



HAL
open science

SASHIMI: Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs

B Xuereb, K Abbaci, R Amara, M Auffret, A Bado-Nilles, Y Ben Cheikh, I Bonnard, M Bonnard, M Burlion, H Chalgmi, et al.

► To cite this version:

B Xuereb, K Abbaci, R Amara, M Auffret, A Bado-Nilles, et al.. SASHIMI: Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs. UMR I-02 SEBIO; OFB. 2023. hal-04246317v2

HAL Id: hal-04246317

<https://ofb.hal.science/hal-04246317v2>

Submitted on 23 Oct 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Projet SASHIMI

Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs

Recueil Méthodologique

Xuereb B¹, Abbaci K², Amara R³, Auffret M⁴, Bado-Nilles A⁵, Ben Cheikh Y¹, Bonnard I⁶, Bonnard M⁶, Burlion M¹, Chalgmi H¹, Charle M⁶, Chaumot A², Costil K⁷, Coulaud R¹, Couteau J⁸, Delahaut L⁶, Dedourge-Geffard O⁶, Diop M³, Dufлот A¹, Geffard O², Fisson C⁹, Le Foll F¹, Le Guernic A⁶, Maillet G⁸, Palos-Ladeiro M⁶, Peignot Q⁶, Porcher J-M⁵, Poret A¹, Rioult D⁵, Serpentine A⁸, Tremolet G¹, Geffard A⁶.

¹Université Le Havre Normandie (ULHN), FR CNRS 3730 SCALE, UMR-I 02 Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques (SEBIO) - 25 rue Philippe Le Bon, 76600 Le Havre, France.

²INRAE, UR RiverLy, Laboratoire d'écotoxicologie, Centre de Lyon-Villeurbanne - F-69625 Villeurbanne, France.

³Univ. Littoral Côte d'Opale, CNRS, Université de Lille, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences - 32 Avenue Foch, 62930, Wimereux, France.

⁴Institut Universitaire Européen de la Mer, Laboratoire des sciences de l'environnement marin – Plouzané, France.

⁵Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, UMR-I 02 Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques (SEBIO) - Parc Technologique ALATA, BP2, 60550 Verneuil en Halatte, France.

⁶Université Reims Champagne Ardenne, UFR SEN, UMR-I 02 Stress Environnementaux et BIOsurveillance des milieux aquatiques (SEBIO) - Moulin de la Housse, BP1039, 51687 Reims, France.

⁷Normandie Université, UNICAEN, FRE BOREA, Sorbonne Universités, MNHN, UPMC Université Paris 06, Université Antilles, CNRS-2030, IRD-207 - 14032 Caen cedex 05, France.

⁸TOXEM - 12 rue des 4 saisons, 76290 Montivilliers, France.

⁹GIP Seine-Aval - Espace des marégraphes, Hangar C, 76176, Rouen, France.



Sommaire

Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la moule zébrée, <i>Dreissena polymorpha</i>	4
Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la fausse moule brune, <i>Mytilopsis leucophaeata</i>	11
Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la moule bleue, <i>Mytilus edulis</i>	23
Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le gammare, <i>Gammarus fossarum</i>	31
Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette blanche, <i>Palaemon longirostris</i>	39
Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette bouquet, <i>Palaemon serratus</i>	47
Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez l'épinoche à trois-épines, <i>Gasterosteus aculeatus</i>	57
Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le flet, <i>Platichthys flesus</i>	65

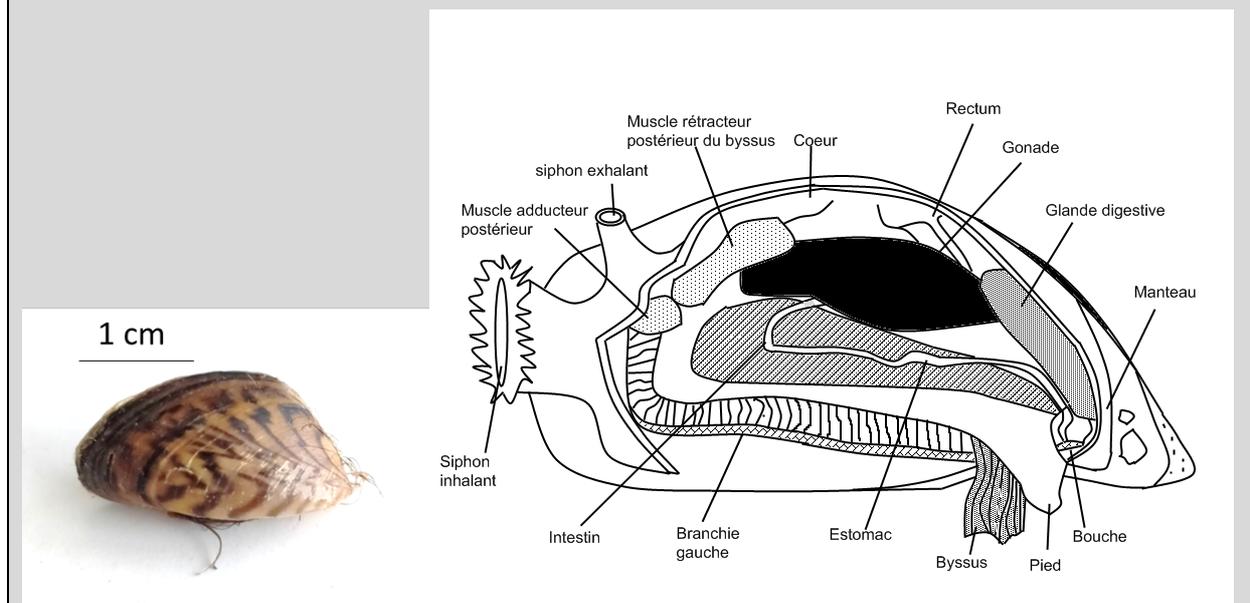
Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*

1 Présentation du modèle biologique, *Dreissena polymorpha*

L'espèce *Dreissena polymorpha* pourra être mobilisée comme un modèle mollusque pour investiguer les masses d'eau continentales (**Encart 1**).

Cette espèce de bivalve hétérodonte fait partie de l'ordre des vénéroïdes est une espèce invasive des eaux douces européennes. Sa large distribution géographique (Europe et Amérique du Nord), son importante activité de filtration associée à une forte capacité de bioaccumulation de divers xénobiotiques, la positionnent comme un organisme modèle pour l'évaluation écotoxicologique des eaux continentales (Bervoets et al., 2005; Besse et al., 2012; Quinn et al., 2014).

Encart 1. A droite : photographie d'une moule zébrée (*Dreissena polymorpha*). A gauche : schéma anatomique de la moule zébrée (crédits : A. Le Guernic, UMR-I 02 SEBIO).



2 Déploiement des organismes par encagement

2.1 Provenance du matériel biologique

En l'absence d'élevage les moules zébrées seront directement récupérées en milieu naturel. Elles proviendront du lac du Der au niveau du Port de Nuisement présentant une faible pression anthropique (Marne, Champagne-Ardenne : 48°36'07.8"N ; 4°44'37.3"E). Les dreissènes seront ensuite ramenées au laboratoire dans l'eau du site oxygénée.

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la moule zébrée, <i>Dreissena polymorpha</i>		Taxon : MOLLUSQUE		
			Masse(s) d'eau		
	Continentale	Transition	Littorale		

2.2 Stabulation au laboratoire

Une fois arrivées au laboratoire, les moules seront nettoyées et triées en fonction de leur taille (< 18 mm). Elles suivront ensuite une période d'acclimatation de plusieurs semaines au laboratoire dans des bacs de 1000 L contenant 750 L d'eau du réseau après déchloration par bullage (pH $8 \pm 0,2$; 600 ± 30 mS/cm) avec des systèmes de filtrage et de bullage continus. Cette période permet aux dreissènes de potentiellement dépurer d'éventuels contaminants qu'elles auraient pu accumuler. Les dreissènes seront maintenues à l'obscurité et la température sera ajustée en fonction des sites d'étude. Au moins deux semaines avant l'encagement, les dreissènes seront mises en cage et maintenues dans les mêmes conditions de stabulation. Durant toute cette période, les moules seront nourries deux fois par semaine avec une quantité *ad libitum* d'un mélange 50 :50 de Nannochloropsis et de Shellfishdiet 1800 (Planktovie, Marseille, France), et un quart de l'eau sera renouvelée chaque semaine. Un suivi des paramètres physico-chimique (température, oxygénation, pH, turbidité, conductivité, nitrite, nitrate, ammonium) sera réalisé afin de s'assurer des bonnes conditions de stabulation des organismes.

2.3 Conditions spécifiques d'encagement

Des cages de 7x7x19 cm sont confectionnées afin de recevoir au maximum 200 individus. Les cages sont réalisées à l'aide de grillage vert en polyéthylène de maille 5x5 mm et identifiées à l'aide d'étiquettes plastifiées (une à l'intérieur et une fixée à l'extérieur de la cage). Les cages seront fermées à l'aide de Serflex et repositionnées dans les bacs pour une nouvelle phase de stabulation de minimum deux semaines permettant la fixation des individus entre eux. Des sondes terrain de température seront fixées à la cage afin d'enregistrer la température continuellement lors de l'encagement (fréquence d'enregistrement toutes les heures). Avant le départ sur site, les cages seront vérifiées et les éventuels individus morts remplacés.

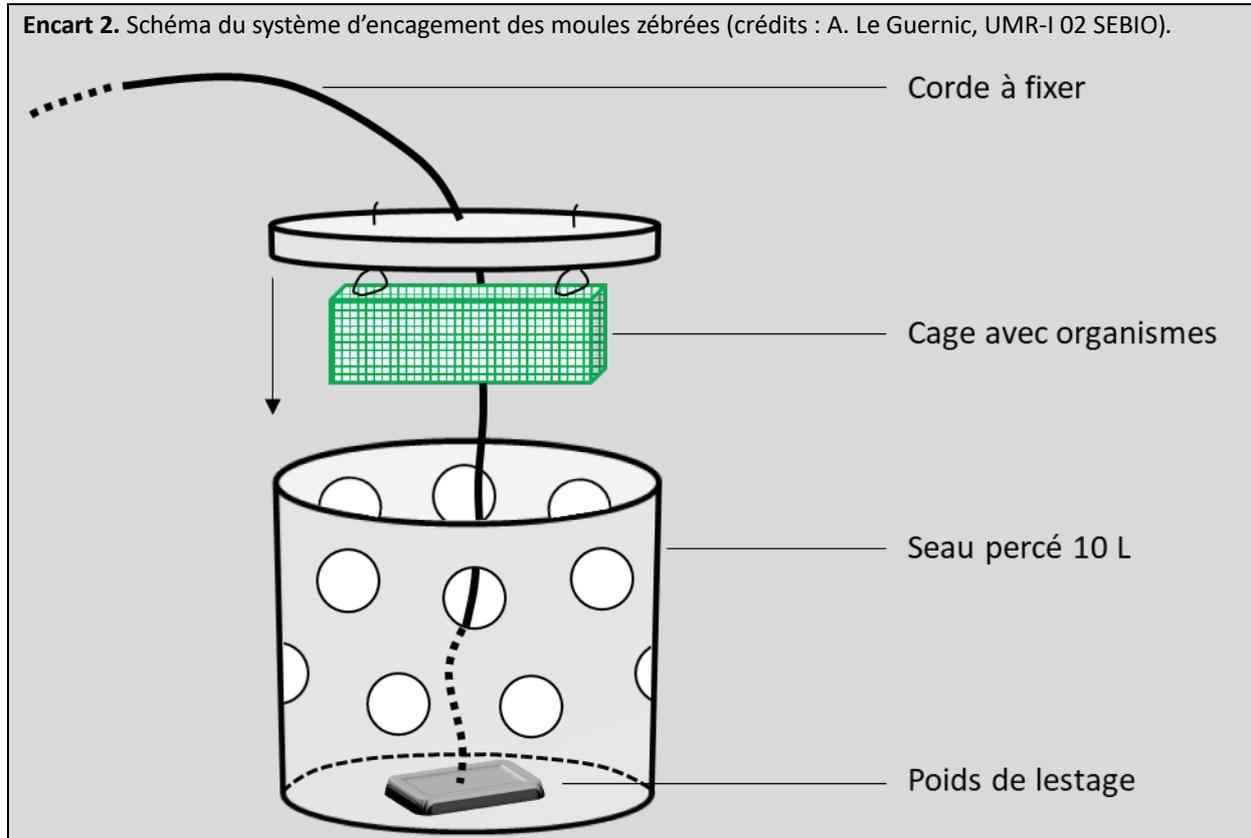
Durant le transport, les cages seront disposées dans des seaux de 10 L avec un système de bullage. En fonction de la température extérieure et de celle des sites d'étude, les seaux pourront être disposés dans des glacières réfrigérées pour éviter un choc thermique.

Les cages seront ensuite fixées à l'aide de fil de fer sous le couvercle d'un seau de 10 L percé. Ce seau sera lesté par le fond afin d'assurer une meilleure stabilité dans l'eau tout en lui permettant de se poser sur le fond ou de s'en approcher (**Encart 2**). Du fait que les cages soient fixées en haut du seau, cela préviendra tout colmatage des mailles de la cage par les sédiments. Il conviendra d'accrocher la corde à un arbre ou autre structure robuste et d'éviter qu'elle ne soit trop visible afin de réduire les risques de vandalisme. Les seaux seront ensuite jetés dans la colonne d'eau à une profondeur dépendant de la taille de la structure aquatique.

Les paramètres physico-chimiques (température, conductivité, pH, oxygénation) seront mesurés lors de l'encagement et lors de la récupération des organismes à l'aide d'une sonde multiparamétrique. Les encagements seront réalisés pour une période de 21 jours, période suffisante pour observer des effets des xénobiotiques sur les moules zébrées.

A l'issue de la période d'encagement, les organismes seront récupérés et mis dans de l'eau du site oxygéné dans des seaux de 10 L. Une fois au laboratoire, les moules seront maintenues dans leur dispositif jusqu'aux analyses (réponses immunitaires et génotoxiques) du lendemain. Les cages sont déposées dans des aquariums contenant l'eau du site oxygénée, le tout dans une chambre thermostatée réglée à la température du site.

Encart 2. Schéma du système d'encagement des moules zébrées (crédits : A. Le Guernic, UMR-I 02 SEBIO).



3 Analyses de la réponse immunitaire

Les analyses immunitaires seront réalisées en suivant le protocole établi par Barjhoux et al. (2020). L'hémolymphes contenant les cellules responsables de l'immunité des bivalves, les hémocytes, sera prélevée au niveau du muscle adducteur postérieur de façon individuel avec une seringue 0,3mL BD Micro-Fine™ Demi (0.30mm (30G) x 8mm). L'hémolymphes sera ensuite conservée sur glace avant les différentes analyses et la qualité du prélèvement sera observée par microscopie. Afin d'évaluer la concentration et la mortalité cellulaire, 20µl d'échantillon sera incubé dans une solution tampon L15 Leibovitz à 15% avec ajout d'un colorant vital (1% Hoescht) et un colorant de perméabilité membranaire (1% iodure de propidium). Quinze individus sont prélevés par site. Afin d'effectuer les analyses immunitaires et de génotoxicité sur les mêmes individus, seuls les 10 prélèvements présentant une concentration cellulaire suffisante seront gardés pour les analyses conjointes.

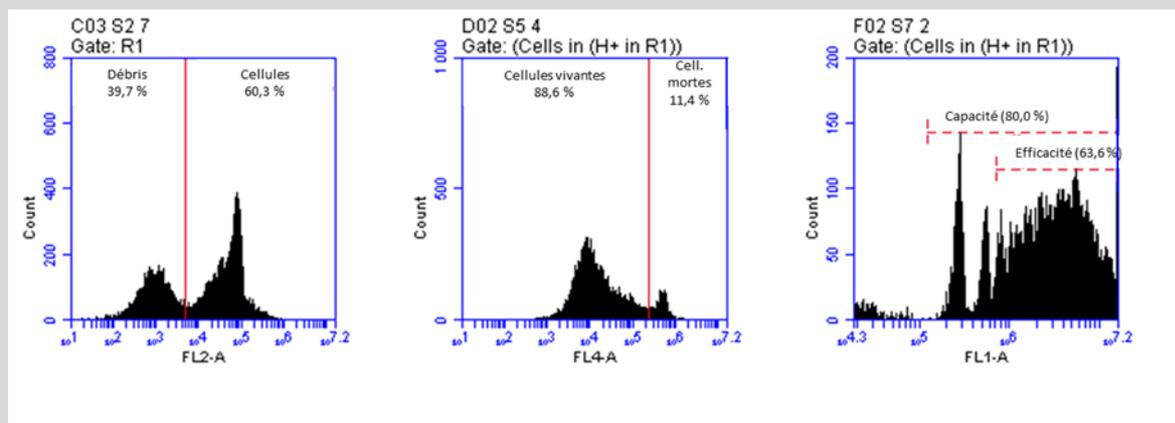
Après avoir scindé l'échantillon en deux, une partie sera utilisée pour les analyses immunitaires. La concentration cellulaire sera ajustée à 75 000 cellules par échantillon dans une plaque de 96 puits (plaque 1) avec une solution tampon de L15 à 15%. Différents paramètres peuvent être mesurés grâce à la cytométrie en flux : la mortalité hémocytaire ainsi que la capacité, l'efficacité et l'avidité de la phagocytose. Brièvement, les hémocytes seront incubés 4 heures à 16°C à l'obscurité avec des microbilles fluorescentes de 2 µm de diamètre à raison de 50 billes/cellule. Vingt minutes avant la fin de l'incubation, les solutions cellulaires seront récupérées et transvasées dans une nouvelle plaque (plaque 2) et un mélange trypsine – EDTA sera ajouté dans les puits de la plaque 1 afin de récupérer les hémocytes adhérents. Au bout de dix minutes, le tout sera mélangé dans la plaque 2 et 1% de Hoescht sera ajouté. Juste avant la lecture au cytomètre, 1% d'iodure de propidium sera ajouté afin de marquer les cellules mortes. La lecture se fera à l'aide d'un filtre 427/10 pour la détermination des événements cellulaires

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la moule zébrée, <i>Dreissena polymorpha</i>	Taxon : MOLLUSQUE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

(Hoescht-positif), d'un filtre 533/30 90% pour les mesures de phagocytose et d'un filtre 670/LP pour la mesure de mortalité cellulaire sur 10 000 évènements localisés dans la région d'intérêt.

- L'intégration du Hoescht sur les cellules induit une augmentation de la fluorescence afin de séparer les débris de l'échantillon des cellules (cf. **Encart 3** à gauche).
- La mortalité cellulaire est mesurée sur les évènements cellulaires (Hoescht-positifs) via l'augmentation de la fluorescence à l'iodure de propidium (cf. **Encart 3** au centre).
- La fluorescence dans le vert augmente proportionnellement avec le nombre de microbilles ingéré par la cellule. Cela va permettre de distinguer les populations cellulaires ayant phagocyté de 0 à X billes. La capacité de phagocytose est déterminée par le pourcentage de cellules phagocytantes (à partir de 1 bille), l'efficacité de phagocytose par le pourcentage de cellules ayant ingéré au moins trois billes et l'avidité de phagocytose correspond au nombre moyen de billes ingérées par cellule et est calculée par le ratio de la moyenne de fluorescence de la capacité de phagocytose sur la moyenne de fluorescence liée à l'ingestion d'une seule bille (cf. **Encart 3** à droite).

Encart 3. Dotplots pour la mesure des différents paramètres obtenus par cytométrie en flux. A gauche : séparation des évènements cellulaires (Hoescht-positifs) des débris (Hoescht-négatifs). Au milieu : marquage des cellules mortes par intégration et fluorescence de l'iodure de propidium. A droite : capacité et efficacité de phagocytose avec l'intensité de fluorescence proportionnelle au nombre de cellules ingérées par les hémocytes.



4 Analyses des taux de dommages à l'ADN des hémocytes

Pour la dreissène, la génotoxicité sera évaluée sur les hémocytes prélevés depuis le muscle adducteur postérieur. Le fait de séparer l'échantillon d'hémolymphe permettra de réaliser le test Comet et les analyses en cytométrie en flux sur le même individu et donc permettra de vérifier que la génotoxicité ne soit pas influencée par la cytotoxicité. L'évaluation de la génotoxicité par le test Comet en condition standard alcaline permet de mettre en évidence les cassures simple brins (Single Strand Breaks - SSBs), double brins (Double Strand Breaks – DSBs) et les sites alcali-labiles (Alkali-labile Sites - ALS).

Le test Comet pourra être réalisé selon la procédure détaillée dans Cant et al. (2022) sur 10 individus par station. Le niveau de dommage à l'ADN sera quantifié par analyse d'image au moyen du logiciel COMET AYSAY IV et exprimé en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (Tail DNA percentage). Deux gels seront réalisés pour chaque individu et 100 comètes seront analysées par gel.

5 Obtention des valeurs seuil et de référence

L'approche utilisée est basée sur celle proposée par Besse et al. (2013), et les valeurs de référence et seuil ont été obtenus grâce à Mme Christelle Lopes du laboratoire de biométrie et biologie évolutive (LBBE) de Lyon1. Tout d'abord, les données sont classées par ordre croissant. Ensuite, il est nécessaire que l'ensemble du jeu de données suive une distribution gaussienne. Cette méthode nécessite un nombre important de données et que celles-ci soient dans une gamme assez importante. Ainsi, les données obtenues sur des dreissènes transplantées sur minimum 25 sites ont été considérées (N = 10 pour chaque biomarqueur). La moyenne de cette distribution constitue donc la valeur de référence. Différents calculs peuvent être réalisés pour obtenir la(es) valeur(s) seuil(s) :

- Pour des biomarqueurs dont l'induction a une réalité toxicologique, le seuil d'induction est représenté par le 95^{ème} percentile.
- Pour des biomarqueurs dont l'inhibition a une réalité toxicologique, le seuil d'inhibition est représenté par le 5^{ème} percentile.
- Enfin, pour les biomarqueurs dont l'effet se caractérise par une inhibition et une induction, les deux méthodes précédemment décrites ont été réalisées pour estimer de manière « séparée » le seuil d'induction et le seuil d'inhibition.

La valeur de référence caractérise donc la réponse moyenne attendue en condition « normale » non perturbée, et les valeurs seuils permettent de définir, dans un cas, une induction significative de conditions perturbées, dans un autre une inhibition ou les deux.

Afin de garantir la robustesse de ces valeurs, une méthode itérative de type « bootstrap » à la méthodologie proposée par Besse et al. (2013) a été utilisée. Brièvement, il s'agit d'un tirage aléatoire de 30 données parmi la distribution. A partir de cette nouvelle distribution, la valeur de référence ainsi que la(es) valeur(s) seuil(s) sont calculées selon la même méthodologie précédemment décrite. Cette procédure est réitérée z=1000 fois pour obtenir z valeurs de référence et z valeurs seuils estimées à partir des z échantillons de données. La valeur de référence et la(es) valeur(s) seuil(s) retenues *in fine* correspondent alors aux moyennes de ces z valeurs respectivement estimées. Les procédures « bootstrap » pour déterminer les seuils d'induction et d'inhibition (et la valeur de référence) ont donc été appliquées aux jeux de données « induites » et « inhibées » respectivement. Ces valeurs de référence et seuil sont annotées dans l'**Encart 4**. Pour la génotoxicité, la médiane des médianes des z distributions est calculée au lieu de la médiane des moyennes.

Toute la méthodologie d'estimation des valeurs de référence et seuil a été implémentée et réalisé à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2007).

