic hypoxia and cod migration over millennia with natural tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108: E177–E182
- Limburg, K.E., Walther, B.D., Lu, Z.L., Jackman, G. and others, 2015. In search of the dead zone: use of otoliths for tracking fish exposure to hypoxia. *J. Mar. Syst.* 141:167-178
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.T., Laroche, J., 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70(4):327-343
- Masson, G., 1987. Biologie et écologie d'un poisson amphihaline, le flet (*Platichthys flesus flesus* Linné, 1758) dans l'environnement Ligérien : distribution, démographie, place au sein des réseaux trophiques. Ph.D. Thesis - Université de Bretagne Occidentale
- Mohan, J. A., Walther, B. D., 2015. Spatiotemporal variation of trace elements and stable isotopes in subtropical estuaries: II. Regional, local, and seasonal salinity-element relationships. *Estuaries and Coasts*. 38(3):769-781
- Morat, F., Letourneur, Y., Dierking, J., Pécheyran, C., Bareille, G., Blamart, D., Harmelin-Vivien, M., 2014. The great melting pot. Common sole population connectivity assessed by otolith and water fingerprints. *PLOS ONE*. 9(1):e86585
- Nerot, C., Lorrain, A., Grall, J., Gillikin, D.P., Munaron, J.M., Le Bris, H., Paulet, Y.M. 2012. Stable isotope variations in benthic filter feeders across a large depth gradient on the continental shelf. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 96:228-235
- Pedron, N., Artigaud, S., Zambonino Infante, J.-L., Le Bayon, N., Charrier, G., Pichereau, V., Laroche J., 2017. Proteomic responses of the European flounder to multiple stressors: differential sensitivities of peripheral vs core populations. *Science of the Total Environment*, 586:890-99
- Sahuquet, M., 2020. Estimation géographique du niveau d'anthropisation de bassins versants. Mémoire de Master 1. Master Science de la Mer et du Littoral, Mention Expertise et Gestion de l'Environnement Littoral, Institut Universitaire Européen de la Mer. 63pp
- Secor, D. H., Henderson-Arzapalo, A., Piccoli, P. M., 1995a. Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 192:15-33
- Secor, D.H., Trice, T.M., Hornick, H.T., 1995b. Validation of otolith-based ageing and a comparison of otolith and scale-based ageing in mark-recaptured Chesapeake bay striped bass, *Morone saxatilis*. *Fish. Bull.* 93:186–190
- Secor, D.H., Piccoli, P.M., 1996. Age- and sex-dependent migrations of striped bass in the Hudson River as determined by chemical microanalysis of otoliths. *Estuaries*. 19:778–793
- Secor, D.H., Rooker, J.R., 2000. Is otolith strontium a useful scalar of life-cycles in estuarine fishes? *Fish. Res.* 46:359–371
- Secor, D. H., Rooker, J. R., Zlokovitz, E., Zdanowicz, V. S., 2001. Identification of riverine, estuarine, and coastal contingents of Hudson River striped bass based upon otolith elemental fingerprints. *Marine Ecology Progress Series*. 211:245-253
- Teichert, N., Pasquaud, S., Borja, A., Chust, G., Uriarte, A., Lepage, M., 2017. Living under stressful conditions : fish life history across environmental gradients in estuaries. *Estuarine Coastal and Shelf Science*. 188:18-26
- Thorrold, S.R., Shuttleworth, S., 2000. In situ analysis of trace elements and isotope ratios in fish otoliths using laser ablation sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 1232–1242
- Vasconcelos, R.P., Henriques, S., França, S., Pasquaud, S., Cardoso, I., Laborde, M., Cabral, H., 2015. Global patterns and predictors of fish species richness in estuaries. *Journal of Animal Ecology*. 84:1331-1341

Williams, T.D., Turan, N., Diab, A.M., Wu, H., Mackenzie, C., Barie, K.L., Hrydziusko, O., Lyons, B., Stentiford, G.D., Herbert, J.M., Abraham, J.K., Katsiadaki, I., Leaver, M.J., Taggart, J.B., George, S.G., Viant, M.R., Chipman, K.J., Falciani, F., 2011. Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. *Plos Comput. Biol.* 7(8):e1002126