Biomarqueur	Capacité de phagocytose	Efficacité de phagocytose	Avidité de phagocytose	Tail DNA
Unité	%	%	billes / hémocyte	%
Référence	74,00	56,00	12,01	4,15
Seuil induction				8,68
Seuil inhibition	66,00	41,00	9,47	

6 Grilles de lecture

Les grilles de lecture des résultats seront obtenues en comparant les réplicats pour chaque biomarqueur et chaque station avec la ou les valeur(s) seuil(s) correspondante(s) (**Encart 5**). Ce rapport, entre

le nombre de réplicats dépassant la ou les valeur(s) seuil(s) par rapport au nombre total de réplicats analysées par station et par biomarqueur, permettra d'afficher un code couleur (**Encart 5**). Ce rapport est vert lorsque moins de 25% des réplicats dépassent les seuils, orange pour entre 25% et 75% des réplicats dépassant les seuils et rouge au-delà. Cette grille de lecture sera utilisée sur l'ensemble des biomarqueurs analysés.

Encart 5. Exemple de grille de lecture des résultats. Le rapport dans le tableau correspond au nombre de réplicats dépassant la ou les valeur(s) seuil(s) par rapport au nombre total de réplicats analysées par station et par biomarqueur.

Station	Biomarqueur 1	Biomarqueur 2	Biomarqueur 3	Biomarqueur 4
Station 1	5/12	10/12	9/11	13/15
Station 2	1/12	1/14	2/14	2/13
Station 3	13/14	8/13	8/14	8/14
Station 4	6/13	2/12	4/11	5/12
Station 5	12/14	2/11	3/14	2/14
Station 6	12/14	11/15	2/12	3/13

 Moins de 25% des réplicats dépassent les seuils

 Entre 25 et 75% des réplicats dépassent les seuils

 Plus de 75% des réplicats dépassent les seuils

7 Analyses additionnelles

7.1 Indice de condition

L'indice de condition permet d'évaluer la condition globale de l'organisme. Celui-ci est calculé par le rapport entre le poids des tissus mous sans byssus et détrempés sur le poids total de l'organisme (avec coquille) :

$$IC = \text{poids frais des tissus mous} / \text{poids frais total.}$$

7.2 État des réserves énergétiques et allocation de l'énergie (CEA)

En plus de l'indice de condition le dosage des réserves énergétiques et l'étude de l'allocation de l'énergie renseignent sur l'état global de santé des organismes encagés. Pour cela, la teneur en lipides, glyco-gène, protéines et sucres libres sera analysée à partir des tissus mous des dreissènes, poolés afin de réduire la variabilité individuelle. Les dosages des réserves énergétiques seront réalisés à partir des protocoles mis au point par Van Handel (1985a et 1985b) et Plaistow et al. (2003). De plus, l'activité du système de transport des électrons (ETS) sera mesurée pour évaluer la consommation d'énergie et permettra, avec les réserves énergétiques, de calculer la CEA selon cette formule :

$$CEA = \text{somme des réserves énergétiques (mJ/mg/h)} / \text{ETS (mJ/mg/h)}$$

7.3 Enzymes digestives

Le métabolisme énergétique peut être mis en relation avec l'activité d'enzymes digestives évaluée au niveau de la glande digestive des moules zébrées. Pour cela des activités de l'amylase, de la lipase, de la lactate déshydrogénase (LDH), de la phosphatase acide (PAC), de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT) seront mesurées selon (Hani et al., 2018).

Références bibliographiques

Barjhoux, I., Rioult, D., Geffard, A., Ladeiro, M.P., 2020. A new protocol for the simultaneous flow cytometric

	Procédure d'engagement et de mesures de biomarqueurs chez la moule zébrée, <i>Dreissena polymorpha</i>		Taxon : MOLLUSQUE		
			Masse(s) d'eau		
	Continentale	Transition	Littorale		

- analysis of cytotoxicity and immunotoxicity on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. Fish Shellfish Immunol. 98, 224–235.
- Bervoets, L., Voets, J., Covaci, A., Chu, S., Qadah, D., Smolders, R., Schepens, P., Blust, R., 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. Environ. Sci. Technol. 39, 1492–1505.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. Water Res. 47, 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>
- Besse, J.-P., Geffard, O., Coquery, M., 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. TrAC Trends Anal. Chem. 36, 113–127. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.04.004>
- Cant, A., Bonnard, M., Porcher, J.-M., Prygiel, J., Catteau, A., Delahaut, L., Palluel, O., Turiès, C., Geffard, A., Bado-Nilles, A., 2022. Integration of Genotoxic Biomarkers in Environmental Biomonitoring Analysis Using a Multi-Biomarker Approach in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758). Toxics 10, 101. <https://doi.org/10.3390/toxics10030101>
- Hani, Y.M.I., Marchand, A., Turies, C., Kerambrun, E., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Porcher, J.-M., Geffard, A., Dedourge-Geffard, O., 2018. Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. PLOS ONE 13, e0194932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194932>
- Plaistow, S.J., Bollache, L., Cézilly, F., 2003. Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. Anim. Behav. 65, 683–691. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2116>
- Quinn, A., Gallardo, B., Aldridge, D.C., 2014. Quantifying the ecological niche overlap between two interacting invasive species: the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and the quagga mussel (*Dreissena rostriformis bugensis*). Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst. 24, 324–337.
- Van Handel, EMILE, 1985. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc 1, 299–304.
- Van Handel, Emilie, 1985. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. J Am Mosq Control Assoc 1, 302–304.

Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la fausse moule brune, *Mytilopsis leucophaeata*

1 Présentation du modèle biologique, *Mytilopsis leucophaeata*

La moule *Mytilopsis leucophaeata* affectionne tout particulièrement les milieux saumâtres (oligo- et mésosalins) mais elle pourra être utilisée comme un modèle bivalve pour investiguer les masses d'eau continentale et de transition. En effet, cette espèce présente naturellement une très grande amplitude écologique vis-à-vis de la salinité puisqu'elle peut vivre dans des eaux dont la salinité est comprise entre 0,1 et 26,4 PSU (voir les revues de Verween et al., 2010 et Kennedy, 2011). L'espèce tolère des osmolarités environnementales comprises entre 5 et 400 mOsm ; elle est osmoconforme dans les milieux > à 70 mOsm et hyperosmorégulatrice dans les eaux présentant une osmolarité inférieure (Deaton et al., 1989). Cette euryhalinité permet d'envisager son déploiement et son utilisation en tant qu'espèce bioindicatrice sur une importante étendue du continuum terre-mer.

Mytilopsis leucophaeata aussi appelée « the dark false mussel » ou « fausse moule brune » est un mollusque bivalve appartenant à la sous-classe des Heterodonta, l'ordre des Myida, la famille des Dreissenidae et la sous-famille des Dreissenomyinae (INPM, 2022). Cette espèce est proche de la moule zébrée *Dreissena polymorpha* qui est mieux connue en Europe et avec laquelle elle a pu être parfois confondue. Néanmoins, les deux espèces se distinguent par la présence, chez *M. leucophaeata*, d'une apophyse au niveau du septum et d'un discret sinus palléal (**Encart 1**). De plus, chez cette espèce, la coquille est plus allongée et zébrée uniquement chez les individus juvéniles. Enfin, *Mytilopsis leucophaeata* est plus petite avec une taille maximale de 24 mm rapportée dans la littérature bien qu'en Normandie nous ayons parfois trouvé des individus d'un peu plus de 30 mm. Cette relative petite taille constitue une limite quant à la quantité de tissus et d'hémolymphes pouvant être prélevée.

Encart 1. Schémas et photographies comparant *Mytilopsis leucophaeata* et *Dreissena polymorpha* (Verween et al., 2010) (à gauche). Photographie de la fausse moule brune, *Mytilopsis leucophaeata* au sein des récifs de l'annélide *Ficopomatus enigmaticus* dans le port de Carentan (crédit : K. Costil, UMR BOREA) et en vue externe (WORMS, 2022).



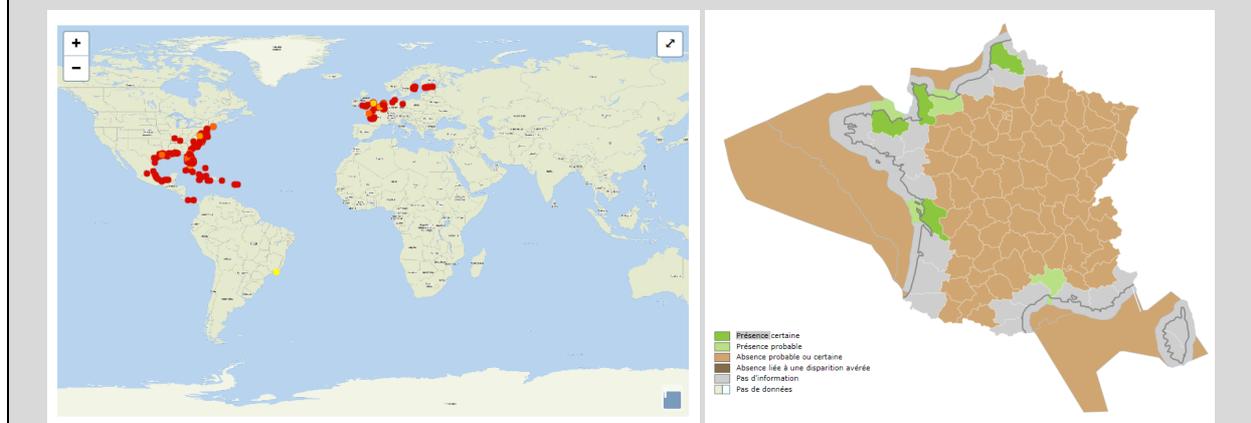
Du point de la distribution biogéographique, le genre *Mytilopsis* était autrefois présent en Europe mais il a totalement disparu d'Europe il y a 5 millions d'années (Verween et al., 2010). *Mytilopsis leucophaeata* est originaire de la côte Atlantique sud des Etats-Unis et du golfe du Mexique. Cette espèce a été détectée pour la première fois en Europe en 1835, dans le port d'Anvers (Nyst, 1835) et, pour la première fois en France, en 1898 dans le canal de Caen à la mer (Chemin, 1910). Depuis, son expansion en Europe a fait l'objet de plusieurs publications (e.g. Florin et al., 2013, Zhulidov et al., 2018) mais en

 	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la fausse moule brune, <i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Taxon : MOLLUSQUE BIVALVE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

France, il semblerait que sa distribution soit relativement limitée. Cependant, l'espèce est discrète et peu connue et elle demeure assez peu documentée dans son aire d'introduction.

Mytilopsis leucophaeata présente un cycle benthopélagique avec des stades larvaires pélagiques puis une métamorphose pendant laquelle l'espèce devient sessile. Elle possède un solide byssus et peut constituer du *biofouling* (Verween et al., 2005). *Mytilopsis leucophaeata* est une espèce filtreuse (55 mL h⁻¹ pour un individu de 20 mm à 20°C et 5,7 PSU) (Rajagopal et al., 2005a). A notre connaissance, elle a encore été très peu utilisée en écotoxicologie et biosurveillance ; on peut néanmoins citer les travaux de Van der Velde et al. (1992) sur la bioaccumulation des métaux traces et ceux de Flemming et al. (2008) sur la bioaccumulation des HAPs. Enfin, Rajagopal et ses collaborateurs (2005b) ont souligné l'importance de maintenir les moules attachées sur un substrat lors des tests écotoxicologiques.

Encart 2. Distribution biogéographique de *Mytilopsis leucophaeata* et répartition spatiale de l'espèce en France (INPN-MNHN, 2020)



2 Déploiement des organismes par encagement

2.1 Provenance du matériel biologique

Pour *M. leucophaeata*, nous ne disposons pas d'une population maintenue en laboratoire depuis une ou plusieurs générations et les moules doivent donc être prélevées dans le milieu naturel. Les individus de *M. leucophaeata* utilisés lors des encagements proviennent de la « Rivière Morte » située à proximité de l'estuaire de La Touques et sur la commune du même nom. Ce site a été choisi car c'est celui qui, en début d'étude, abritait les individus les plus grands. Depuis plusieurs années de prospections sur ce site, l'eau s'y est révélée douce ou oligohaline, en fonction de la communication avec l'estuaire de La Touques. Ainsi, en 2020, la salinité mesurée ponctuellement a fluctué de 0,54 à 0,76 PSU mais elle s'est avérée nettement plus importante en 2021, de 1,83 à 12,86 PSU.

L'âge des individus récoltés à La Touques n'est pas connu mais comme ils appartiennent à la classe de taille la plus grande, ils sont aussi *a priori* les plus âgés. Il est à noter que la durée de vie maximale de *M. leucophaeata* a été estimée à 5 ans par Verween et al. (2006) mais cette donnée nécessiterait d'être confirmée. Les analyses histologiques des gonades permettent d'affirmer que les moules ont déjà acquis la maturité sexuelle.

 	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la fausse moule brune, <i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Taxon : MOLLUSQUE BIVALVE		
		Masse(s) d'eau		
		Continente	Transition	Littorale

2.2 Stabulation en laboratoire

Au laboratoire, les individus de *M. leucophaeata* sont débarrassés de leur éventuelle épifaune (principalement des balanes) et nettoyés. Ils sont triés par taille et seules les moules les plus grandes et d'une taille supérieure à 15 mm sont conservées pour l'étude des paramètres immunitaires. Des moules de taille < 15 mm mais > 10 mm peuvent être également retenues mais pour étudier des paramètres histologiques ou biochimiques (qui ne requièrent pas une taille minimale aussi importante que pour les paramètres immunitaires).

Les moules subissent une période d'acclimatation d'au minimum une semaine. Elles sont maintenues, en circuit fermé, dans des aquariums en verre remplis de 10 L d'eau avec un bullage constant. Les aquariums sont placés dans un incubateur thermorégulé et la température est fixée en fonction de la température de l'eau du site au moment du prélèvement ou progressivement adaptée à la température de l'eau des sites sur la période d'encagement prévue. Les moules ne subissent un éclairage que pendant la zootechnie (lumière éteinte dans l'incubateur). L'eau utilisée provient du site d'origine et elle est préalablement filtrée sur du papier filtre (plissé 400 mm ; D. Dutscher®) à l'aide d'une pompe à vide. L'eau est renouvelée tous les jours et un suivi des principaux paramètres physico-chimiques (*i.e.* pH, oxygène, composés azotés) est effectué pour s'assurer des bonnes conditions de stabulation des animaux.

Les moules sont nourries *ad libitum* à partir d'une culture de microalgues provenant elles-aussi du site d'origine. Cette culture correspond à un enrichissement de l'eau du site effectué préalablement (deux semaines minimum) à l'acclimatation. L'enrichissement est effectué dans des ballons de volume croissant placés devant des néons reproduisant la lumière naturelle avec une photopériode 16h jour : 8h nuit et l'apport régulier d'un milieu L-C medium comprenant de l'extrait de terre, des sels nutritifs et des vitamines (protocole de B. Le Roy ; Algobank, Unicaen).

Si possible une semaine (et au minimum 2 jours) avant l'encagement, les moules sont placées dans les cages, elles-mêmes plongées dans les aquariums en maintenant les mêmes conditions. La stabulation des individus avant encagement permet un contrôle des conditions expérimentales avant le déploiement sur site et également une certaine homogénéisation des lots de moules à encager. Ainsi, en fin de période de reproduction, certains individus d'une même population ont déjà émis toutes leurs gamètes (stade post-ponte) alors que d'autres en présentent encore (stade de maturité sexuelle et ponte) ; la stabulation et les stimuli engendrés par les changements d'eau permettent à l'ensemble des organismes d'émettre leurs gamètes de façon à ce qu'ils se retrouvent dans un statut reproducteur proche.

2.3 Conditions spécifiques d'encagement

L'encagement de *M. leucophaeata* est particulièrement facile du fait de la petite taille de l'espèce, de son mode de vie sessile et de son alimentation par filtration. Les moules vivent solidement fixées par leur byssus sur différents supports et dans les cages, elles se fixent sur les parois ou plus couramment les unes sur les autres formant ainsi des grappes.

Les moules sont placées dans des « petites cages » de dimension 20x5x5 cm en grillage de polyéthylène avec un vide de maille de 2 mm ; elles sont maintenues fermées à l'aide de colliers Colson®. Ces cages sont garnies de 100 individus mais compte tenu de la petite taille de l'espèce par rapport à la dimension des cages et des fortes densités parfois observées *in situ*, celles-ci pourraient en contenir davantage, a priori sans problème (~ 400 individus maximum). Ces cages sont elles-mêmes placées dans des cages de dimension supérieure (26x20x10 cm), confectionnées avec des poches à huîtres en polypropylène (vide maille de 5 mm) et également fermées avec des colliers Colson®.

Le dispositif dépend alors de la possibilité ou non de pouvoir suspendre les « grandes cages » à partir

d'un ponton ou d'une plateforme (**Encart 3**). Les « grandes cages » suspendues sont attachées par un bout et lestées par un petit IPN métallique. Le bout est ajusté de façon à ce que les cages soient plongées à une profondeur comprise entre 50 cm et 1,5m en fonction des milieux aquatiques. De telles cages permettent d'accueillir 4 « petites cages » et une sonde température de petite taille (sonde température) ou 3 « petites cages » et une sonde température-pression-salinité. Lorsque la suspension du dispositif n'est pas possible, celui-ci est fixé dans une cage encore plus grande (dimension de 50x50x36 cm) destinée à être posée. A l'intérieur, la fixation de la « grande cage » est faite à un niveau suffisamment haut pour que les « petites cages » contenant les moules ne soient pas en contact avec le fond (surtout s'il est meuble) et soient le moins impactées possible par la proximité du sédiment. La cage la plus grande est confectionnée à partir de poches à huîtres en polypropylène (vide maille de 15 mm) rigidifiées par des tubes plastiques en PVC.

A chaque visite sur le terrain (récolte des individus de la population d'origine, mise en cage, relevés successifs des cages à plusieurs dates), une sonde Hach HQ30d est utilisée pour mesurer la température, la conductivité et la salinité de l'eau. Les sites très variables du point de vue de la salinité sont instrumentés avec une sonde NKE® température-pression-salinité (TPS) STPS10 calibrée pour faire une mesure toutes les 15 min. La sonde TPS est placée à l'intérieur de la grande cage (suspendue) prenant ainsi la place d'une petite cage.

Encart 3. Photographies des cages utilisées pour l'encagements des individus de *Mytilopsis leucophaeata*.

En haut : système utilisé à partir d'un ponton ou d'un pont ; à gauche : cage destinée à recevoir les petites cages avec les moules avec son lest ; au centre : 3 cages destinées à accueillir les *M. leucophaeata* + une cage pour *D. polymorpha* (équipée d'une sonde température) ; à droite : descente de la cage dans l'eau

En bas : système utilisé quand il n'est pas possible de suspendre la cage (certaines rivières)



La durée d'encagement pour constater des effets de l'environnement sur les paramètres immunitaires a été testée avec trois durées : 1, 2 et 4 semaines (encagements à l'automne 2020). Des différences inter-sites deviennent significatives à partir de deux semaines et sont plus marquées après un mois d'encagement. *Mytilopsis leucophaeata* appartenant à la même famille que *Dreissena polymorpha* (F. des Dreissenidae) pour laquelle une durée de 21 jours a été constatée suffisante pour que des effets écotoxicologiques soient mesurables, une durée de 3 à 4 semaines peut être préconisée. En outre,

 	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la fausse moule brune, <i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Taxon : MOLLUSQUE BIVALVE		
		Masse(s) d'eau		
		Continente	Transition	Littorale

nous pouvons considérer qu'après une telle période, le stress dû à la transplantation elle-même est devenu négligeable.

A l'issue de la période d'encagement, les « petites cages » contenant les moules sont récupérées et directement plongées dans des seaux de 10 litres contenant l'eau du site d'encagement. Si la durée du trajet jusqu'au laboratoire n'excède pas 1h30, aucun système de bullage n'est utilisé dans la mesure où le volume d'eau par moule est suffisant. Pour un trajet plus long, il convient de prévoir un système d'aération (réglé sur un faible bullage car l'espèce affectionne un faible hydrodynamisme). En fonction du différentiel de température entre l'eau et l'air ambiant durant le transport, des glacières peuvent être utilisées pour le transport des moules.

Arrivées au laboratoire, les moules et les eaux des sites d'encagement sont transvasées dans des aquariums en verre remplis de 10 L d'eau avec un bullage constant (faible débit). Ces aquariums sont placés dans un incubateur thermorégulé mis à la température du site au moment du relevage des cages. Pour qu'elles puissent récupérer du stress engendré par le transport, les moules sont maintenues une nuit dans ces conditions avant d'être manipulées le lendemain.

3 Analyses des réponses biologiques

3.1 Réponse immunitaire

Pour l'analyse hématocytaire, l'hémolymphe est prélevée au niveau du muscle adducteur postérieur de chaque moule à l'aide d'une seringue à insuline (BD Micro-Fine™ Demi, 0,5ml, 0.33mm (29G) x 12,7mm) et déposé dans un microtube contenant 300 µl de tampon MPS (Marine Physiological Saline buffer ; *i.e.* 400 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 20 mM Hepes, 100 mM MgSO₄, pH 7,8). L'hémolymphe sera ensuite conservée sur glace avant les différentes analyses.

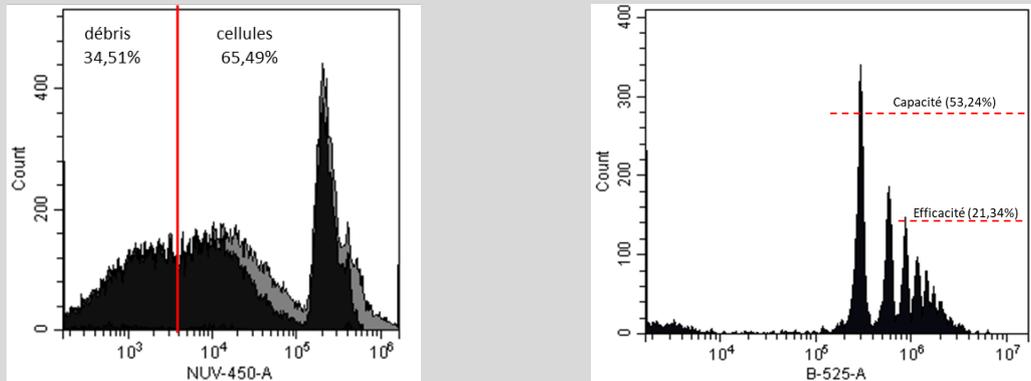
Afin d'estimer la densité hématocytaire, un comptage sur un hématimètre de Thoma est effectué sous microscope. La concentration cellulaire est ajustée à 100 000 cellules par échantillon dans des microtubes et le volume est complété à 250 µl avec du MPS de façon à avoir une densité cellulaire uniforme pour l'ensemble des échantillons.

Pour mesurer l'activité phagocytaire (capacité, efficacité et avidité hématocytaires), une concentration finale de 100 billes / cellule (microbilles Ø 1 µm yellow-green diluées dans du MPS) est ajoutée dans le milieu réactionnel. Les hématocytes sont alors incubés 1 heures à 17°C et à l'obscurité. Dix minutes avant la fin de l'incubation, une solution de Hoescht (1% concentration finale) est ajoutée dans chaque tube. A la fin de l'incubation, les cellules sont fixées au formaldéhyde (concentration finale 3,7%) et tous les échantillons sont conservés à 4°C et à l'obscurité jusqu'à l'analyse en cytométrie en flux.

La mesure au cytomètre en flux est réalisée à l'aide du CytoFLEX (Beckman Coulter®). Ce dernier est réglé pour considérer 10 000 événements marqués au Hoechst. Le Hoechst marque spécifiquement l'ADN et permet d'écarter les débris cellulaires. Après acquisition des données, celles-ci sont analysées avec le logiciel CytExpert (Beckman Coulter®), ce qui permet la détermination de la capacité phagocytaire (CP, % de cellules ayant phagocyté au moins 1 bille), de l'efficacité phagocytaire (EP, % de cellules ayant phagocyté au moins 3 billes) et de l'avidité (estimation du nombre moyen de billes ingérées par cellule) des hématocytes (**Encart 4**).

Encart 4. Dotplots pour la mesure des différents paramètres obtenus par cytométrie en flux.

A gauche : séparation des évènements cellulaires (Hoescht-positifs) et des débris (Hoescht-négatifs). A droite : capacité et efficacité phagocytaires avec l'intensité de fluorescence proportionnelle au nombre de billes ingérées par les hémocytes.



4 Analyses des taux de dommages à l'ADN des hémocytes

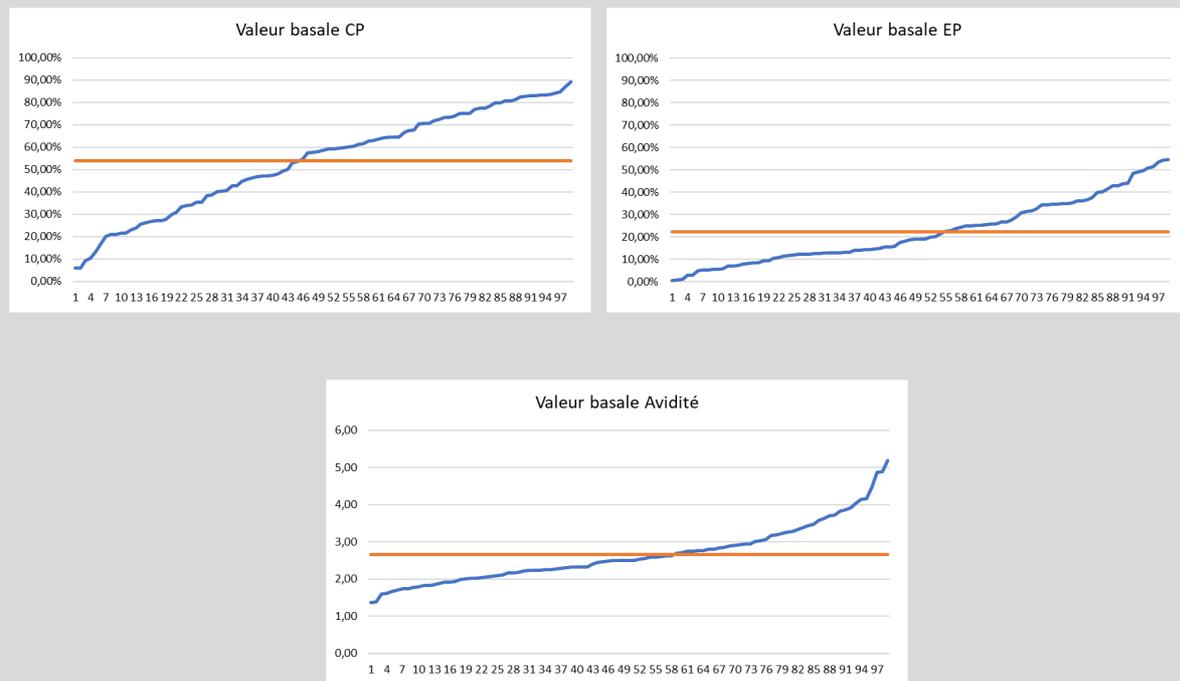
Comme pour l'ensemble des mollusques bivalves, la génotoxicité est évaluée sur les hémocytes après ponction de l'hémolymphe depuis le muscle adducteur postérieur de la fausse moule brune. Le milieu de conservation des cellules hémocytaires est le même que celui des analyses immunitaires par cytométrie en flux. L'évaluation de la génotoxicité par le test Comet en condition standard alcaline permet de mettre en évidence les cassures simple brins (Single Strand Breaks - SSBs), double brins (Double Strand Breaks - DSBs) et les sites alcali-labiles (Alkali-labile Sites - ALS). Le test Comet peut être réalisé selon la procédure détaillée dans Cant et al. (2022) sur 10 individus par station. Le niveau de dommage à l'ADN est quantifié par analyse d'images au moyen du logiciel COMET ASSAY IV et exprimé en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (Tail DNA percentage). Deux gels sont réalisés pour chaque individu et 100 comètes sont analysées par gel (moyenne des deux médianes des gels pour caractériser le niveau d'endommagement chez un individu).

5 Obtention des valeurs seuil et de référence

Après examen de l'ensemble des données expérimentales et de terrain obtenues lors des trois stages de Master 2 financés par le projet SASHIMI et lors des encagements de 2020 et 2021, les valeurs de référence des paramètres immunitaires de *M. leucophaeata* ont été fixées en considérant une sélection de 99 données. Ces données ont été choisies car elles correspondent à la transplantation d'une seule population sur des sites d'intérêt, ce qui garantit davantage d'homogénéité d'un point de vue génétique (biosurveillance active) que l'utilisation de diverses populations naturelles (biosurveillance passive). De plus, l'étude de populations naturelles comporte le risque d'analyser des individus déjà acclimatés à leur environnement (et moins susceptibles de répondre aux stress environnementaux). Cette sélection comprend 5 lots issus des jeux de données de 2020 et 2021 du programme Biosurveillance : la population d'origine, La Touques (TO, n = 20), Orne amont (OR1, n = 20), Orne aval (OR2, n = 19), Vire à la Meauffe (VI1 = 20) et Carentan (VI2 = 20). Le site portuaire de Ouistreham (OR3) ainsi que l'estuaire de l'Orne (OR4) qui le siège de très fortes variations de salinité et de mortalité de moules ont été exclus. Les données issues du programme SASHIMI (expérimentations en laboratoire et études *in situ* dans 4 sites) ont permis de conforter notre choix du jeu de données sélectionné.

Une valeur de référence, dite aussi basale, caractérise la réponse moyenne attendue en condition « ordinaire », c'est à dire non perturbée. Dans un premier temps, la distribution des données des paramètres immunitaires (CP, EP, avidité) est analysée (tests de Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors et Shapiro-Wilk ; Statistica). Pour chaque paramètre, la valeur moyenne du jeu de données est calculée et permet de définir la valeur de référence (**Encart 5**).

Encart 5. Graphiques représentant les valeurs des réplicats de chaque paramètre immunitaire (CP, EP et avidité) par rapport à leur valeur de référence (moyenne) (n = 99).



Les valeurs seuils permettent de définir une inhibition ou une induction par rapport à la valeur de référence traduisant un impact significatif de l'environnement sur les organismes. L'utilisation de *M. leucophaeata* en biosurveillance étant tout à fait récente avec très peu de recul, seul un seuil d'inhibition, plus facilement interprétable, a été retenu. Nous avons fixé ce seuil à une diminution d'un tiers (33%) de l'activité immunitaire, ce qui semble cohérent avec notre appréciation des milieux prospectés (**Encart 6**). Cette méthode est destinée à évoluer et être affinée avec l'acquisition de nouvelles données sur le terrain et expérimentations en laboratoire.

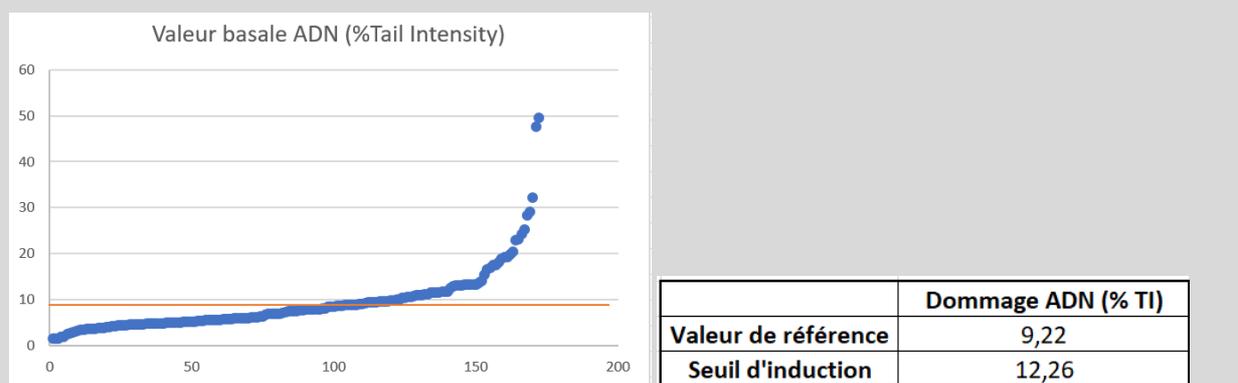
Encart 6. Valeurs de référence et seuils d'inhibition calculés pour la capacité phagocytaire (CP), l'efficacité phagocytaire (EP) et l'avidité grâce au jeu de données sélectionné (5 sites, n=99).

	CP (%)	EP (%)	Avidité (Nbre de billes / hémocyte)
Valeurs de référence	53,83	22,37	2,66
Seuils d'inhibition	36,07	14,99	1,78

Afin de constituer les valeurs de référence de génotoxicité chez la fausse moule brune *M. leucophaeata*, les essais ont été réalisés à partir de la population d'étude provenant du site de la « Rivière Morte » à proximité de l'estuaire de La Touques. Les essais de génotoxicité ont été réalisés au laboratoire UMR-I 02 SEBIO (Université de Reims) dans les 15 jours suivant le prélèvement des organismes sur le terrain. Les moules ont été maintenues en aquarium avec l'eau du site (renouvellement complet tous les deux-

trois jours) en condition thermostatée (température du terrain, oxygénation de l'eau par bullage, mesure des paramètres physico-chimiques de l'eau). Au total, deux campagnes ont été réalisées (mai et septembre 2021), la première ayant montré des résultats le plus souvent inexploitable en raison de l'état de maturation des organismes (« contamination » de l'échantillon biologique par les gamètes). En complément de ces campagnes (total de 82 individus) et comme pour les analyses d'immunotoxicité, il a également été considéré la sélection de 5 lots issus des jeux de données de 2020 et 2021 du programme Biosurveillance : la population d'origine, La Touques (TO, n = 13), Orne amont (OR1, n = 21), Orne aval (OR2, n = 18), Vire à la Meauffe (VI1 = 19) et Carentan (VI2 = 19), avec le traitement des échantillons le lendemain du prélèvement des organismes. Un total de 172 individus a ainsi été considéré permettant d'établir un niveau moyen d'endommagement à l'ADN des hémocytes de la fausse moule brune à 9,22 % Tail Intensity (moyenne des médianes) (**Encart 7**). Comme pour les analyses d'immunotoxicité, un seuil d'induction des dommages à l'ADN à 33% a été considéré chez la fausse moule brune, donnant une valeur seuil à 12,26 % Tail Intensity reflétant au-delà la contamination du milieu.

Encart 7. Graphique représentant les valeurs de la mesure d'endommagement à l'ADN par le test des comètes au niveau des hémocytes de la fausse moule brune, *Mytilopsis leucophaeata*, avec l'estimation de la valeur de référence (moyenne) et valeur seuil (33% d'induction) (n=172).



6 Grille de lecture

Compte tenu de la proximité taxinomique des deux espèces et de la cohérence de classification obtenue, la grille de lecture adoptée pour *M. leucophaeata* est strictement la même que celle optée pour *Dresseina polymorpha*. Pour chaque paramètre, la première étape consiste à classer les valeurs des réplicats (individus) en ordre croissant. Pour chaque site, sur ce jeu de données, nous déterminons ensuite le pourcentage de réplicats qui se situent en dessous du seuil d'inhibition (valeur de référence – 33% d'activité), ce qui permet d'associer le code couleur suivant :

- Vert : moins de 25% des réplicats dépassant le seuil ;
- Orange : entre 25% et 75% des réplicats dépassant le seuil ;
- Rouge : plus de 75 % des réplicats dépassant le seuil.

Lorsque différents sites sont classés en considérant les valeurs seuils, il apparaît que le classement diffère quelque peu selon le paramètre immunitaire considéré (**Encart 8**). Ceux qui nous semblent les plus pertinents et discriminants pour *M. leucophaeata* sont la capacité (CP) et l'efficacité phagocytaires (EP), l'un pouvant venir moduler l'autre. En revanche, dans l'état actuel de nos travaux, l'avidité, très peu variable selon les sites, ne permet pas de les discriminer et ne peut être considérée.

Encart 8. Exemple de classification de 4 stations du littoral normand étudiées dans le cadre de SASHIMI. Les sites sont classés selon les paramètres immunitaires (CP, EP et avidité) de populations naturelles de *M. leucophaeata* en 2020, 2021 et 2022, avec la prise en compte des % d'individus hors seuil (cf. classification précitée).

2020	CP	EP	Avidité
Marina de Carentan	25,00	25,00	0,00
Marina de Ouistreham	10,00	15,00	0,00
La Taute	60,00	70,00	10,00
La Touques (Rivière Morte)	26,32	26,32	0,00

2021	CP	EP	Avidité
Marina de Carentan	45,00	70,00	15,00
Marina de Ouistreham	20,00	40,00	0,00
La Taute	35,00	50,00	0,00
La Touques (Rivière Morte)	35,00	35,00	0,00

2022	CP	EP	Avidité
Marina de Carentan	20,00	55,00	50,00
Marina de Ouistreham	20,00	30,00	0,00
La Taute	30,00	60,00	10,00
La Touques (Rivière Morte)	15,00	50,00	20,00

7 Analyses additionnelles

En plus des biomarqueurs d'immuno- et génotoxicité, le stade de gamétogenèse des moules est systématiquement déterminé dans la mesure où, chez les bivalves, la reproduction impacte grandement la physiologie des organismes et potentiellement les biomarqueurs étudiés. Pour chaque site, la détermination du stade de gamétogenèse est faite sur un lot, si possible, de 30 moules spécialement dédiées à l'histologie. Cette dernière permet également de déterminer le genre de chaque individu et de calculer le sexe-ratio de la population étudiée. Dans le cas de *M. leucophaeata*, l'histologie comprend cinq principales étapes : la fixation pendant 48h (dans du liquide de Davidson dans lequel les moules sont plongées vivantes) ; la séparation de la chair de la coquille ; la déshydratation (dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes suivi d'un bain de butanol) ; la coupe (épaisseur de 3 µm) et la coloration au trichrome de Prenant-Gabe (Gabe, 1968). La lecture des lames est faite au microscope optique en utilisant une classification modifiée de Verween et al. (2009) chez *M. leucophaeata* et de Juhel et al. (2003) chez *D. polymorpha*.

Par ailleurs, la chair des moules dont l'hémolymphe a été prélevée pour l'analyse des paramètres immunitaires est disponible pour d'autres biomarqueurs. Le fait d'étudier plusieurs types de biomarqueurs sur un même individu permet de les confronter entre eux et en fonction de divers environnements. Ainsi, les chairs peuvent être utilisées pour étudier des biomarqueurs biochimiques tels que des niveaux d'activités enzymatiques impliquées dans la régulation du stress oxydant et la détoxification (e.g. catalases, glutathion-S-transferases, malondialdéhyde ; Séguin, 2016). Chez les bivalves, le dosage du glycogène est également très intéressant car ce composé constitue une forme majeure des réserves

 	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la fausse moule brune, <i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Taxon : MOLLUSQUE BIVALVE		
		Masse(s) d'eau		
		Continente	Transition	Littorale

énergétiques et il illustre en partie l'état physiologique de l'animal. Le niveau des réserves dépend bien sûr de la richesse trophique du milieu mais un stress environnemental (*e.g.* contamination) peut se traduire par une diminution de ces réserves. *Mytilopsis leucophaeata* offrant peu de matériel biologique, l'utilisation du kit Glycogen Assay kit MAK016 (Sigma Aldrich®) est particulièrement adaptée pour doser le glycogène sur la fraction S9 de tissus préalablement préparés (congélation flash, broyage ...). Ce dosage se base sur l'hydrolyse puis l'oxydation du glucose donnant un produit qui réagit avec la peroxydase, générant un produit coloré détectable et quantifiable lors de la lecture en microplaque.

Références bibliographiques

- Deaton, L., Derby, J, Subhedar, N., Greenberg, J., 1989. Osmoregulation and salinity tolerance in two species of bivalve mollusc: *Limnoperna fortunei* and *Mytilopsis leucophaeata*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 133, 67-79.
- Flemming, A.T., Weinstein, J.E., Lewitus, A.J., 2008. Survey of PAH in low density residential stormwater ponds in coastal South Carolina: false dark mussels (*Mytilopsis leucophaeata*) as potential biomonitors. Mar. Pollut. Bull., 56, 1598-1608.
- Florin, A.B., Mo, K., Svensson, F., Schagerström, E., Kautsky, L., Bergström, L., 2013. First records of Conrad's false mussel, *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad, 1831) in the southern Bothnian Sea, Sweden, near a nuclear power plant. Bioinvasions Rec., 2(4), 303-309. doi: <http://dx.doi.org/10.3391/bir.2013.2.4.07>
- Juhel, G., Culloty, S., O'Riordan, R., O'Connor, J., De Faoite, L., Mc Namara, R., 2003. A histological study of the gametogenic cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) in Lough Derg, Ireland. J. Moll. Stud., 69, 365-373.
- Kennedy, V.S., 2011. The invasive dark false mussel *Mytilopsis leucophaeata* (Bivalvia: Dreissenidae): a literature review. Aquat. Ecol., 45, 163-183.
- Nyst, P-H (1835) Mollusques. Bulletin de l'Académie Royale des Sciences II: 235-237
- Rajagopal, S., Van der Graag, M., Van der Velde, G., Jenner, H.A., 2005a. Upper temperature tolerances of the exotic brackish-water mussel, *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad): an experimental study. Mar. Environ. Res., 60, 512-530.
- Rajagopal, S., Van der Velde, G., Van der Graag, M., Jenner, H.A., 2005b. Byssal detachment underestimates tolerance of mussels to toxic compounds. Mar. Pol. Bull., 50, 20-29.
- Séguin, A., 2016. Evaluation de l'effet des contaminants et de l'environnement sur les bivalves marins et saumâtres par la mise en œuvre d'une batterie de biomarqueurs : approches en milieu contrôlé et *in situ*. Thèse d'Université de Caen-Normandie, 347 p.
- Van der Velde, G., Hermus, K., Van der Gaag, M., Jenner, H.A., 1992. Cadmium, zinc and copper in the body, byssus and shell of the mussels, *Mytilopsis leucophaeata* and *Dreissena polymorpha* in the Noordzeekanaal of the Netherlands. In: Neumann D, Jenner HA (Eds) The zebra mussel *Dreissena polymorpha*, Limnol Aktuell, 4, 213-226.
- Verween, A., Vincx, M., Degraer, S., 2009. Seasonal variation in gametogenesis and spawning of *Mytilopsis leucophaeata*, an invasive bivalve in Europe. J. Molluscan Stud., 75(3), 307-310. DOI: [10.1093/mollus/eyp015](https://doi.org/10.1093/mollus/eyp015)
- Verween, A., Vincx, M., Degraer, S., 2010. *Mytilopsis leucophaeata*: The brackish equivalent of *Dreissena polymorpha*? A review. In: Van der Velde G, Rajagopal S, bij de Vaate A (Eds), The zebra mussel in Europe, Margraf, pp 29-44.
- Verween, A., Vincx, M., Mees, J., Degraer, S., 2005. Seasonal variability of *Mytilopsis leucophaeata* larvae in the harbour of Antwerp: implications for ecologically and economically sound biofouling control. Belgian J. Zool., 135, 91-93.

 	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la fausse moule brune, <i>Mytilopsis leucophaeata</i>	Taxon : MOLLUSQUE BIVALVE		
		Masse(s) d'eau		
		Continente	Transition	Littorale

WORMS (World Register of Marine Species). Photogallery "*Mytilopsis leucophaeata*". <https://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=700&pic=5647>

Zhulidov, A., Kozhara, A., Van der Velde, G., Leuven R., Son, M., Gurtovaya, T., Zhulidov, D., Napela, T., Santiago-Fandino, V., Chuikov, Y., 2018. Status of the invasive brackish water bivalve *Mytilopsis leucophaeata* (Conrad, 1831) (Dreissenidae) in the Ponto-Caspian region. *Bioinvasions Rec.*, 7(2), 111-120.

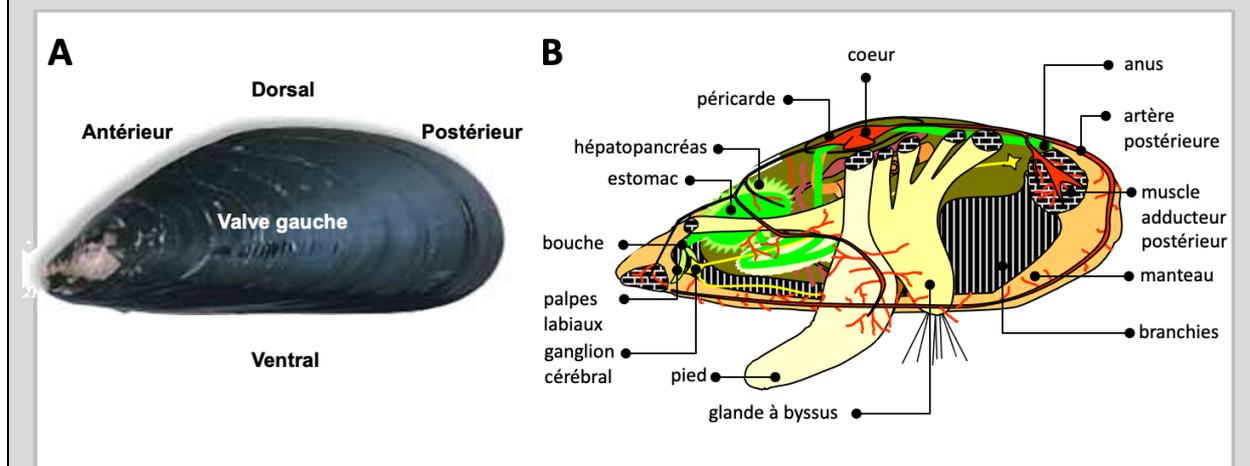
Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la moule bleue, *Mytilus edulis*

1 Présentation du modèle biologique, *Mytilus edulis*

L'espèce *Mytilus edulis* (**Encart 1**) pourra être mobilisée comme un modèle mollusque pour investiguer les masses d'eau littorales.

Mytilus edulis est un mollusque appartenant au groupe des bivalves Ptériomorphes. Colonisant les substrats subtidaux et intertidaux des côtes maritimes froides et tempérées, il est largement répandu dans les zones littorales et estuariennes de l'Atlantique Nord, incluant les régions fortement anthropisées des continents européens et américains. Ces organismes sessiles et filtreurs sont communément utilisés comme sentinelles dans les programmes de biosurveillance en écotoxicologie depuis des années 70' (Goldberg et al., 1983; Beyer et al., 2017; Świacka et al., 2019). Du fait de son intérêt socio-économique et écologique, c'est une espèce dont la biologie est bien documentée (Gosling, 2015).

Encart 1. A, photographie d'une moule commune avec les orientations anatomiques de référence. B, description anatomique de la masse viscérale (crédits : F. Le Foll, UMR-I 02 SEBIO).



2 Déploiement des organismes par encagement

2.1 Provenance du matériel biologique

Les moules proviennent d'une exploitation mytilicole sur la côte ouest du Cotentin (M. Emmanuel Charbonnier, SCEA La Bouchot d'Agon, 50560 Blainville-sur-mer).

Alternativement, des spécimens sauvages peuvent être collectés dans des moulières naturelles du littoral.

L'approvisionnement auprès d'une source conchylicole permet une meilleure maîtrise de paramètres importants en biosurveillance, comme le fond génétique intraspécifique, l'état sanitaire et l'imprégnation chimique. Sur le plan génétique, le genre *Mytilus* forme un complexe d'organismes dotés d'un pan-

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la moule bleue, <i>Mytilus edulis</i>		Taxon : MOLLUSQUE BIVALVE		
			Masse(s) d'eau		
	Continentale	Transition	Littorale		

génomique dont 25 % des gènes peuvent être absents ou présents d'un individu à l'autre (Gerdol et al., 2019). De plus, ces organismes ont une capacité à produire des hybrides par introgression génétique à partir des espèces présentes sur les côtes françaises, essentiellement *M. galloprovincialis*, *M. edulis* et *M. trossulus* (Bierne et al., 2003). Ainsi, l'utilisation d'une source mytilicole unique permet de limiter les variations génétiques inter-individuelles. En outre, le respect des normes sanitaires en termes de contamination biologique et chimique est garanti.

Après collecte, les spécimens sont rapidement acheminés à sec sur lit de glace. Les moules adultes dont la coquille fait 3 à 4 cm de long sont sélectionnées et immergées dans des bacs de stabulation au laboratoire (voir section 2.2).

2.2 Stabulation au laboratoire

Les organismes doivent être maintenus une quinzaine de jours en laboratoire. Cette période permet de les accoutumer à l'expérimentation et favorise la dépuraison de contaminants qu'ils auraient pu accumuler dans le milieu naturel.

Au laboratoire, les moules sont maintenues dans des bacs pourvus d'un filtre mécanique, d'un filtre biologique et d'un écumeur. Ces bacs doivent être préalablement équilibrés (idéalement 7 jours en eau, avec la filtration active et sans organismes). L'oxygénation est constante et la densité de la population stabulée respecte de préférence le ratio de 1 individu pour 0,5 litres d'eau de mer. L'espace zootechnique doit permettre une régulation de la température proche de celle du milieu naturel ou, à défaut, 15°C.

Durant cette période, il est préconisé de nourrir les organismes deux fois par semaine avec un aliment adapté comme la *LPB Frozen Shellfish diet* (Planktovie SAS, Marseille, France) en coupant la filtration jusqu'à clarification des bacs. La physicochimie du milieu doit être suivie régulièrement et l'eau de stabulation renouvelée au regard des concentrations d'ammonium et de nitrites.

2.3 Conditions spécifiques d'encagement

Les encagements se déroulent sur une période de 15 jours. Cette durée est notamment contrainte par le calendrier de marée, pour les encagements sur l'estran. Elle permet d'accéder à des stations immergées à marée basse de vive haut et accessibles par coefficient minimum de l'ordre de 80.

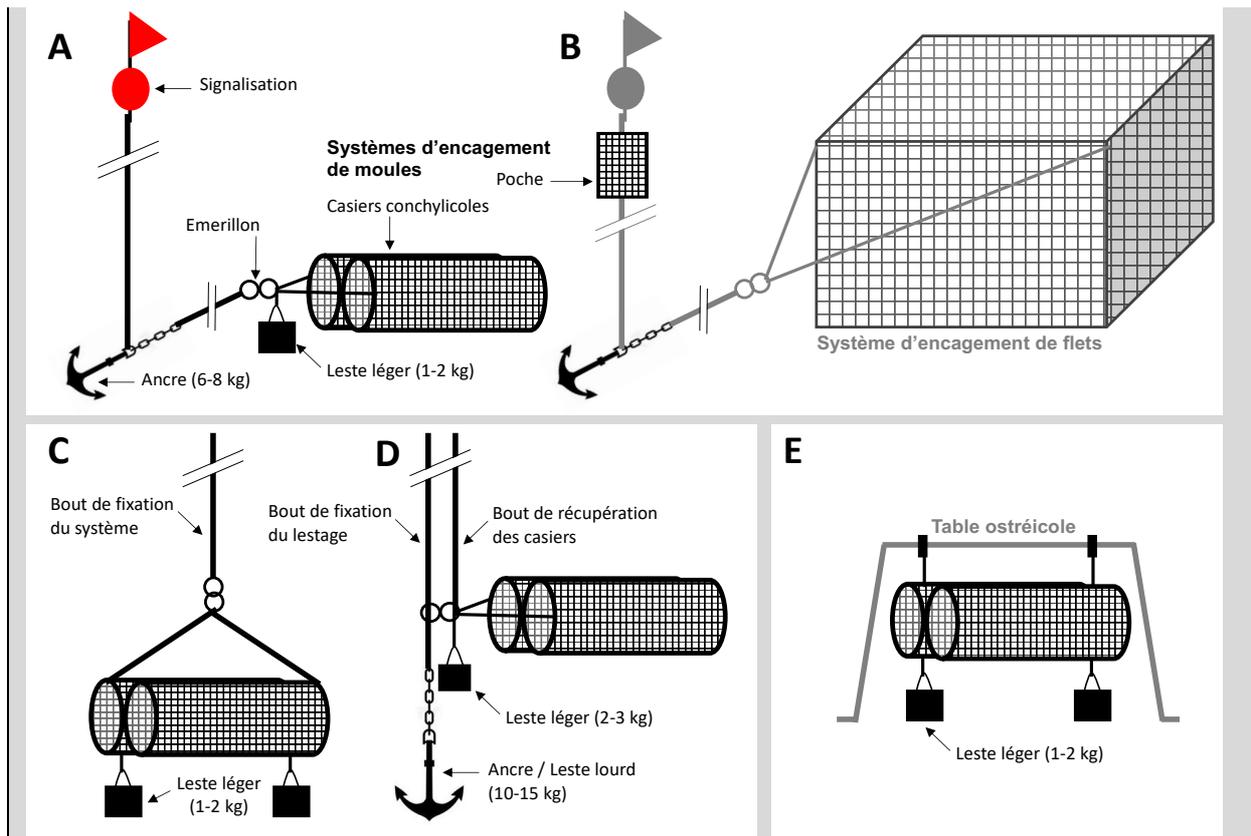
Les moules pourront être encagées dans des systèmes de poches ou de casiers conchylicoles (*i.e.* $L \leq 100$ cm ; $\varnothing \leq 40$ cm). L'utilisation de tels systèmes permettra une grande plasticité de déploiement de lots importants de moules, typiquement 50 à 500 par casier (**Encart 2**), tels que :

- (1) montage de type filière avec lestage ou encrage (à adapter en fonction de l'exposition au courant) pour les déploiements depuis un embarcadère ou en pleine mer depuis une embarcation,
- (2) amarrage, à marée basse, sur des structures naturelles ou artificielles de l'estran (*e.g.* enrochements ou installations conchylicoles),
- (3) directement arrimés sur d'autres structures d'encagement plus imposantes (*e.g.* cages à poissons).

Il est recommandé de prévoir 2 fois plus d'organismes que nécessaires pour couvrir les besoins analytiques.

Encart 2. Schémas illustratifs de quelques configurations testées pour le déploiement du système d'encagement des moules *Mytilus sp.* (crédits : B. Xuereb, UMR-I 02 SEBIO).

Déploiement en pleine mer, dans des casiers en montage de type filière (**A**) ou dans une poche arrimée à la bouée de signalisation d'une structure d'encagement de poissons (**B**). Déploiement dans des casiers depuis un embarcadère faiblement exposé (**C**) ou fortement exposé (**D**) au courant. Fixation sur une installation ostréicole (**E**).



A l'issue de la période d'encagement, les organismes survivants devront être immédiatement comptabilisés avant d'être rapatriés au laboratoire dans les meilleurs délais. Les organismes seront stabulés de préférence dans l'eau de la station étudiée, à température proche de celle du milieu, sur une période ≤ 48 h, en attendant d'être étudiés pour les analyses de biomarqueurs.

Avant tout encagement, il est important de faire une demande d'occupation du domaine maritime auprès des autorités compétentes et des opérationnels de la mer (e.g. Direction Départementale des Territoires et de la Mer pour le domaine public ; Service de la direction aéroportuaire du Conseil Départemental pour les ports de plaisance ; Service environnement pour les Grands Ports industriels ; Ostréiculteurs).

3 Analyses de la réponse immunitaire

L'analyse de la réponse immunitaire est pratiquée à partir d'un échantillon d'hémolymphe frais qui contient les hémocytes circulants. La réponse immunitaire des organismes est étudiée au travers de l'activité de phagocytose des hémocytes. Chaque spécimen est traité individuellement, à raison d'un minimum de 10 spécimens par station d'encagement.

La viabilité et la densité cellulaire du prélèvement sont mesurées par cytométrie en flux, immédiatement après le prélèvement, *i)* pour s'assurer de la qualité de l'échantillon et *ii)*, pour permettre de normaliser la quantité de cellules utilisées pour le test de phagocytose. Il est recommandé de veiller aux points suivants pour évaluer la fonction phagocytaire dans de bonnes conditions.

- Il est primordial d'obtenir une suspension cellulaire mono-dispersée lors du prélèvement alors même que les hémocytes de *Mytilus edulis* ont tendance à former des agrégats cellulaires lorsqu'ils sont manipulés. En conséquence, il convient de les porter à la température de 4°C

dans une solution anticoagulante d'Alsever et de contrôler la qualité du prélèvement (**encart 3, Figure 1**).

- La densité cellulaire est donnée par la numération des évènements dans la région des hémocytes. Celle-ci est identifiée au regard de la structure taille *versus* complexité donnée par la confrontation des canaux FSC et SSC¹.
- La mortalité cellulaire est donnée par la numération des évènements positifs à l'IP² dans région des hémocytes. En opposition, les cellules vivantes qui n'ont pas intégrées l'IP présentent un niveau d'autofluorescence beaucoup plus faible.

Le test de phagocytose consiste à mesurer l'incorporation de microbilles de polystyrènes fluorescentes traitées au carboxylate (fluorospheres Yellow-Green 2 µm, ref F8827 Thermofisher, I_{ex} 505 nm/I_{em} 515 nm) par des hémocytes adhérents (**Encart 3**). Pour cela :

- Un volume d'hémolymphe est déposé dans les puits d'une microplaque. De sorte à permettre leur adhérence au support, les hémocytes sont incubés 30 min à 15°C avant l'ajout des microbilles fluorescentes.
- La réplicabilité de la mesure repose sur la détermination d'un paramètre expérimental correspondant à la probabilité de rencontre entre un hémocyte et une microparticule. Pour les hémocytes de *Mytilus edulis* déposés sur la surface de 0,316 cm² d'un puits de microplaque 96 puits, de bons résultats sont obtenus avec 150 000 hémocytes et un *ratio* de 50 billes de 2 µm par hémocyte à 15°C pendant 2 heures.
- Deux heures après la mise en présence des billes et des hémocytes, les cellules sont décollées et analysées immédiatement au cytomètre en flux. La détection des évènements est conditionnée à un critère FSC-H excluant les billes non phagocytées (taille relative > 2,5 µm) dans le canal PerCP-H (I_{ex} 488 nm/I_{em} 575/30 nm), décalé vers les grandes longueurs d'ondes par rapport au pic d'émission, ce qui permet d'analyser les phagocytoses multiples des microbilles Yellow-Green très brillantes.
- Le nombre de billes incorporées par les hémocytes est déterminé par les fluorescences cellulaires PerCP-H dans une région d'intérêt (*gate*) déterminée sur le graphe bi-paramétrique FSC/SSC en fonction des valeurs de taille et complexité des hémocytes. Trois paramètres sont calculés :
 - (1) la capacité phagocytaire qui correspond au pourcentage de cellules ayant phagocyté 1 bille et plus,
 - (2) l'efficacité phagocytaire qui correspond au pourcentage de cellules ayant phagocyté 3 billes et plus,
 - (3) l'avidité qui est une estimation du nombre moyen de billes ingérées par cellule. Cette valeur est calculée en faisant le ratio entre la fluorescence moyenne des phagocytes efficaces et de la fluorescence d'une bille.

Encart 3. Procédure pour l'analyse de la réponse immunitaire par cytométrie en flux chez *Mytilus edulis*.

Les valves sont entrouvertes, un volume d'hémolymphe -typiquement 500 µL- est prélevé à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille de 22 gauge par ponction dans le muscle adduction postérieure (A) et déposé dans un microtube, maintenu à 4°C sur lit de glace. Un volume de 100 µL d'hémolymphe est mélangé à 100 µL de solution

¹ FSC : Foward Scatter Channel ; SSC : Side Scatter Chanel ; on utilise plus exactement le FSC-H et le SSC-H, en analysant la hauteur des signaux.

² IP : l'iodure de propidium est une sonde fluorescente (λ_{ex}/λ_{em} : 490/549-720 nm) couramment utilisée comme marqueur de l'ADN afin de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (phénomène caractéristique de la nécrose).

anti-agrégation reformulée d'après Alsever (ALS³, Le Foll et al., 2010). Cette suspension cellulaire mono-dispersée est immédiatement analysée pour obtenir la numération, la viabilité et la formule cellulaire du prélèvement (B). Les résultats obtenus permettent de déterminer les volumes à déposer en microplaque pour réaliser le test de phagocytose sur 150 000 hémocytes à raison de 50 billes (*i.e.* microbilles de carboxylate Ø 2 µm, λ_{ex}/λ_{em} : 505/515 nm) par hémocyte dans 200 µL de solution saline physiologique marine MPSS⁴ q.s.p (Riout et al., 2014). Les hémocytes sont incubés 30 min à 15°C pour favoriser l'adhésion du tapis cellulaire. Le test de phagocytose est mené pendant 2 h à 15°C sur les cellules en mono-couche. Avant analyse, les puits sont aspirés puis rincés deux fois à l'ALS froid pour décoller les hémocytes et les passer en tubes de cytométrie.

La suspension cellulaire est analysée à l'aide d'un cytomètre Nococyte 3000 (Agilent) en fixant les conditions d'arrêt à 50 000 hémocytes ou 100 µL avec une vitesse de passage limitée à 30 µL/min. Paramétrage du mélange automatique fixé à 1500 rpm, 10 s, avec accélération sur 2 s.

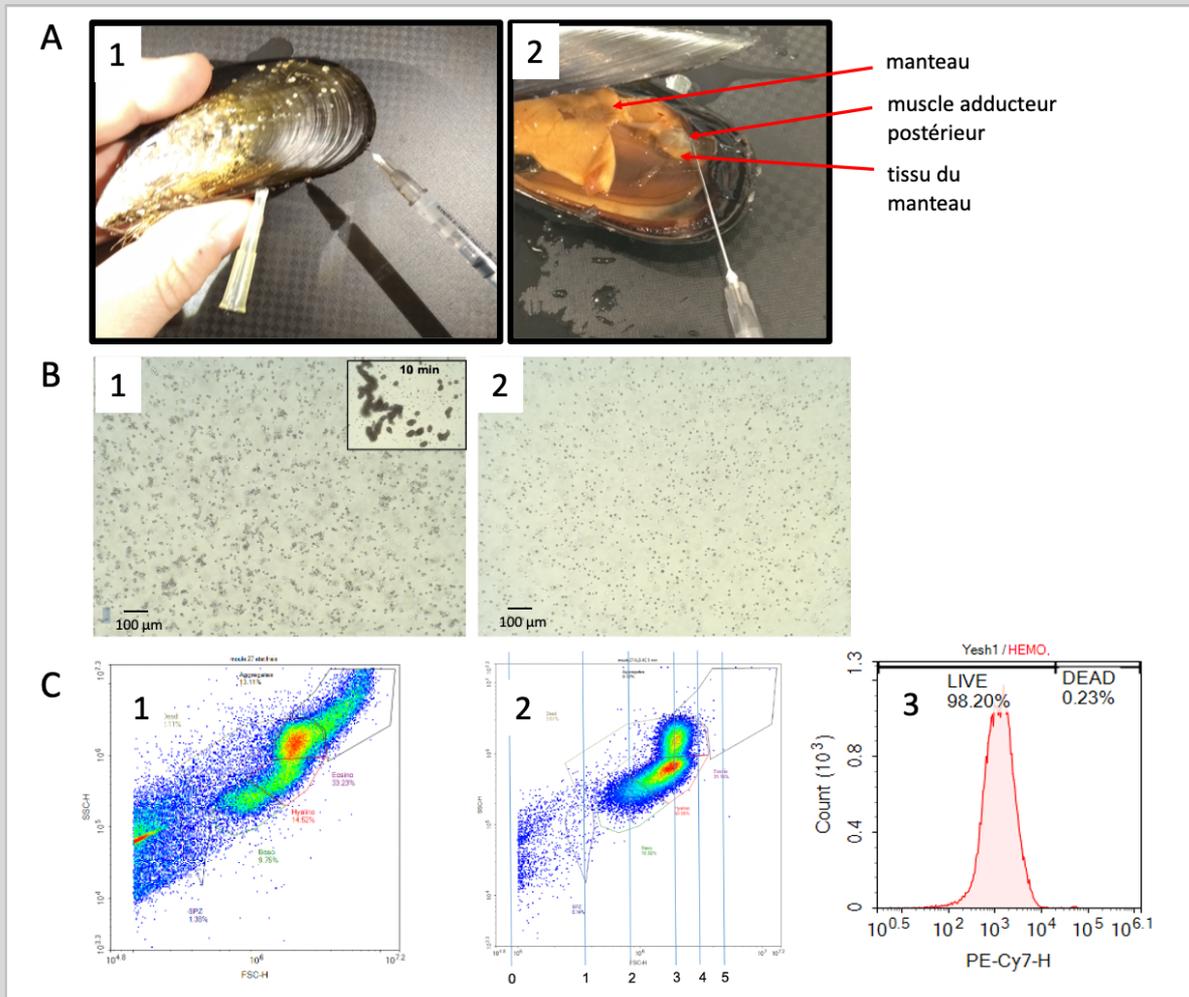
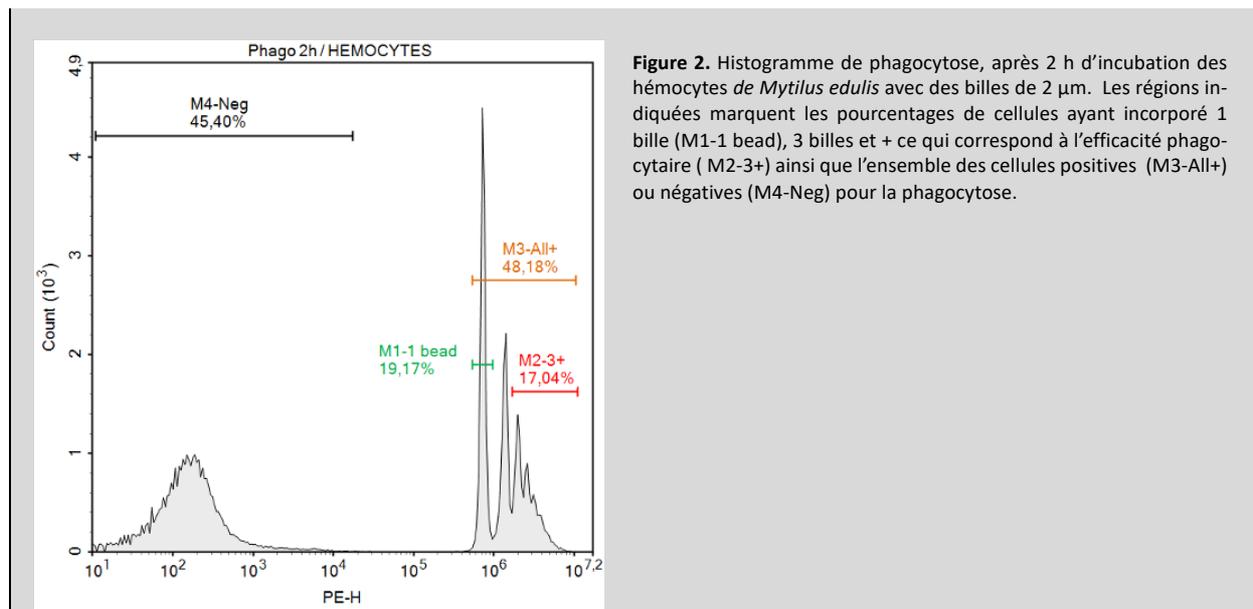


Figure 1. Analyse de la qualité des prélèvements d'hémocytes de *Mytilus edulis*. A, illustrations (1) présentant la technique de prélèvement par ponction dans le muscle adducteur postérieur, après écartement des deux valves et (2) le positionnement de l'aiguille vu après résection de la valve gauche. B, micrographie à faible grossissement d'une suspension cellulaire agrégée (1) dans l'hémolymphe pure (en encart après 10 min d'incubation à 15°C, même grossissement) et (2) d'un mélange 50/50 hémolymphe ALS correctement mono-dispersé. C, (1) cytogramme en *dotplot* bi-paramétrique taille/complexité (FSC-H/SSC-H) d'un prélèvement avec agrégats (la région en haut à droite est peuplée), et (2) d'un prélèvement correctement monodispersé (la région en haut à droite est vide). Les verticales sont des marqueurs de taille (d'après calibration du FSC avec des billes de polystyrène) : 2 µm (0), 4,5 µm (1), 9 µm (2), 18 µm (3), 30 µm (4), 46 µm (5). L'histogramme (3) illustre la viabilité typique des hémocytes après prélèvement et marquage à l'iodure de propidium.

³ ALS : Alsever's Solution, une solution calcium-free, classiquement utilisée comme anticoagulant chez les bivalves (*i.e.* 300 mM NaCl, 100 mM Glucose, 30 mM citrate de sodium, 26 mM acide citrique, 10 mM EDTA, pH 5.4).

⁴ MPSS : Marine Physiological Saline Solution (*i.e.* 470 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 47.7 mM MgSO₄, pH 7.8).



4 Analyses des taux de dommages à l'ADN des hémocytes

Comme pour l'ensemble des mollusques bivalves, la génotoxicité est évaluée sur les hémocytes après ponction de l'hémolymphe depuis le muscle adducteur postérieur. Le milieu de conservation des cellules hémocytaires est le même que celui des analyses immunitaires par cytométrie en flux. L'évaluation de la génotoxicité par le test Comet en condition standard alcaline permet de mettre en évidence les cassures simple brins (Single Strand Breaks - SSBs), double brins (Double Strand Breaks – DSBs) et les sites alcali-labiles (Alkali-labile Sites - ALS). Le test Comet peut être réalisé selon la procédure détaillée dans Cant et al. (2022) sur 10 individus par station. Le niveau de dommage à l'ADN est quantifié par analyse d'images au moyen du logiciel COMET ASSAY IV et exprimé en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (Tail DNA percentage). Deux gels sont réalisés pour chaque individu et 100 comètes sont analysées par gel (moyenne des deux médianes des gels pour caractériser le niveau d'endommagement chez un individu).

5 Définition des valeurs seuils pour les réponses immunitaires et les taux de dommages à l'ADN

L'approche utilisée est basée sur celle proposée par Besse et al. (2013) et utilisée pour plusieurs modèles biologiques dans le projet. Pour cela, nous avons tout d'abord compilé les données recueillies lors de deux campagnes d'encagement, en 2020 et 2021, dans 10 stations réparties sur le littoral normand (354 individus pour les réponses immunitaires et 164 individus pour les dommages à l'ADN). Les données ont ensuite été ordonnées, pour chaque biomarqueur, par ordre croissant (**Encart 4**).

Pour déterminer les seuils, trois cas de figure peuvent être rencontrés :

- i) pour les biomarqueurs dont seule l'induction était pertinente au regard des connaissances *a priori* sur ces biomarqueurs et des données que nous avons obtenues lors des encagements, nous avons calculé un seuil d'induction. Pour cela, nous avons tiré aléatoirement un échantillon de 30 valeurs dans l'ensemble du jeu de données. Ensuite, les valeurs de dommage les plus fortes ont été retirées jusqu'à ce que les données de l'échantillon suivent une loi normale (*i.e.* vérification *via* un test de Shapiro, seuil de significativité à 5 %). La valeur du 95^{ème} percentile de la distribution de l'échantillon

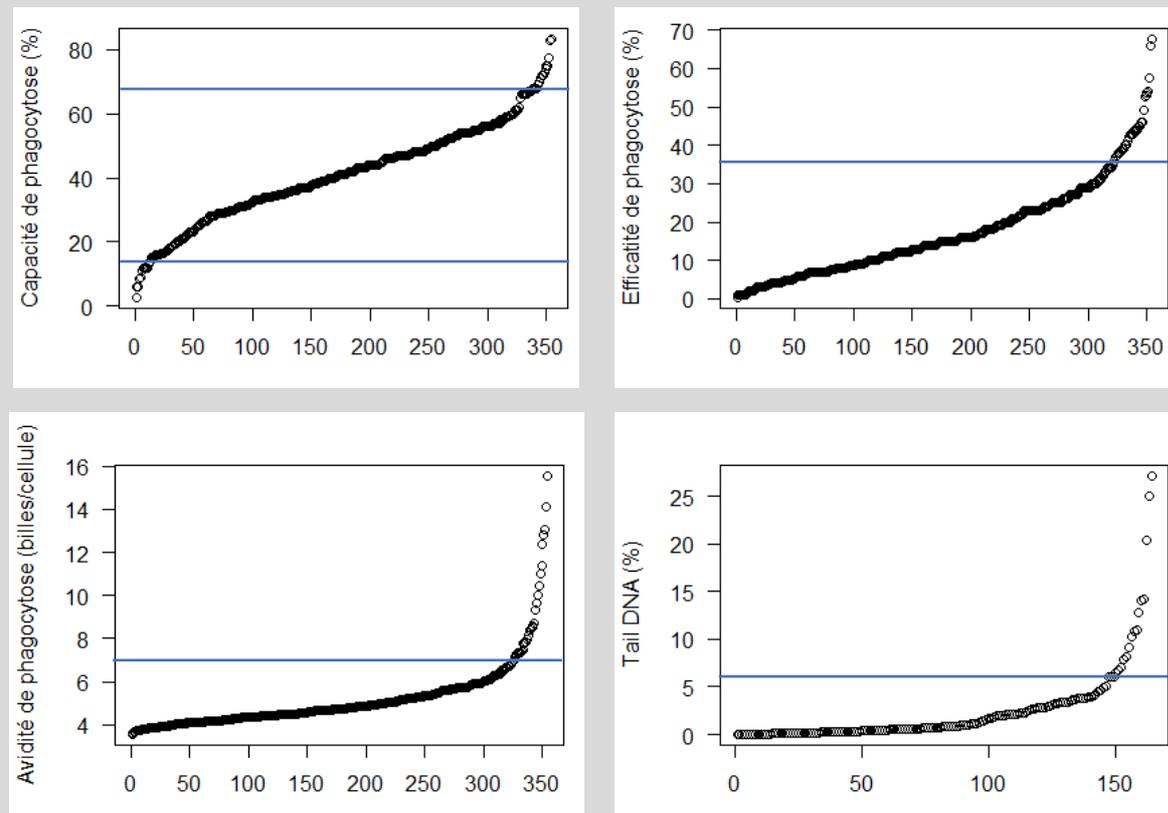
était alors déterminée. Afin de garantir la robustesse du seuil, cette procédure a été réitérée 1000 fois et la valeur du seuil a été calculée comme étant la moyenne des 1000 percentiles ainsi déterminés.

ii) pour les biomarqueurs dont seule l'inhibition était pertinente au regard des connaissances *a priori* sur ces biomarqueurs et des données que nous avons obtenues lors des encagements, nous avons calculé un seuil d'inhibition. Pour cela, nous avons tiré aléatoirement un échantillon de 30 valeurs de dommages dans l'ensemble du jeu de données. Ensuite, les valeurs de dommage les plus faibles ont été retirées jusqu'à ce que les données de l'échantillon suivent une loi normale (vérification *via* un test de Shapiro, seuil de significativité à 5 %). La valeur du 5^{ème} percentile de la distribution de l'échantillon était alors déterminée. Afin de garantir la robustesse du seuil, cette procédure a été réitérée 1000 fois et la valeur du seuil a été calculée comme étant la moyenne des 1000 percentiles ainsi déterminés.

iii) pour les biomarqueurs dont les effets peuvent se traduire aussi bien par une induction ou une inhibition de la réponse, les deux méthodes précédemment décrites ont été réalisées pour estimer de manière séparée un seuil d'induction et un seuil d'inhibition à la différence que les seuils étaient calculés en utilisant une sous-partie du jeu de donnée total (*i.e.* 65 % des valeurs les hautes pour le seuil d'induction et 65 % des valeurs les plus basses pour le seuil d'inhibition).

Encart 4. Valeurs individuelles classées par ordre croissant pour les biomarqueurs d'immunotoxicité (n=354) et de génotoxicité (n=164) pour la moule bleue *Mytilus edulis*.

Les lignes bleues correspondent aux seuils d'induction et/ou d'inhibition des différents marqueurs.



Les différents seuils sont annotés dans l'Encart 5. Toute la méthodologie d'estimation des valeurs de référence et seuil a été implémentée et réalisée à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2020).

Pour l'interprétation de résultats dans un contexte de biosurveillance, nous proposons d'utiliser une méthode pour chaque biomarqueur et chaque station basée sur le rapport entre le nombre de réplicats dépassant la ou les valeur(s) seuil(s) par rapport au nombre total de réplicats analysés par station et par biomarqueur. Ce rapport permettra de fournir une grille de lecture de la réponse des marqueurs en lien avec la proportion de réplicats dépassant la ou les valeur(s) seuil(s). A titre d'exemple, ce rapport pourrait retranscrire un « état de référence » lorsque moins de 25 % des réplicats dépassent les seuils, un « effet marqué » entre 25 % et 75 % des réplicats dépassant les seuils et un « effet très marqué » au-delà.

Encart 5. Valeurs des seuils pour les marqueurs d'immunotoxicité et de génotoxicité.

Biomarqueur	Capacité de phagocytose	Efficacité de phagocytose	Avidité de phagocytose	Tail DNA
Unité	%	%	billes / hémocyte	%
Seuil induction	66,94	37,02	6,83	6,34
Seuil inhibition	15,39			

Références bibliographiques

- Beyer, J., Green, N.W., Brooks, S., Allan, I.J., Ruus, A., Gomes, T., Bråte, I.L.N., Schøyen, M., 2017. Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Mar. Environ. Res.* 130, 338–365. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>
- Bierne, N., Borsa, P., Daguin, C., Jollivet, D., Viard, F., Bonhomme, F., David, P., 2003. Introgression patterns in the mosaic hybrid zone between *Mytilus edulis* and *M. galloprovincialis*. *Mol. Ecol.* 12, 447–461. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01730.x>
- Gerdol, M., Moreira, R., Cruz, F., Gómez-Garrido, J., Vlasova, A., Rosani, U., Venier, P., Naranjo-Ortiz, M.A., Murgarella, M., Balseiro, P., Corvelo, A., Frias, L., Gut, M., Gabaldón, T., Pallavicini, A., Canchaya, C., Novoa, B., Alioto, T.S., Posada, D., Figueras, A., 2019. Massive gene presence/absence variation in the mussel genome as an adaptive strategy: first evidence of a pan-genome in Metazoa. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/781377>
- Goldberg, E.D., Koide, M., Hodge, V., Flegal, A.R., Martin, J., 1983. U.S. Mussel Watch: 1977–1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 16, 69–93. [https://doi.org/10.1016/0272-7714\(83\)90095-1](https://doi.org/10.1016/0272-7714(83)90095-1)
- Gosling, E., 2015. *Marine Bivalve Molluscs*, 2nd Edition. ed. Wiley–Blackwell, Chichester, UK ; Hoboken, NJ.
- Le Foll, F., Rioult, D., Boussa, S., Pasquier, J., Dagher, Z., Leboulenger, F., 2010. Characterisation of *Mytilus edulis* hemocyte subpopulations by single cell time-lapse motility imaging. *Fish Shellfish Immunol.* 28, 372–386. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.11.011>
- Rioult, D., Pasquier, J., Boulangé-Lecomte, C., Poret, A., Abbas, I., Marin, M., Minier, C., Le Foll, F., 2014. The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquat. Toxicol.* 153, 98–109. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.012>
- Świacka, K., Maculewicz, J., Smolarz, K., Szaniawska, A., Caban, M., 2019. Mytilidae as model organisms in the marine ecotoxicology of pharmaceuticals - A review. *Environ. Pollut.* 254, 113082. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113082>

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le gammare, <i>Gammarus fossarum</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le gammare, *Gammarus fossarum*

1 Présentation du modèle biologique, *Gammarus fossarum*

L'espèce *Gammarus fossarum* pourra être mobilisée comme un modèle crustacé pour investiguer les masses d'eau continentales (**Encart 1**). En effet, cet arthropode amphipode présente de nombreux avantages à être déployé lors des campagnes de biosurveillance active. Sa biologie, sa physiologie et l'impact de facteurs environnementaux sur de nombreuses réponses ou marqueurs sont connus (Kunz et al., 2010). De part sa place dans la chaîne alimentaire (décomposeur et source de nourriture pour de nombreuses espèces), il tient un rôle important dans les écosystèmes (Macneil et al., 1997). Enfin, cet organisme sensible à la pollution de l'eau a déjà fait ses preuves pour la surveillance de la qualité des eaux continentales.

Encart 1. A gauche : couple de gammares en période de reproduction avec une femelle (en-dessous) et un mâle (au-dessus). A droite : un gammare femelle en début de cycle de reproduction possédant des embryons dans la poche marsupiale (crédit : norme Afnor XP T 90-721).



2 Déploiement des organismes par encagement

2.1 Provenance du matériel biologique

Les gammares proviennent d'un milieu naturel, au niveau d'une ancienne cressonnière, sur la commune du Bugey à Saint-Maurice-de-Rémens (Ain, longitude : 5°15'42.0"E, latitude :45°57'16.8"N). Les canaux, dont l'eau provient d'un tronçon non-pollué du cours d'eau Pollon, sont riches en *G. fossarum* et permettent un approvisionnement en organismes quelle que soit la saison.

2.2 Stabulation au laboratoire

Une fois arrivés au laboratoire, les gammares sont placés dans des aquariums de 10 litres, maximum 2000 individus par aquarium dans l'eau du site de prélèvement, à 12°C, avec une oxygénation constante et une photopériode jour/nuit de 8h/12h. Ils sont nourris ad libitum à partir de feuilles d'aulne rincées (*Alnus sp*) et des larves de tubifex à raison de deux fois par semaine. Les aquariums sont alimentés en continu avec une eau contrôlée provenant d'un forage, afin d'acclimater progressivement les organismes aux conditions du laboratoire et ceci pour au moins deux semaines avant leur utilisation pour les bioessais. Le jour ou la veille du bioessai, les organismes sont triés en fonction du sexe, et seuls les gammares

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le gammare, <i>Gammarus fossarum</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

mâles serviront à la biosurveillance active. Les individus femelles se reconnaissent par des gonades noires ou des embryons dans une poche incubatrice ventrale (**Encart 1**). La veille du dépôt sur les diverses stations, les gammarses seront mis en cage et maintenus dans les mêmes conditions de stabulation.

2.3 Conditions spécifiques d'encagement

Les cages correspondent à des pots percés de 6 cm de diamètre (**Encart 2**). Vingt gammarses mâles seront positionnés par cage. Neuf cages seront placées par station étudiée, deux serviront pour les analyses de la génotoxicité et sept pour les autres réponses, notamment immunitaires, portant le nombre de gammarses à 180 par station. Le design et les caractéristiques de ces cages sont décrits dans la norme Afnor « Qualité de l'eau – Encagement *in situ* de gammarses pour la mesure de la bioaccumulation de substances chimiques XP T 90-721 » (Afnor, 2019). Chaque cage sera identifiée à l'aide d'une étiquette plastifiée sur son couvercle (nomenclature de la station, cage pour la génotoxicité ou pour les autres réponses). Une fois les 20 individus mis dans les cages, des feuilles d'aulne seront ajoutées pour permettre l'alimentation des organismes durant l'exposition. Ces cages seront ensuite disposées dans des seaux de 10 L identifiés pour chaque station avec de l'eau du laboratoire et un bullage pour une durée maximale de 24h avant leur mise en place sur le terrain.

Durant le transport, le système de bullage sera coupé, le brassage de l'eau occasionné par les vibrations du véhicule de transport suffira à oxygéner le milieu. En fonction de la température extérieure et celle des sites d'étude, les seaux pourront être disposés dans des glacières réfrigérées pour éviter un choc thermique. Sur site, ces cages seront ensuite fixées au niveau d'un seau percé et lesté par son fond. Une sonde de température sera accrochée au seau afin de l'enregistrer continuellement lors de l'encagement (fréquence d'enregistrement toutes les heures). Il conviendra d'accrocher la corde à un arbre ou autre structure robuste et d'éviter qu'elle ne soit trop visible afin de réduire les risques de vandalisme. Les seaux seront ensuite placés dans la colonne d'eau à une profondeur d'un à deux mètres en dessous de la surface.

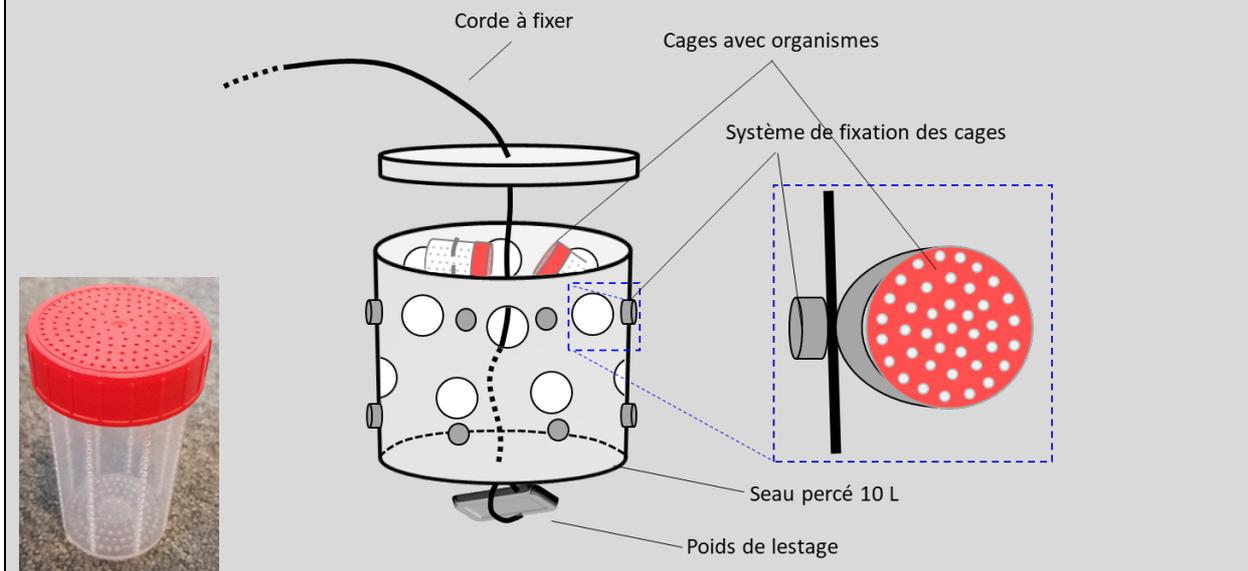
Les paramètres physico-chimiques (température, conductivité, pH, oxygénation) seront mesurés lors de l'encagement et lors de la récupération des organismes à l'aide d'une sonde multiparamétrique. Les encagements seront réalisés pour une période de 7 jours.

3 Analyses de la réponse immunitaire

3.1 Protocole de mesure

Les analyses immunitaires seront réalisées en suivant le protocole établi par Barjhoux et al. (2020). L'hémolymphe contenant les cellules impliquées dans l'immunité, les hémocytes, sera prélevée à l'aide d'un capillaire en verre non coâté relié à une pompe à doigt entre le deuxième et le quatrième segment dorsal (**Encart 3**). Pour cela, les gammarses seront anesthésiés sur glace et une goutte d'hémolymphe sera obtenue à l'aide d'une perforation par une aiguille d'une seringue 0,3mL BD Micro-Fine™ Demi. Afin d'obtenir assez d'hémolymphe pour les analyses, le prélèvement est réalisé sur un pool de cinq gammarses. L'hémolymphe sera ensuite conservée dans une solution de HBSS directement dans une plaque d'analyse de 96 puits (plaque 1) et déposée sur glace avant les différentes analyses. La qualité du prélèvement sera observée et la concentration cellulaire calculée par microscopie après coloration des noyaux cellulaires avec un colorant vital (Hoescht). Des microbilles fluorescentes de 2 µm de diamètre seront ensuite ajoutées dans les puits afin d'obtenir à un ratio de 200 billes pour un hémocyte. Les hémocytes seront incubés 4 heures à 16°C à l'obscurité.

Encart 2. A gauche : cage percée pour l'encagement d'une vingtaine de gammars. A droite : système d'encagement avec le seau contenant 9 cages de gammars et une sonde de température (un seau par station ; crédits : norme Afnor XP T 90-721A et Le Guernic, UMR-I 02 SEBIO)).



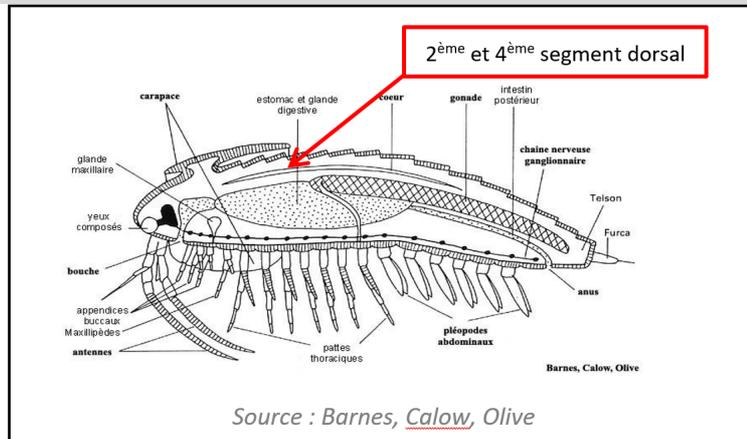
Différents paramètres peuvent être mesurés grâce à la cytométrie en flux : la mortalité hémocytaire ainsi que la capacité, l'efficacité et l'avidité de la phagocytose. Dix minutes avant la fin de l'incubation, les solutions cellulaires seront récupérées et transvasées dans une plaque de lecture (plaque 2) et un mélange trypsine – EDTA sera ajouté dans la plaque 1 afin de récupérer les hémocytes adhérents. Juste avant lecture, les échantillons respectifs seront poolés dans la plaque 2 et l'iodure de propidium sera ajouté afin de marquer les cellules avec une forte perméabilité membranaire, témoin potentiel de mortalité cellulaire. La lecture se fera à l'aide d'un filtre 533/30 90% pour les mesures de phagocytose et d'un filtre 670/LP pour la mesure de mortalité sur la région cellulaire.

- La mortalité cellulaire est mesurée *via* l'augmentation de la fluorescence des cellules ayant internalisé l'iodure de propidium (cf. **Encart 3** en bas à gauche).
- La fluorescence dans le vert augmente proportionnellement au nombre de microbilles ingérées par la cellule. Cela va permettre de distinguer des populations de cellules ayant phagocyté de 0 à X billes. La capacité de phagocytose est déterminée par le pourcentage de cellules phagocytantes (à partir de 1 bille/cellule), l'efficacité de phagocytose par le pourcentage de cellules ayant ingéré au moins trois billes/cellule et l'avidité de phagocytose correspond au nombre moyen de billes ingérées par cellule et est calculée par le ratio de la moyenne de fluorescence de la capacité de phagocytose sur la moyenne de fluorescence liée à l'ingestion d'une seule bille (cf. **Encart 3** en bas à droite).

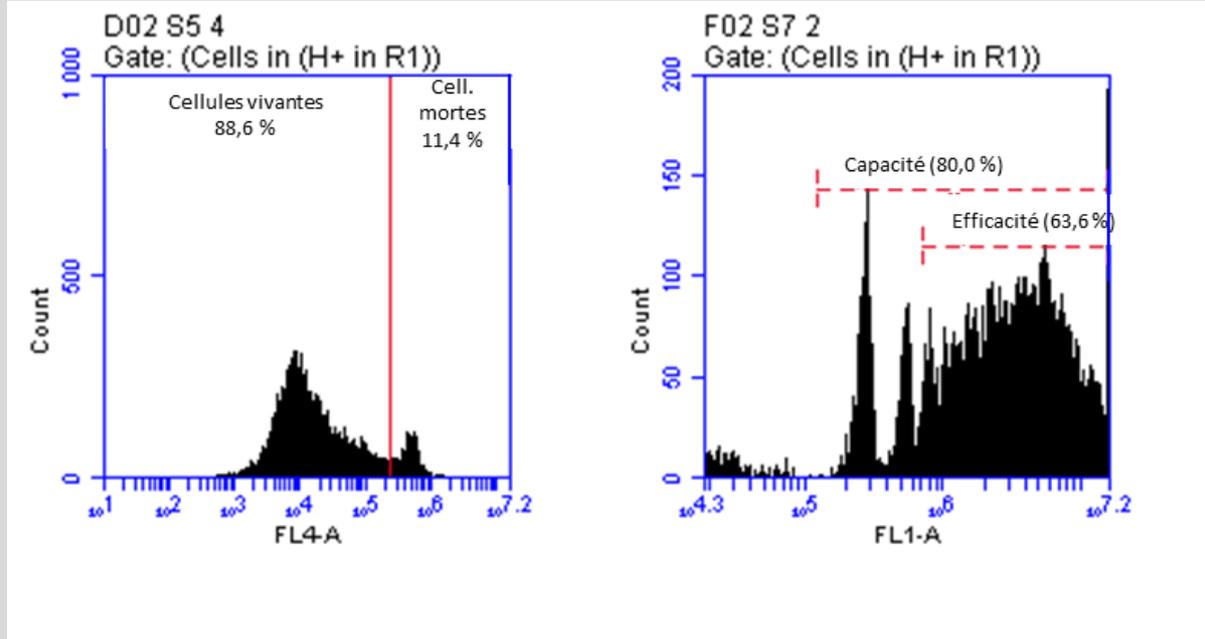
Encart 3. En haut à gauche : matériel nécessaire à la récupération de l'hémolymphe du gammare. En haut à droite : dessin anatomique du gammare précisant le lieu de prélèvement de l'hémolymphe. En bas : Dotplots pour la mesure des différents paramètres obtenus par cytométrie en flux. En bas à gauche : marquage des cellules mortes par intégration et fluorescence de l'iodure de propidium. En bas à droite : capacité et efficacité de phagocytose avec l'intensité de fluorescence proportionnelle au nombre de cellules ingérées par les hémocytes.



Source : Magalie DELORME-CHARLE



Source : Barnes, Calow, Olive



3.2 Obtention des valeurs seuil et de référence

Un jeu de données des biomarqueurs immunitaires gammares est obtenu sur différentes campagnes terrain, cumulant 20 sites avec un N = 4 pools de l'hémolymphe de 5 gammares. Contrairement à la dreissène, l'approche basée sur la distribution réalisée par le Dr Christelle Lopes (LBBE, Lyon 1) sur la méthodologie développée par Besse et al. (2013) n'a pas été concluante. Plusieurs hypothèses peuvent être soulevées pour expliquer cela. Tout d'abord, le nombre de données récoltées était potentiellement trop faible (N = 4 pools pour le gammare contre N = 10 individus pour la dreissène). Une autre explication pourrait être liée au faible nombre d'événements obtenus lors des acquisitions en cytométrie en flux comparé à celui obtenu sur la moule zébrée. Une autre méthodologie a donc été employée : les données sont classées par ordre croissant, puis l'amplitude maximum de réponse est calculée. La mé-

diane de cette distribution constitue donc la valeur de référence. Contrairement à la dreissène, l'amplitude de réponses observée chez le gammare étant importante, les seuils d'induction et d'inhibition sont donc considérés pour chaque immunomarqueur. Le seuil d'induction est donc représenté par le quartile supérieur et le seuil d'inhibition par le quartile inférieur. Ces valeurs de référence et seuil sont annotées dans l'**Encart 4**.

Encart 4. Valeurs de référence et seuils pour les marqueurs d'immunotoxicité et de génotoxicité.

Biomarqueur	Capacité de phagocytose	Efficacité de phagocytose	Avidité de phagocytose	Tail DNA
Unité	%	%	billes / hémocyte	%
Référence	60,83	31,40	5,46	10,12
Seuil induction	80,69	58,21	9,39	18,54
Seuil inhibition	42,20	17,55	3,88	

3.3 Grilles de lecture

Les grilles de lecture des résultats seront obtenues en comparant les réplicats pour chaque biomarqueur et chaque station avec la ou les valeur(s) seuil(s) correspondante(s) (**Encart 5**). Ce rapport, entre le nombre de réplicats dépassant la ou les valeur(s) seuil(s) par rapport au nombre total de réplicats analysés par station et par biomarqueur, permettra d'afficher un code couleur. Ce rapport est vert lorsque moins de 25% des réplicats dépassent les seuils, orange entre 25% et 75% des réplicats dépassant les seuils et rouge au-delà.

Encart 5. Exemple de grille de lecture des résultats. Le rapport dans le tableau correspond au nombre de réplicats dépassant la ou les valeur(s) seuil(s) par rapport au nombre total de réplicats analysés par station et par biomarqueur.

Station	Biomarqueur 1	Biomarqueur 2	Biomarqueur 3	Biomarqueur 4
Station 1	5/12	10/12	9/11	13/15
Station 2	1/12	1/14	2/14	2/13
Station 3	13/14	8/13	8/14	8/14
Station 4	6/13	2/12	4/11	5/12
Station 5	12/14	2/11	3/14	2/14
Station 6	12/14	11/15	2/12	3/13

Moins de 25% des réplicats dépassent les seuils

Entre 25 et 75% des réplicats dépassent les seuils

Plus de 75% des réplicats dépassent les seuils

4 Analyses des taux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes

4.1 Protocole de mesure

Pour le gammare, la génotoxicité sera évaluée sur les gamètes mâles prélevés depuis la gonade (**Encart 6**). Les gonades seront prélevées sur des mâles en ouvrant la cuticule sur un flanc après avoir euthanasié les gammars et ôté le tube digestif ainsi que le caecum. Les deux gonades de trois individus seront récupérées délicatement puis déposées et dilacérées dans une solution de PBS. La moitié de cette solution servira à réaliser un test de viabilité par le kit live « dead sperm viability » afin d'observer toute cytotoxicité trop élevée. Le reste de la solution cellulaire servira ensuite à réaliser le test Comet.

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le gammare, <i>Gammarus fossarum</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Celui-ci pourra être réalisé selon la procédure détaillée dans Cant et al. (2022) sur 5 pools de 3 individus par station. L'évaluation de la génotoxicité par le test Comet en condition standard alcaline permet de mettre en évidence les cassures simple brins (Single Strand Breaks - SSBs), double brins (Double Strand Breaks – DSBs) et les sites alcali-labiles (Alkali-labile Sites - ALS). Le niveau de dommage à l'ADN sera quantifié par analyse d'image au moyen du logiciel COMET AYSSAY IV et exprimé en pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (Tail DNA percentage). Deux gels seront réalisés pour chaque pool et 50 comètes seront analysées par gel.



4.2 Obtention des valeurs seuil et de référence et grilles d'interprétation

Les dommages à l'ADN (Tail DNA percentage) ont été évalués sur des spermatozoïdes d'organismes non encagés, servant de lot témoin. A partir de ce lot (N = 10 pools de 3 gammares), la médiane de la distribution constitue la valeur de référence, tandis que le quartile supérieur (75 %) renseigne sur le seuil d'induction (**Encart 4**). Seul ce seuil est considéré pour les analyses génotoxiques. L'interprétation au sein des grilles de lecture reste identique aux autres biomarqueurs (**Encart 5**).

5 Analyses additionnelles

5.1 Etat des réserves énergétiques et allocation de l'énergie (CEA)

En plus de l'indice de condition le dosage des réserves énergétiques et l'étude de l'allocation de l'énergie renseignent sur l'état global de santé des organismes encagés. Pour cela, la teneur en lipides, glyco-gène, protéines et sucres libres seront analysées à partir d'un pool de gammares afin d'avoir assez de matériel biologique et pour réduire la variabilité individuelle. Les dosages des réserves énergétiques seront réalisés à partir des protocoles mis au point par Van Handel (1985a et 1985b) et Plaistow et al (2003). De plus, l'activité du système de transport des électrons (ETS) sera mesurée pour évaluer la consommation d'énergie et permettra, avec les réserves énergétiques, de calculer la CEA selon cette formule :

$$\text{CEA} = \text{somme des réserves énergétiques (mJ/mg/h)} / \text{ETS (mJ/mg/h)}$$

5.2 Enzymes digestives

Le métabolisme énergétique peut être mis en relation avec l'activité d'enzymes digestives. Pour cela des activités de l'amylase, de la lipase, de la lactate déshydrogénase (LDH), de la phosphatase acide

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le gammare, <i>Gammarus fossarum</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

(PAC), de la phosphatase alcaline (PAL), de l'alanine aminotransférase (ALAT) et de l'aspartate aminotransférase (ASAT) seront mesurées selon Hani et al. (2018).

Références bibliographiques

- Afnor, 2019. Qualité de l'eau – Encagement in situ de gammarès pour la mesure de la bioaccumulation de substances chimiques XP T 90-721.
- Barjhoux, I., Rioult, D., Geffard, A., Ladeiro, M.P., 2020. A new protocol for the simultaneous flow cytometric analysis of cytotoxicity and immunotoxicity on zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) hemocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 98, 224–235.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Res.* 47, 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>
- Cant, A., Bonnard, M., Porcher, J.-M., Prygiel, J., Catteau, A., Delahaut, L., Palluel, O., Turiès, C., Geffard, A., Bado-Nilles, A., 2022. Integration of Genotoxic Biomarkers in Environmental Biomonitoring Analysis Using a Multi-Biomarker Approach in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758). *Toxics* 10, 101. <https://doi.org/10.3390/toxics10030101>
- Hani, Y.M.I., Marchand, A., Turies, C., Kerambrun, E., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Porcher, J.-M., Geffard, A., Dedourge-Geffard, O., 2018. Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. *PLOS ONE* 13, e0194932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194932>
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus* spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 205, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer, New York, NY, pp. 1–76. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-5623-1_1
- Macneil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (crustacea: amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biol. Rev.* 72, 349–364. <https://doi.org/10.1017/S0006323196005038>
- Plaistow, S.J., Bollache, L., Cézilly, F., 2003. Energetically costly precopulatory mate guarding in the amphipod *Gammarus pulex*: causes and consequences. *Anim. Behav.* 65, 683–691. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2116>
- Van Handel, EMILE, 1985. Rapid determination of glycogen and sugars in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1, 299–304.
- Van Handel, Emilie, 1985. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1, 302–304.

Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette blanche, *Palaemon longirostris*

1 Présentation du modèle biologique, *Palaemon longirostris*

L'espèce *Palaemon longirostris* pourra être mobilisée comme un modèle crustacé pour investiguer les masses d'eau de transition (**Encart 1**).

En effet, la crevette bouquet, *P. serratus*, est un crustacés décapode de l'infra-ordre des Caridae, famille des Palaemonidae. Inféodée aux masses d'eau estuariennes (e.g. décrit dans Arousseau, 1984 ; Béguer et al., 2010), elle est parfaitement adaptée aux variations de salinité (Gonzalez-Ortegon et al., 2006). Cette espèce a été recensée dans de nombreux estuaires de la façade Atlantique Est (i.e. du Maroc jusqu'au îles Britanniques) et de la Manche. La durée de vie de l'espèce a été estimée à 2 ans pour une taille maximale d'environ 70 mm. Les études menées sur l'estuaire de la Gironde montrent que sa répartition le long du gradient de salinité est dépendante du sexe des individus et de la saison. En effet, les mâles se retrouvent préférentiellement dans la zone mésohaline (i.e. salinités de 5 à 18), alors que les femelles peuplent d'avantage les eaux oligohalines à douces (i.e. salinités de 0 à 5). Il peut être souligné que les femelles migrent à la rencontre des mâles en zone mésohaline, entre mars et avril (i.e. fin d'ovogénèse), pour la ponte et l'accouplement. Les femelles regagnent ensuite l'estuaire amont. Les embryons restent accrochés sous l'abdomen de la femelle durant le développement. Les larves zoés éclosent entre Juin et Juillet. Il faut moins de 6 mois pour la nouvelle cohorte atteigne la maturité sexuelle.

Encart 1. Photographie d'une crevette blanche, *Palaemon longirostris* (Erraud et al., 2018 ; à gauche) et description morphologique de *Palaemon* sp en vue latérale (crédit : A. Duflot, UMR SEBIO ; à droite).



2 Déploiement des organismes par encagement

2.1 Provenance du matériel biologique

En l'absence d'une source stabilisée d'approvisionnement (e.g. production en crevetteculture), les spécimens de *P. longirostris* sauvages doivent être directement prélevés en milieu naturel. Les spécimens adultes de crevette blanche peuvent être collectés, en quantités suffisantes, le long du gradient de salinité dans la zone mésohaline des gros estuaire (e.g. l'estuaire de la Seine). De la fin du printemps à

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette blanche, <i>Palaemon longirostris</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continente	Transition	Littorale

l'automne, la collecte peut être effectuée depuis la berge au moyen d'un balancier à crevette. Il conviendra de vérifier la réponse des biomarqueurs suivis après collecte, de sorte à garantir un état de référence avant encagement.

Une détermination taxonomique (selon la méthode de Gonzalez-Ortegon et Cuesta, 2006) et une détermination du sexe (selon la méthode décrite dans Erraud, 2018) doivent être réalisées pour ne préserver que les spécimens ciblés. Pour les marqueurs dont il est question ici, seuls les mâles seront ciblés pour garantir un minimum de variabilité intrinsèque (*e.g.* liée au sexe ou à l'ovogénèse).

Après capture, les spécimens doivent être rapidement conditionnés dans des contenants remplis d'eau du milieu de prélèvement et aérée au moyen de fines bulles durant leur rapatriement au laboratoire, dans les meilleurs délais. La température et la salinité du milieu doivent être immédiatement enregistrées pour permettre d'anticiper l'acclimatation progressive aux conditions de laboratoire (voir section 2.2).

2.2 Stabulation au laboratoire

Les organismes doivent être maintenus, de préférence, une quinzaine de jours en laboratoire. Cette période permet de les accoutumer à la manipulation et favorise la dépuraison de contaminants qu'ils auraient pu accumuler dans le milieu naturel.

A leur arrivée, les spécimens doivent être progressivement acclimatés aux conditions de laboratoire (*i.e.* température, gisement d'eau, éventuellement salinité), avant d'être conditionnés dans des bacs ou aquariums placés sous filtration (*i.e.* mécanique et biologique) et oxygénation constante, respectant de préférence une densité de 1 individu pour 1 litre. L'espace zootechnique doit permettre une régulation de la température proche de celle du milieu naturel.

L'environnement de stabulation doit être enrichi avec des refuges (*e.g.* modules grillagés en polypropylène, tronçons de tubes PVC, de demi pots en terre cuite) de sorte à réduire le stress des organismes, ainsi que le cannibalisme. De même, il convient de favoriser un éclairage doux pour minimiser le stress.

Durant cette période, il est préconisé de nourrir les organismes avec une fréquence et une alimentation adaptée (*e.g.* tous les 2 jours avec des cubes de krills et mysides et/ou de pellets de crevetteculture). Les restes de nourriture doivent être retirés après nourrissage. La physicochimie du milieu doit être suivie régulièrement et le milieu de stabulation renouvelé au regard des concentrations d'ammonium.

Les spécimens de crevettes provenant du milieu naturel, il est recommandé de valider l'état initial du gisement utilisé au regard des connaissances *a priori* (*e.g.* les valeurs de référence), en amont du déploiement. Pour ce faire, les différents biomarqueurs ciblés par la suite, pourront être mesurés sur un lot de spécimens, à l'entrée au laboratoire, puis à ± 24 h du déploiement des premiers encagements.

2.3 Conditions spécifiques d'encagement

Les encagements se déroulent sur une période de 15 jours, par homologie à l'encagement de la crevette bouquet.

Les crevettes pourront être encagées dans des systèmes de casiers enrichis avec des supports et des refuges, en respectant de préférence une densité de 1 individu pour 1 litre, de sorte à réduire le stress, ainsi que le cannibalisme. Le format de type « casier à crevette » (*i.e.* $L \leq 100$ cm ; $\varnothing \leq 40$ cm) permettra une grande plasticité de déploiement (**Encart 2**), tels que :

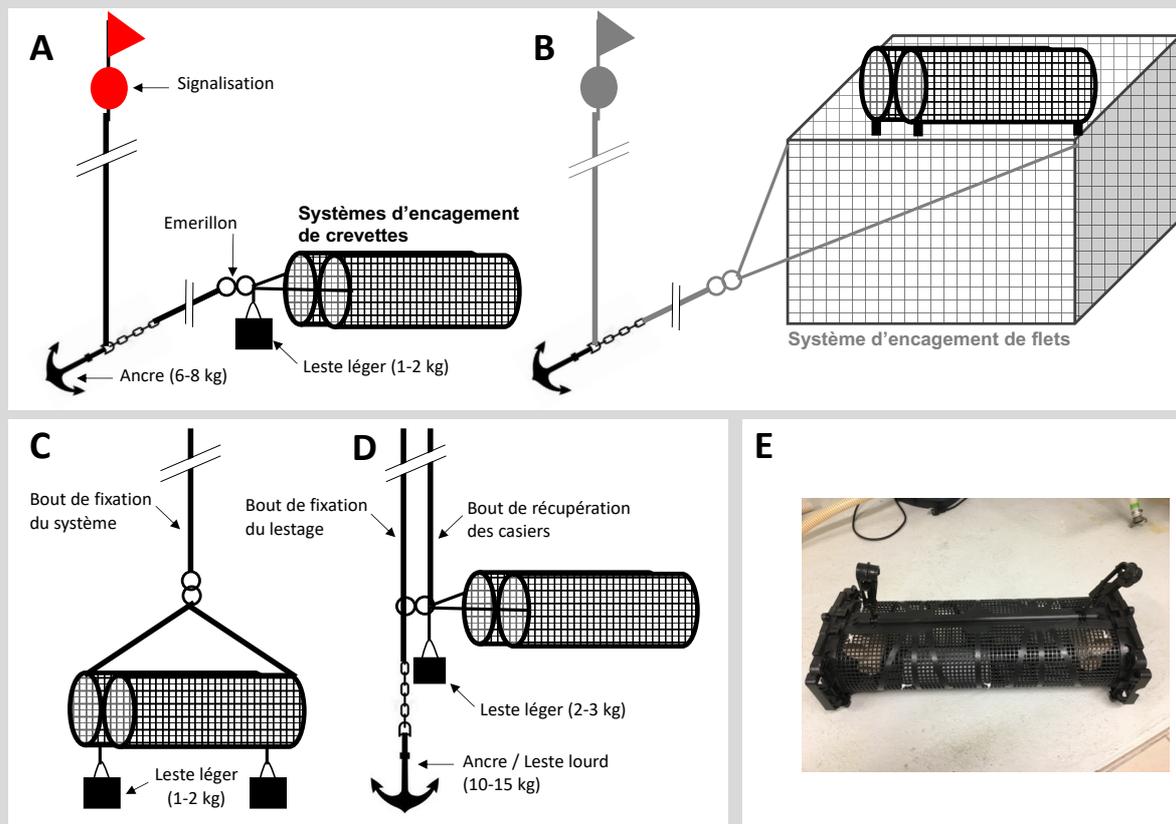
- (1) montage de type filière avec lestage ou encrage (à adapter en fonction de l'exposition au courant) pour les déploiements depuis un embarcadère, un ponton, ou en pleine mer depuis une embarcation,
- (2) directement arrimés sur d'autres structures d'encagement plus imposantes (*e.g.* cages à poissons).

Il est préconisé d'acclimater les spécimens à des conditions (*i.e.* température et salinité) proches de

celles du milieu d'encagement, 24-48 h avant le déploiement sur le terrain. Il est également recommandé de prévoir $\geq 30\%$ d'organismes en plus que nécessaire pour couvrir les besoins analytiques. Une fois sur site, il est préférable d'acclimater progressivement les organismes par remplacement du milieu de stabulation par l'eau de la station étudiée, avant encagement.

Encart 2. Schémas illustratifs de quelques configurations testées pour le déploiement du système d'encagement des crevettes *Palaemon sp.* (crédits : B. Xuereb, UMR-I 02 SEBIO).

Déploiement depuis une embarcation, en montage de type filière (A) ou arrimés sur une structure d'encagement de poissons (B). Déploiement depuis un embarcadère faiblement exposé (C) ou fortement exposé (D) au courant. Exemple de casier utilisé comme unité d'encagement (E).



A l'issue de la période d'encagement, les organismes survivants devront être immédiatement comptabilisés avant d'être rapatriés au laboratoire dans les meilleurs délais. Les organismes seront stabulés de préférence dans l'eau de la station étudiée, à température proche de celle du milieu, sur une période ≤ 48 h, en attendant d'être étudiés pour les analyses de biomarqueurs.

Avant tout encagement, il est important de faire une demande d'occupation du domaine maritime auprès des autorités compétentes (e.g. Direction Départementale des Territoires et de la Mer pour le domaine public ; Service de la direction aéroportuaire du Conseil Départemental pour les ports de plaisance ; Service environnement pour les Grands Ports industriels).

3 Analyses de la réponse immunitaire

L'analyse de la réponse immunitaire est pratiquée à partir d'un échantillon d'hémolymphe frais.

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette blanche, <i>Palaemon longirostris</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Chaque spécimen est traité individuellement, à raison d'un minimum de 10 spécimens par station d'encagement.

Pendant le prélèvement, les crevettes sont gardées dans l'eau de stabulation, sous oxygénation, dans le laboratoire d'analyse. Si la température de la pièce est trop élevée, le lot de crevette sera sous-divisé pour optimiser le maintien des organismes à une température constante. Après une rapide anesthésie sur glace, un volume d'hémolymphe préalablement fixé pourra être ponctionné de préférence au niveau du cœur (*i.e.* partie postérieure du céphalothorax).

La viabilité et la densité cellulaire du prélèvement sont mesurées par cytométrie en flux, immédiatement après le prélèvement, pour s'assurer de la qualité du prélèvement et permettre de normaliser la quantité de cellules utilisées pour le test de phagocytose. En ce sens, il est recommandé de respecter une densité cellulaire minimum, pour permettre la réalisation du test de phagocytose sur un nombre fixé de cellules.

- La densité cellulaire est donnée par la numération des événements dans la région des hémocytes. Celle-ci est identifiée au regard de la structure taille *versus* complexité donnée par la confrontation des canaux FSC et SSC⁵.
- La mortalité cellulaire est donnée par la numération des événements positifs à l'IP⁶ dans région des hémocytes. En opposition, les cellules vivantes qui n'ont pas intégrées l'IP présentent un niveau d'autofluorescence beaucoup plus faible.

La réponse immunitaire des organismes est étudiée au travers de l'activité de phagocytose des hémocytes. Le teste de phagocytose consiste à mesurer l'incorporation, par les hémocytes, de microbilles de polystyrènes fluorescentes (**Encart 3**). Pour cela :

- Il est préconisé de déposer une quantité fixée d'hémocytes dans un support type microplaque et, si nécessaire, compléter le volume avec du milieu de suspension cellulaire de sorte à obtenir un volume et une densité cellulaire uniforme pour l'ensemble des échantillons.
- Les cellules doivent être préférablement incubées, de sorte à favoriser leur adhérence au support, avant l'ajout d'une solution de microbilles fluorescente. La réaction de phagocytose sera mesurée sur l'échantillon d'hémocytes après une période d'incubation. Il est primordial de fixer le ratio billes/cellule, la température et le temps d'incubation, pour des résultats comparables dans la durée.
- Comme précédemment, la région des hémocytes sera repositionnée au regard de la structure taille *versus* complexité donnée par la confrontation des canaux FSC et SSC. Permettant ainsi de comptabiliser la densité de cellules dans l'échantillon de cellules récupérées à l'issue du test. De même, la mortalité cellulaire pourra être donnée par la numération des événements positifs à l'IP dans région des hémocytes.
- La florescence des billes sera également mesurée dans la région des hémocytes (sur un canal différent de celui de l'IP). Le nombre de billes associées aux hémocytes sera déterminé par la valeur de fluorescence enregistrées. Trois paramètres pourront alors être calculés :
 - (4) la capacité qui correspond au pourcentage de cellules ayant phagocyté 1 bille et plus,
 - (5) l'efficacité qui correspond au pourcentage de cellules ayant phagocyté 3 billes et plus,
 - (6) l'avidité qui est une estimation du nombre moyen de billes ingérées par cellule. Cette valeur est calculée par le ratio de la moyenne de fluorescence de la capacité de phagocytose sur la moyenne de fluorescence liée à l'ingestion d'une seule bille.

⁵ FSC : Foward Scatter Channel ; SSC : Side Scatter Chanel.

⁶ IP : l'iodure de propidium est une sonde fluorescente ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 490/549-720 nm) couramment utilisée comme marqueur de l'ADN afin de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (phénomène caractéristique de la nécrose).

Encart 3. Illustration des différentes étapes de résultats observés au cours de l'analyse de la réponse immunitaire chez *Palaemon longirostris*.

Le volume prélevé d'hémolymphe (*i.e.* 50-100 μ L) et immédiatement déposé un tube précoté avec un anticoagulant (*i.e.* 200 μ L d'ALS⁷). Le test de phagocytose a été réalisé sur une concentration cellulaire de 200 000 cellules / mL et une concentration finale de 500 billes / cellule, dans le milieu réactionnel (*i.e.* microbilles \varnothing 1 μ m yellow-green diluées dans du MPSS⁸, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 505/515 nm). Les cellules ont été incubées 30 min à 15°C, avant ajout des billes. Le test de phagocytose a été mené pendant 2 h à 15°C avant analyses au cytomètre.

Les résultats ont été acquis avec un Cytomètre en flux Novocyte™ (ACEA). Limite d'évènements fixée à 200 000 évènements dans la zone d'intérêt (*i.e.* région des hémocytes). Limite de volume fixée à 100 μ L d'échantillon. Vitesse de passage fixée à 30 μ L/min. Paramétrage du mélange automatique fixé à 1500 rpm, 10 s, avec accélération sur 2 s.

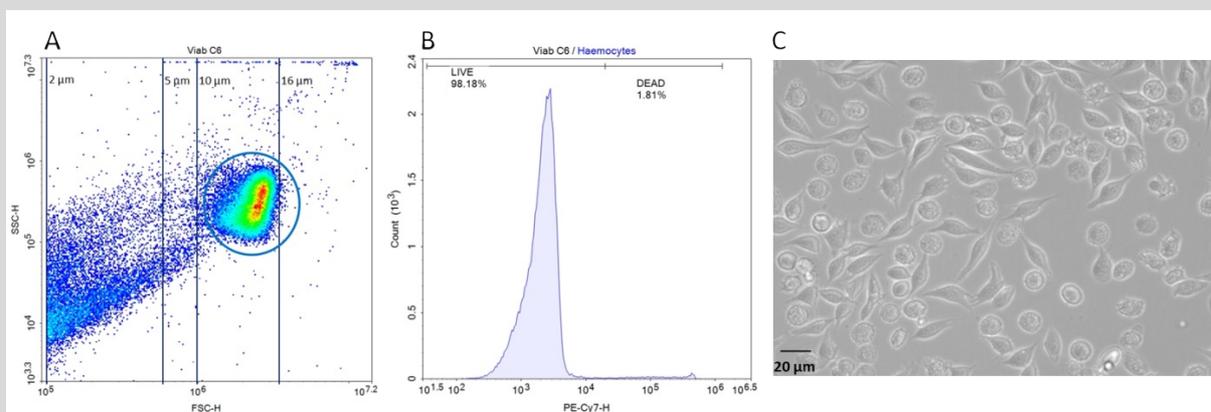


Figure 1. Caractérisation de la population d'hémocytes de *Palaemon* sp, immédiatement après prélèvement de l'hémolymphe et suspension dans de l'ALS (ratio 1/4). (A) Cytogramme positionnant la région des hémocytes (cercle bleu). Les lignes verticales donnent une correspondance entre l'intensité du signal en FSC et la taille des évènements. (B) Distribution de la densité des évènements en fonction de l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission du PI, enregistrée dans la région des hémocytes. (C) Visualisation microscopique des hémocytes après échantillonnage.

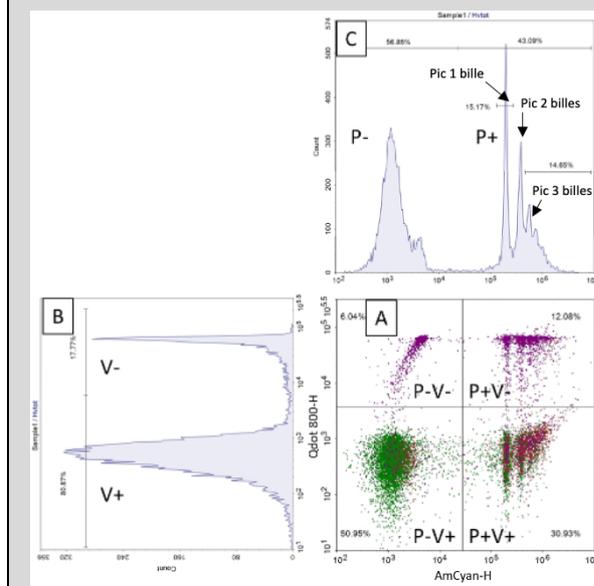


Figure 2. Illustration de la distribution des hémocytes de *Palaemon* sp doublement marqués mortalité (IP) / phagocytose (microbilles), à l'issue du test de phagocytose. (A) Distribution des évènements en fonction de l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission des microbilles *versus* longueur d'onde d'émission de l'IP. 4 phénotypes d'hémocytes peuvent être identifiés : les non-phagocytants / vivants (P-/V+), les phagocytants / vivants (P+/V+), les non-phagocytants / morts (P-/V-) et les phagocytant / mort (P+/V-). (B) Distribution de la densité des évènements *versus* l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission du PI. (C) Distribution de la densité des évènements *versus* l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission des microbilles.

N.B. Il sera important dans le cas du double marquage, d'enregistrer les signaux à des longueurs d'onde suffisamment espacées pour s'affranchir du phénomène de superposition du signal.

⁷ALS : Alsever's Solution, une solution calcium-free, classiquement utilisée comme anticoagulant chez les crustacés (*i.e.* 300 mM NaCl, 100 mM Glucose, 30 mM citrate de sodium, 26 mM acide citrique, 10 mM EDTA, pH 5.4 ; vu dans Rioult et al., 2014).

⁸MPSS : Marine Physiological Saline Solution (*i.e.* 470 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 47.7 mM MgSO₄, pH 7.8 ; Le Foll et al., 2010).

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette blanche, <i>Palaemon longirostris</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continente	Transition	Littorale

4 Analyses des taux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes

Chez la crevette, les dommages à l'ADN sont mesurés sur des échantillons de spermatozoïdes frais. Pour cela, les spermatozoïdes doivent être extraits et dilacérés dans un milieu de suspension cellulaire (e.g. méthode décrite dans Erraud et al., 2019 ; Erraud, 2018). Seules les suspensions de spermatozoïdes présentant une bonne viabilité cellulaire (*i.e.* $\geq 85\%$) doivent être considérées pour analyse *via* le test Comet, pour éviter toute augmentation artificielle du niveau de génotoxicité, liées à des effets cytotoxiques.

L'évaluation de la génotoxicité par le test Comet en condition standard alcaline permet de mettre en évidence les cassures simple brins (Single Strand Breaks - SSBs), double brins (Double Strand Breaks – DSBs) et les sites alcali-labiles (Alkali-labile Sites - ALS). Le test Comet pourra être réalisé selon la procédure détaillée dans Cante et al., 2022, sur un minimum de 10 spécimens / station d'encagement. Le niveau de dommage à l'ADN des noyaux cellulaires sera quantifié par analyse d'image au moyen du logiciel COMET AYSSAY IV et exprimé en % de *tail DNA* (comme recommandé dans la littérature). Quelques points de vigilance peuvent être soulignés :

- Les conditions spécifiques du test Comet – *i.e.* composition des réactifs, et matériels et paramètres d'électrophorèse – doivent être fixés et respectés, pour garder les résultats inter-comparables sur la durée.
- Il est recommandé d'inclure les suspensions cellulaires dans un minimum de 2 répliques de gels d'électrophorèse. L'analyse de l'intégrité de l'ADN doit être menée sur un effectif minimum de 75 noyaux par gels, en commençant par la zone centrale pour éviter les effets de bord.
- Le taux moyen d'endommagement de l'ADN spermatique par spécimen, sera exprimé comme une moyenne des médianes (*i.e.* pour chacun des 2 gels) des % de *tail DNA* mesurés individuellement sur chaque noyau.

5 Définition des valeurs seuils pour les réponses immunitaires et les taux de dommages à l'ADN

A ce jour, nous ne disposons encore que de très peu de données issues de l'encagement de *Palaemon longirostris*. En effet, le déploiement des méthodologies présentées ici (*i.e.* encagement et analyses) ont été réalisés dans seulement 2 sites (*i.e.* la Seine à Petit-Couronne et l'Orne au port de Ouistreham) en 2020 et 2021, équivalant respectivement à 38 et 36 analyses individuelles pour la mesure des réponses immunitaires et des taux de dommages à l'ADN. Des seuils spécifiques à cette espèce n'ont donc pas encore été définis.

Toutefois, concernant les taux de dommages à l'ADN, l'utilisation de la grille de lecture établie chez l'espèce marine *Palaemon serratus* (*cf.* Fiche *P. serratus*), sur la base d'un protocole strictement identique, pourrait représenter une solution satisfaisante en attendant de disposer de davantage de données chez *P. longirostris*. En effet, l'utilisation d'un seuil inter-espèce pour l'interprétation du niveau de dommages à l'ADN spermatique chez *P. serratus* et *P. longirostris* a précédemment été validée dans le cadre d'une approche passive (Erraud, 2018). Il conviendra cependant de vérifier que les niveaux de dommages observés au sein des gisements de spécimens de *P. longirostris* et *P. serratus*, en amont des encagements, sont bien dans la gamme de variation ; ce qui était le cas durant les campagnes d'encagement de 2020 et 2021.

En revanche, la mobilisation inter-espèces des valeurs seuils obtenues pour les 3 marqueurs de la réponse immunitaire (*i.e.* capacité, efficacité et avidité de phagocytose), chez *P. serratus*, reste plus ha-

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette blanche, <i>Palaemon longirostris</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continental	Transition	Littorale

sardeuse. Les valeurs mesurées chez les spécimens de *P. longirostris* sont systématiquement significativement inférieures à celles des individus de *Palaemon serratus* utilisés lors d'encagement aux mêmes périodes. Cela découle, au moins en partie, des différences dans le protocole analytique (*i.e.* volume de l'échantillon d'hémolymph, densité cellulaire disponible, ratio billes / cellules) contraintes par la plus petite taille de *P. longirostris*.

Ce manque de données chez l'espèce estuarienne *P. longirostris* souligne la nécessité d'acquérir davantage de données en continuant de réaliser des campagnes d'encagement dans des estuaires présentant des niveaux de contamination chimique contrastés dans une perspective de définir des seuils robustes et propres à cette espèce.

6 Analyse de la condition globale des organismes engagés

La mesure de l'indices de condition, ainsi que le dosage des réserves énergétiques (*i.e.* protéines, lipides et glycogène) peuvent apporter des informations supplémentaires sur l'état global des organismes ne serait-ce que pour évaluer l'effet des conditions d'encagement (*e.g.* condition trophique, exposition au courant, variation de salinité). Pour cela, il est impératif de pratiquer les analyses sur un lots d'individus, dans les 24 h avant le déploiement des encagements.

L'indice de condition (IC) des organismes peut être calculé à partir d'un rapport entre la masse en grammes (M) et la taille totale sans le rostre en millimètres (LT- ; de l'épine sub-orbitale à l'extrémité du telson) des organismes au cube selon la formule :

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

En effet, il recommander de ne pas considérer le rostre dans la prise de mesure car ce dernier peut être facilement abimé lors de la capture et/ou de l'encagement des organismes. Pour un maximum de représentativité, il conviendra de mesurer et peser un effectif de spécimens ≥ 20 .

Chez la crevette, les réserves énergétiques sont mesurées sur des extraits d'hépatopancreas selon la méthode initialement développée chez la dreissène *Dreissena polymorpha* (Palais et al., 2011) adaptée aux crevettes Palaemonidae (Amara et al., 2020). Pour cela, les animaux doivent être euthanasiés après une rapide anesthésie sur glace, de sorte à disséquer l'hépatopancreas immédiatement après. Les échantillons de tissus doivent être gradés au froid. Ces analyses peuvent être pratiquées sur des échantillons de tissus congelés et stockés à une température $\leq -20^\circ\text{C}$ (dans ce cas appliquer la procédure de façon systématique, pour des résultats comparables dans la durée). Les quantités de protéines totales, de lipides totaux et de glycogène pourront être ainsi évaluées *via* des dosages colorimétriques par spectrophotométrie d'absorbance sur un minimum de 10 spécimens / station d'encagement.

Références bibliographiques

- Amara R., Laroche J., Couteau J., Xuereb B., Pichereau V., Diop M., 2020. Biomonitoring actif (encagement de flets et de crevettes) pour le suivi de l'impact de l'incendie du 26 septembre 2019 des installations « Lubrizol / NL Logistique ». Rapport de recherche réalisé pour le GIP Seine-Aval, 34p. <https://www.seine-aval.fr/projet/hqfish/>
- Aurousseau J-M, 1984. Éléments d'écologie de la crevette blanche, *Palaemon longirostris*, dans l'estuaire de la Gironde. Dynamique de la population et de la production. Thèse de doctorat, spécialité Biologie Animale mention Écologie, Université Paris VI, Paris, France, 227 pp.
- Béguer M, Bergé J, Girardin M, Boët P, 2010. Reproductive Biology of *Palaemon longirostris* (Decapoda: Palaemonidae) from Gironde Estuary (France), with a Comparison with Other European Populations. *Journal of*

 	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette blanche, <i>Palaemon longirostris</i>		Taxon : CRUSTACE		
			Masse(s) d'eau		
			Continentale	Transition	Littorale

Crustacean Biology, 30: 175–185.

- Cant A, Bonnard M, Porcher J-M, Prygiel J, Catteau A, Delahaut L, Palluel O, Turiès C, Geffard A, Bado-Nilles A, 2022. Integration of Genotoxic Biomarkers in Environmental Biomonitoring Analysis Using a Multi-Biomarker Approach in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758). *Toxics*, 10, 101-121. <https://doi.org/10.3390/toxics10030101>
- Erraud A, 2018. Développement d'un biomarqueur de qualité spermatique chez deux espèces de crevettes Palaemonidae : état des lieux le long du continuum estuaire / littoral de la Seine. Thèse de doctorat, spécialité Physiologie et biologie des organismes – populations - interactions, Université Le Havre Normandie, Le Havre, France, 313 pp. <tel-02016489>
- Erraud A, Bonnard M, Geffard O, Chaumot A, Duflot A, Geffard A, Forget-Leray J, Xuereb B (2019). Assessment of sperm DNA integrity within the *Palaemon longirostris* (H. Milne-Edwards, 1837) population of the Seine estuary. *Environmental Pollution*, 245: 485-493. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.006>
- d'Udekem d'Acoz C. 1999. Inventaire et distribution des crustacés décapodes de l'Atlantique nord-oriental, de la Méditerranée et des eaux continentales adjacentes au nord de 25°N. Collection Patrimoines Naturels, 40. Muséum national d'Histoire Naturelle : Paris, France. 383 pp.
- González-Ortegón E, Cuesta JA, 2006. An illustrated key to species of *Palaemon* and *Palaemonetes* (Crustacea: Decapoda: Caridea) from European waters, including the alien species *Palaemon macrodactylus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86: 93-102. <https://doi.org/10.1017/S0025315406012896>
- González-Ortegón E, Pascual E, Cuesta JA, Drake P, 2006. Field distribution and osmoregulatory capacity of shrimps in a temperate European estuary (SW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 67: 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.01.025>
- Palais F, Mouneyrac C, Dedourge-Geffard O, Giambérini L, Biagianti-Risbourg S, Geffard A (2011). One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83: 1062-1073. [10.1016/j.chemosphere.2011.01.060](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.060)

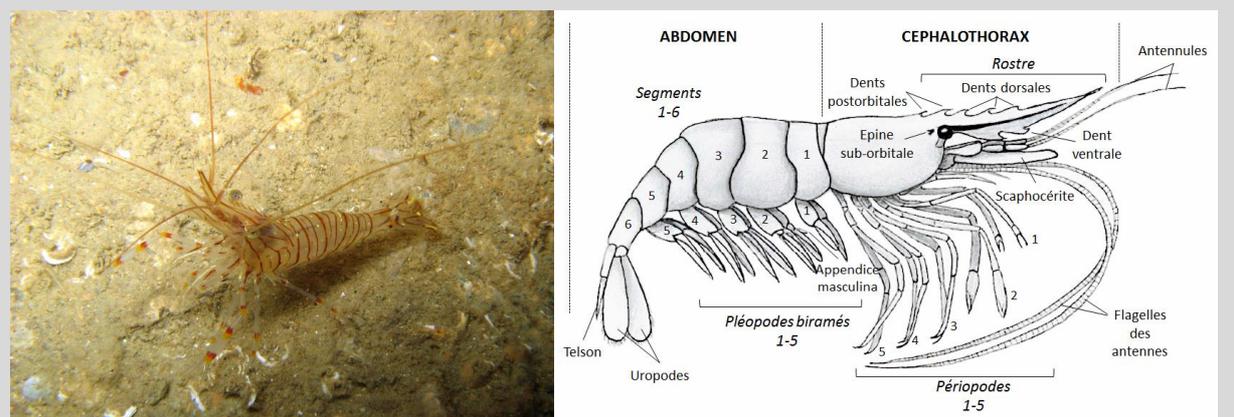
Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette bouquet, *Palaemon serratus*

1 Présentation du modèle biologique, *Palaemon serratus*

L'espèce *Palaemon serratus* (**Encart 1**) pourra être mobilisée comme un modèle crustacé pour investiguer les masses d'eau littorales.

En effet, la crevette bouquet, *P. serratus*, est un crustacés décapode de l'infra-ordre des Caridae, famille des Palaemonidae. Inféodée aux masses d'eau marines, cette espèce effectue la totalité de son cycle de vie sur le littoral, supportant mal les dessalures ≤ 20 ‰ (Gonzalez-Ortegon et al., 2006). Elle présente une très large répartition géographique en Europe, incluant la Mer Baltique, la Manche et l'Atlantique Nord-Est, du Danemark à la Mauritanie en passant par les archipels des Açores, de Madères et des Canaries (d'Udekem d'Acoz, 1999). Du fait de son intérêt socio-économique et écologique, c'est une espèce bien documentée (e.g. Campillo, 1979 ; Erraud, 2018 ; Rollin 2021 pour revue).

Encart 1. Photographie d'une crevette bouquet, *Palaemon serratus* dans son milieu naturel (crédit : f.sichel@unicaen ; à gauche) et description morphologique en vue latérale (crédit : A. Duflot, UMR SEBIO ; à droite).



2 Déploiement des organismes par encagement

2.1 Provenance du matériel biologique

En l'absence d'une source stabilisée d'approvisionnement (e.g. production aquacole), les spécimens de *P. serratus* sauvages doivent être directement prélevés en milieu naturel. Les spécimens de bouquet peuvent être récupérés, en quantités suffisantes, auprès de pêcheurs professionnels, de la fin du mois d'août au début du mois de mars (en fonction des régions). Il conviendra de choisir un gisement exposé à un minimum de sources de contaminations pour garantir un état de référence avant encagement.

Une détermination taxonomique (selon la méthode de Gonzalez-Ortegon et Cuesta, 2006) et une détermination du sexe (selon la méthode décrite dans Erraud, 2018) doivent être réalisées pour ne préserver que les spécimens ciblés. Pour les marqueurs dont il est question ici, seuls les mâles de la classe d'âge 1 (i.e. $27 < \text{LCT}^9 < 36$ mm ; Campillo, 1979) seront ciblés pour garantir un minimum de variabilité

⁹ Longueur du céphalothorax avec rostre.

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette bouquet, <i>Palaemon serratus</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

intrinsèque (*e.g.* liée au sexe ou à l'ovogénèse).

Après capture, les spécimens doivent être rapidement conditionnés dans des contenants remplis d'eau du milieu de prélèvement et aérée au moyen de fines bulles durant leur rapatriement au laboratoire, dans les meilleurs délais. La température et la salinité du milieu doivent être immédiatement enregistrées pour permettre d'anticiper l'acclimatation progressive aux conditions de laboratoire (voir section 2.2).

2.2 Stabulation au laboratoire

Les organismes doivent être maintenus, de préférence, une quinzaine de jours en laboratoire. Cette période permet de les accoutumer à la manipulation et favorise la dépuraison de contaminants qu'ils auraient pu accumuler dans le milieu naturel.

A leur arrivée, les spécimens doivent être progressivement acclimatés aux conditions de laboratoire (*i.e.* température, gisement d'eau, éventuellement salinité), avant d'être conditionnés dans des bacs ou aquariums placés sous filtration (*i.e.* mécanique et biologique) et oxygénation constante, respectant de préférence une densité de 1 individus pour 5 litres. L'espace zootechnique doit permettre une régulation de la température proche de celle du milieu naturel.

L'environnement de stabulation doit être enrichi avec des refuges (*e.g.* modules grillagés en polypropylène, tronçons de tubes PVC, de demi pots en terre cuite) de sorte à réduire le stress des organismes, ainsi que le cannibalisme. De même, il convient de favoriser un éclairage doux pour minimiser le stress.

Durant cette période, il est préconisé de nourrir les organismes avec une fréquence et une alimentation adaptée (*e.g.* tous les 2 jours avec des cubes de krills et mysides et/ou de pellets de crevetteculture). Les restes de nourriture doivent être retirés après nourrissage. La physicochimie du milieu doit être suivie régulièrement et le milieu de stabulation renouvelé au regard des concentrations d'ammonium.

Les spécimens de crevettes provenant du milieu naturel, il est recommandé de valider l'état initial du gisement utilisé au regard des connaissances *a priori* (*e.g.* les valeurs de référence), en amont du déploiement. Pour ce faire, les différents biomarqueurs ciblés par la suite, pourront être mesurés sur un lot de spécimens, à l'entrée au laboratoire, puis à ± 24 h du déploiement des premiers encagements.

2.3 Conditions spécifiques d'encagement

Les encagements se déroulent sur une période de 15 jours. Cette durée est notamment contrainte par le calendrier de marée, pour les encagements sur l'estran. Elle permet d'accéder à des stations immergées à marée basse de vive haut et accessibles par coefficient minimum de l'ordre de 80.

Les crevettes pourront être encagées dans des systèmes de casiers enrichis avec des supports et des refuges, en respectant de préférence une densité de 1 individus pour 1 litres, de sorte à réduire le stress, ainsi que le cannibalisme. Le format de type « casier à crevette » (*i.e.* $L \leq 100$ cm ; $\varnothing \leq 40$ cm) permettra une grande plasticité de déploiement (**Encart 2**), tels que :

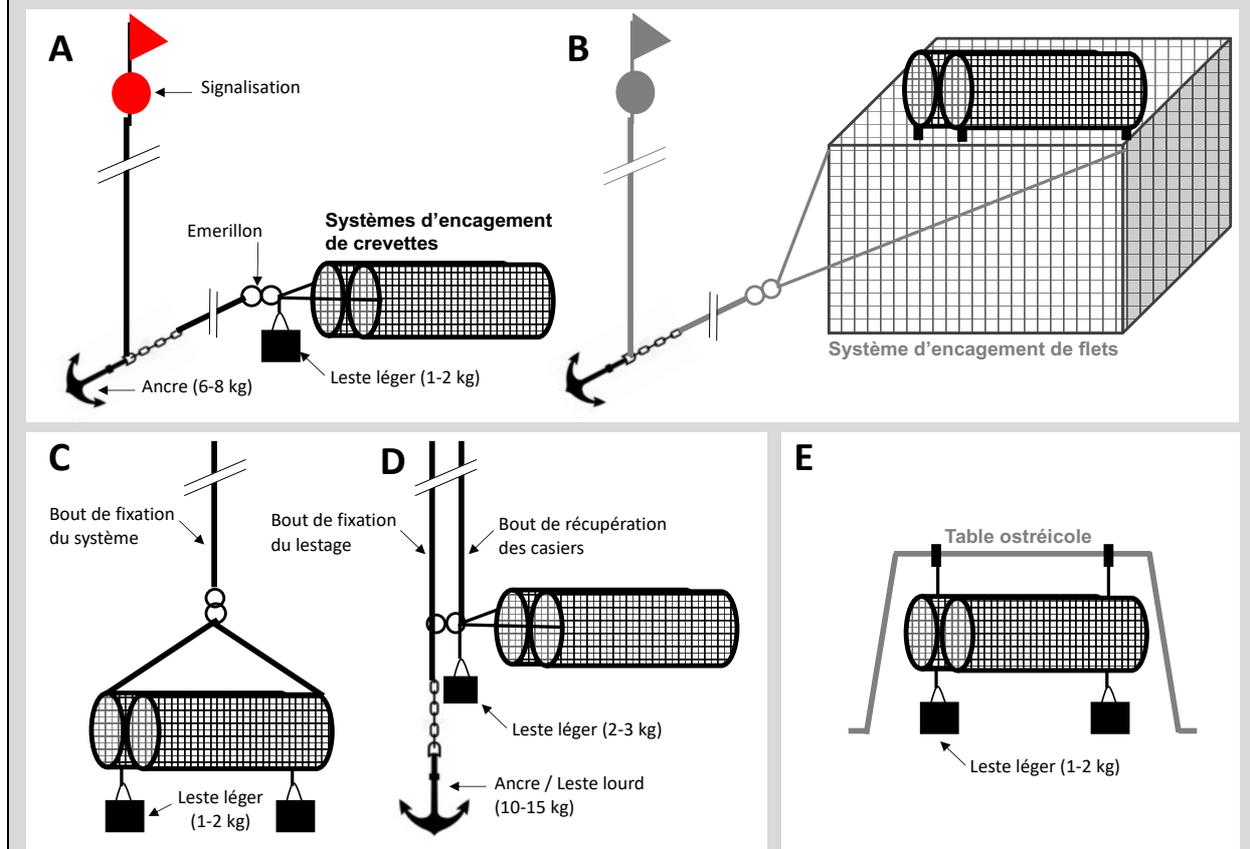
- (1) montage de type filière avec lestage ou encrage (à adapter en fonction de l'exposition au courant) pour les déploiements depuis un embarcadère ou en pleine mer depuis une embarcation,
- (2) amarrage, à marée basse, sur des structures naturelles ou artificielles de l'estran (*e.g.* enrochements ou installations conchylicoles),
- (3) directement arrimés sur d'autres structures d'encagement plus imposantes (*e.g.* cages à poissons).

Il est préconisé d'acclimater les spécimens à des conditions (*i.e.* température et salinité) proches de celles du milieu d'encagement, 24-48 h avant le déploiement sur le terrain. Il est également recommandé de prévoir 2 fois plus d'organismes que nécessaire pour couvrir les besoins analytiques. En effet, *P. serratus* présente un comportement de cannibalisme exacerbé en captivité, conduisant à une perte

importante de spécimens (*i.e.* jusqu'à 50 %). Une fois sur site, il est préférable d'acclimater progressivement les organismes par remplacement du milieu de stabulation par l'eau de la station étudiée, avant encagement.

Encart 2. Schémas illustratifs de quelques configurations testées pour le déploiement du système d'encagement des crevettes *Palaemon sp.* (crédits : B. Xuereb, UMR-I 02 SEBIO).

Déploiement depuis une embarcation, en montage de type filière (A) ou arrimés sur une structure d'encagement de poissons (B). Déploiement depuis un embarcadère faiblement exposé (C) ou fortement exposé (D) au courant. Fixation sur une installation ostréicole (E).



A l'issue de la période d'encagement, les organismes survivants devront être immédiatement comptabilisés avant d'être rapatriés au laboratoire dans les meilleurs délais. Les organismes seront stabulés de préférence dans l'eau de la station étudiée, à température proche de celle du milieu, sur une période ≤ 48 h, en attendant d'être étudiés pour les analyses de biomarqueurs.

Avant tout encagement, il est important de faire une demande d'occupation du domaine maritime auprès des autorités compétentes et des opérationnels de la mer (*e.g.* Direction Départementale des Territoires et de la Mer pour le domaine public ; Service de la direction aéroportuaire du Conseil Départemental pour les ports de plaisance ; Service environnement pour les Grands Ports industriels ; Ostréiculteurs).

3 Analyses de la réponse immunitaire

L'analyse de la réponse immunitaire est pratiquée à partir d'un échantillon d'hémolymphe frais.

 	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette bouquet, <i>Palaemon serratus</i>	Taxon : CRUSTACE		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Chaque spécimen est traité individuellement, à raison d'un minimum de 10 spécimens par station d'encagement.

Pendant le prélèvement, les crevettes sont gardées dans l'eau de stabulation, sous oxygénation, dans le laboratoire d'analyse. Si la température de la pièce est trop élevée, le lot de crevette sera sous-divisé pour optimiser le maintien des organismes à une température constante. Après une rapide anesthésie sur glace, un volume d'hémolymphe préalablement fixé pourra être ponctionné de préférence au niveau du cœur (*i.e.* partie postérieure du céphalothorax).

La viabilité et la densité cellulaire du prélèvement sont mesurées par cytométrie en flux, immédiatement après le prélèvement, pour s'assurer de la qualité du prélèvement et permettre de normaliser la quantité de cellules utilisées pour le test de phagocytose. En ce sens, il est recommandé de respecter une densité cellulaire minimum, pour permettre la réalisation du test de phagocytose sur un nombre fixé de cellules.

- La densité cellulaire est donnée par la numération des événements dans la région des hémocytes. Celle-ci est identifiée au regard de la structure taille *versus* complexité donnée par la confrontation des canaux FSC et SSC¹⁰.
- La mortalité cellulaire est donnée par la numération des événements positifs à l'IP¹¹ dans région des hémocytes. En opposition, les cellules vivantes qui n'ont pas intégrées l'IP présentent un niveau d'autofluorescence beaucoup plus faible.

La réponse immunitaire des organismes est étudiée au travers de l'activité de phagocytose des hémocytes. Le teste de phagocytose consiste à mesurer l'incorporation, par les hémocytes, de microbilles de polystyrènes fluorescentes (**Encart 3**). Pour cela :

- Il est préconisé de déposer une quantité fixée d'hémocytes dans un support type microplaque et, si nécessaire, compléter le volume avec du milieu de suspension cellulaire de sorte à obtenir un volume et une densité cellulaire uniforme pour l'ensemble des échantillons.
- Les cellules doivent être préférablement incubées, de sorte à favoriser leur adhérence au support, avant l'ajout d'une solution de microbilles fluorescente. La réaction de phagocytose sera mesurée sur l'échantillon d'hémocytes après une période d'incubation. Il est primordial de fixer le ratio billes/cellule, la température et le temps d'incubation, pour des résultats comparables dans la durée.
- Comme précédemment, la région des hémocytes sera repositionnée au regard de la structure taille *versus* complexité donnée par la confrontation des canaux FSC et SSC. Permettant ainsi de comptabiliser la densité de cellules dans l'échantillon de cellules récupérées à l'issue du test. De même, la mortalité cellulaire pourra être donnée par la numération des événements positifs à l'IP dans région des hémocytes.
- La florescence des billes sera également mesurée dans la région des hémocytes (sur un canal différent de celui de l'IP). Le nombre de billes associées aux hémocytes sera déterminé par la valeur de fluorescence enregistrées. Trois paramètres pourront alors être calculés :
 - (7) la capacité qui correspond au pourcentage de cellules ayant phagocyté 1 bille et plus,
 - (8) l'efficacité qui correspond au pourcentage de cellules ayant phagocyté 3 billes et plus,
 - (9) l'avidité qui est une estimation du nombre moyen de billes ingérées par cellule. Cette valeur est calculée par le ratio de la moyenne de fluorescence de la capacité de phagocytose sur la moyenne de fluorescence liée à l'ingestion d'une seule bille.

¹⁰ FSC : Foward Scatter Channel ; SSC : Side Scatter Chanel.

¹¹ IP : l'iodure de propidium est une sonde fluorescente ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 490/549-720 nm) couramment utilisée comme marqueur de l'ADN afin de marquer le noyau des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire (phénomène caractéristique de la nécrose).

Encart 3. Illustration des différentes étapes de résultats observés au cours de l'analyse de la réponse immunitaire chez *Palaemon serratus*.

Le volume prélevé d'hémolymphe (*i.e.* 50-100 μ L) et immédiatement déposé un tube précoté avec un anticoagulant (*i.e.* 200 μ L d'ALS¹²). Le test de phagocytose a été réalisé sur une concentration cellulaire de 800 000 cellules / mL et une concentration finale de 250 billes / cellule, dans le milieu réactionnel (*i.e.* microbilles \varnothing 1 μ m yellow-green diluées dans du MPSS¹³, $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: 505/515 nm). Les cellules ont été incubées 30 min à 15°C, avant ajout des billes. Le test de phagocytose a été mené pendant 2 h à 15°C avant analyses au cytomètre.

Les résultats ont été acquis avec un Cytomètre en flux Novocyte™ (ACEA). Limite d'évènements fixée à 200 000 évènements dans la zone d'intérêt (*i.e.* région des hémocytes). Limite de volume fixée à 100 μ L d'échantillon. Vitesse de passage fixée à 30 μ L/min. Paramétrage du mélange automatique fixé à 1500 rpm, 10 s, avec accélération sur 2 s.

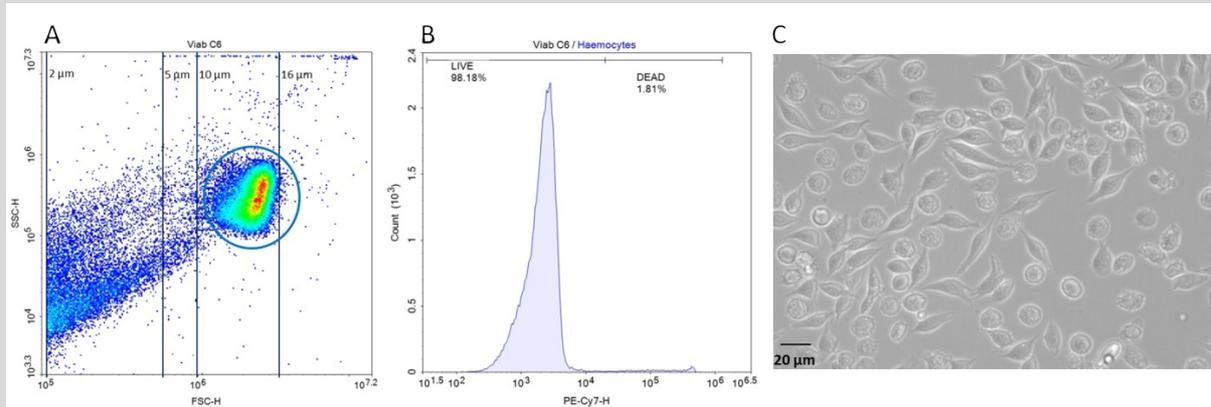


Figure 1. Caractérisation de la population d'hémocytes de *Palaemon serratus*, immédiatement après prélèvement de l'hémolymphe et suspension dans de l'ALS (ratio 1/4). **(A)** Cytogramme positionnant la région des hémocytes (cercle bleu). Les lignes verticales donnent une correspondance entre l'intensité du signal en FSC et la taille des évènements. **(B)** Distribution de la densité des évènements en fonction de l'intensité de fluorescence à la longueur d'émission du PI, enregistrée dans la région des hémocytes. **(C)** Visualisation microscopique des hémocytes après échantillonnage.

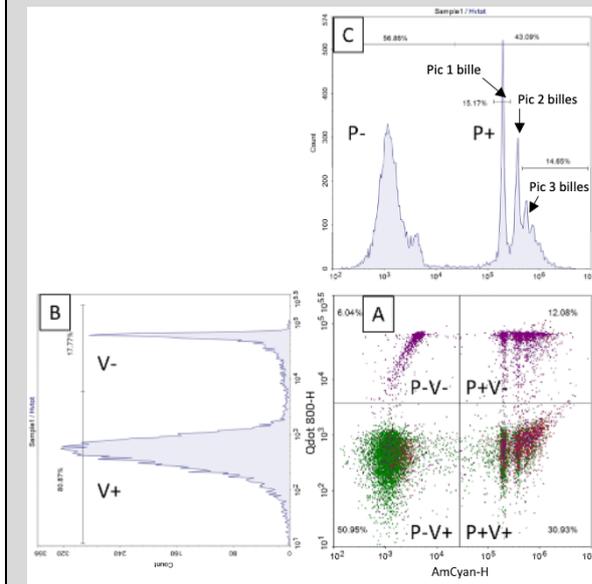


Figure 2. Illustration de la distribution des hémocytes de *Palaemon serratus* doublement marqués mortalité (IP) / phagocytose (microbilles), à l'issue du test de phagocytose. **(A)** Distribution des évènements en fonction de l'intensité de fluorescence à la longueur d'émission des microbilles *versus* longueur d'onde d'émission de l'IP. 4 phénotypes d'hémocytes peuvent être identifiés : les non-phagocytants / vivants (P-/V+), les phagocytants / vivants (P+/V+), les non-phagocytants / morts (P-/V-) et les phagocytants / morts (P+/V-). **(B)** Distribution de la densité des évènements *versus* l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission du PI. **(C)** Distribution de la densité des évènements *versus* l'intensité de fluorescence à la longueur d'onde d'émission des microbilles.

N.B. Il sera important dans le cas du double marquage, d'enregistrer les signaux à des longueurs d'onde suffisamment espacées pour s'affranchir du phénomène de superposition du signal.

¹²ALS : Alsever's Solution, une solution calcium-free, classiquement utilisée comme anticoagulant chez les crustacés (*i.e.* 300 mM NaCl, 100 mM Glucose, 30 mM citrate de sodium, 26 mM acide citrique, 10 mM EDTA, pH 5.4 ; vu dans Riout et al., 2014).

¹³MPSS : Marine Physiological Saline Solution (*i.e.* 470 mM NaCl, 10 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Hepes, 47.7 mM MgSO₄, pH 7.8 ; Le Foll et al., 2010).

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette bouquet, <i>Palaemon serratus</i>		Taxon : CRUSTACE		
			Masse(s) d'eau		
	Continentale	Transition	Littorale		

4 Analyses des taux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes

Chez la crevette, les dommages à l'ADN sont mesurés sur des échantillons de spermatozoïdes frais. Pour cela, les spermatozoïdes doivent être extraits et dilacérés dans un milieu de suspension cellulaire (e.g. méthode décrite dans Erraud et al., 2018 ; Erraud, 2018). Seules les suspensions de spermatozoïdes présentant une bonne viabilité cellulaire (*i.e.* $\geq 85\%$) doivent être considérées pour analyse *via* le test Comet, pour éviter toute augmentation artéfactuelle du niveau de génotoxicité, liées à des effets cytotoxiques.

L'évaluation de la génotoxicité par le test Comet en condition standard alcaline permet de mettre en évidence les cassures simple brins (Single Strand Breaks - SSBs), double brins (Double Strand Breaks – DSBs) et les sites alcali-labiles (Alkali-labile Sites - ALS). Le test Comet pourra être réalisé selon la procédure détaillée dans Cante et al., 2022, sur un minimum de 10 spécimens / stations d'encagement. Le niveau de dommage à l'ADN des noyaux cellulaires sera quantifié par analyse d'image au moyen du logiciel COMET AYSSAY IV et exprimé en % de *tail DNA* (comme recommandé dans la littérature). Quelques points de vigilance peuvent être soulignés :

- Les conditions spécifiques du test Comet – *i.e.* composition des réactifs, et matériels et paramètres d'électrophorèse – doivent être fixés et respectés, pour garder les résultats inter-comparables sur la durée.
- Il est recommandé d'inclure les suspensions cellulaires dans un minimum de 2 réplicas de gels d'électrophorèse. L'analyse de l'intégrité de l'ADN doit être menée sur un effectif minimum de 75 noyaux par gels, en commençant par la zone centrale pour éviter les effets de bord.
- Le taux moyen d'endommagement de l'ADN spermatique par spécimen, sera exprimé comme une moyenne des médianes (*i.e.* pour chacun des 2 gels) des % de *tail DNA* mesurés individuellement sur chaque noyau.

5 Définition des valeurs seuils pour les réponses immunitaires et les taux de dommages à l'ADN

L'approche utilisée est basée sur celle proposée par Besse et al. (2013) et utilisée pour plusieurs modèles biologiques dans le projet. Pour cela, nous avons tout d'abord compilé les données recueillies lors de deux campagnes d'encagement, en 2020 et 2021, dans 10 stations réparties sur le littoral normand (199 individus pour les réponses immunitaires et 177 individus pour les dommages à l'ADN). Les données ont ensuite été ordonnées, pour chaque biomarqueur, par ordre croissant (**Encart 4**).

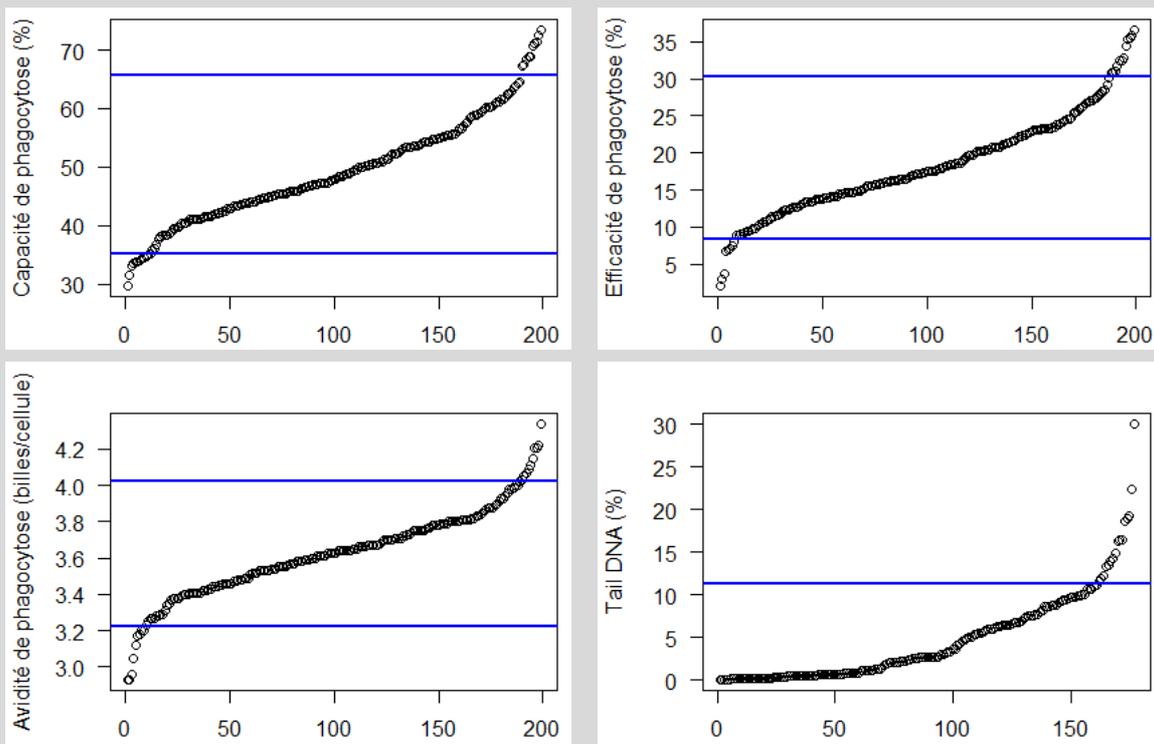
Pour déterminer les seuils, trois cas de figure peuvent être rencontrés :

- pour les biomarqueurs dont seule l'induction était pertinente au regard des connaissances *a priori* sur ces biomarqueurs et des données que nous avons obtenues lors des encagements, nous avons calculé un seuil d'induction. Pour cela, nous avons tiré aléatoirement un échantillon de 30 valeurs dans l'ensemble du jeu de données. Ensuite, les valeurs de dommage les plus fortes ont été retirées jusqu'à ce que les données de l'échantillon suivent une loi normale (*i.e.* vérification *via* un test de Shapiro, seuil de significativité à 5 %). La valeur du 95^{ème} percentile de la distribution de l'échantillon était alors déterminée. Afin de garantir la robustesse du seuil, cette procédure a été répétée 1000 fois et la valeur du seuil a été calculée comme étant la moyenne des 1000 percentiles ainsi déterminés.
- pour les biomarqueurs dont seule l'inhibition était pertinente au regard des connaissances *a priori* sur ces biomarqueurs et des données que nous avons obtenues lors des encagements, nous

avons calculé un seuil d'inhibition. Pour cela, nous avons tiré aléatoirement un échantillon de 30 valeurs de dommages dans l'ensemble du jeu de données. Ensuite, les valeurs de dommage les plus faibles ont été retirées jusqu'à ce que les données de l'échantillon suivent une loi normale (vérification *via* un test de Shapiro, seuil de significativité à 5 %). La valeur du 5^{ème} percentile de la distribution de l'échantillon était alors déterminée. Afin de garantir la robustesse du seuil, cette procédure a été réitérée 1000 fois et la valeur du seuil a été calculée comme étant la moyenne des 1000 percentiles ainsi déterminés.

iii) pour les biomarqueurs dont les effets peuvent se traduire aussi bien par une induction ou une inhibition de la réponse, les deux méthodes précédemment décrites ont été réalisées pour estimer de manière séparée un seuil d'induction et un seuil d'inhibition à la différence que les seuils étaient calculés en utilisant une sous-partie du jeu de donnée total (*i.e.* 65 % des valeurs les hautes pour le seuil d'induction et 65 % des valeurs les plus basses pour le seuil d'inhibition).

Encart 4. Valeurs individuelles classées par ordre croissant pour les biomarqueurs d'immunotoxicité (n = 199) et de génotoxicité (n = 177) pour la crevette bouquet *Palaemon serratus*. Les lignes bleues correspondent aux seuils d'induction et/ou d'inhibition des différents marqueurs.



Les différents seuils sont annotés dans l'Encart 5. Toute la méthodologie d'estimation des valeurs de référence et seuil a été implémentée et réalisé à l'aide du logiciel R (R Development Core Team, 2020).

Pour l'interprétation de résultats dans un contexte de biosurveillance, nous proposer d'utiliser une méthode pour chaque biomarqueur et chaque station basée sur le rapport entre le nombre de réplicats dépassant la ou les valeur(s) seuil(s) par rapport au nombre total de réplicats analysés par station et par biomarqueur. Ce rapport permettra de fournir une grille de lecture de la réponse des marqueurs en lien avec la proportion de réplicats dépassant la ou les valeur(s) seuil(s). A titre d'exemple, ce rapport pourrait retranscrire un « état de référence » lorsque moins de 25 % des réplicats dépassent les seuils, un « effet marqué » entre 25 % et 75 % des réplicats dépassant les seuils et un « effet très marqué »

au-delà.

Encart 5. Valeurs des seuils pour les marqueurs d'immunotoxicité et de génotoxicité.

Biomarqueur	Capacité de phagocytose	Efficacité de phagocytose	Avidité de phagocytose	Tail DNA
Unité	%	%	eq. billes / hémocyte	%
Référence	49,26	18,36	3,62	4,74
Seuil induction	65,61	30,35	4,02	11,39
Seuil inhibition	35,28	8,38	3,22	

6 Analyse de la condition globale des organismes encagés

La mesure de l'indices de condition, ainsi que le dosage des réserves énergétiques (*i.e.* protéines, lipides et glycogène) peuvent apporter des informations supplémentaires sur l'état global des organismes ne serait-ce que pour évaluer l'effet des conditions d'encagement (*e.g.* condition trophique, exposition au courant, variation de salinité). Pour cela, il est impératif de pratiquer les analyses sur un lots d'individus, dans les 24 h avant le déploiement des encagements.

L'indice de condition (IC) des organismes peut être calculé à partir d'un rapport entre la masse en gramme (M) et la taille totale sans le rostre en millimètres (LT- ; de l'épine sub-orbitale à l'extrémité du telson) des organismes au cube selon la formule :

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

En effet, il recommander de ne pas considérer le rostre dans la prise de mesure car ce dernier peut être facilement abimé lors de la capture et/ou de l'encagement des organismes. Pour un maximum de représentativité, il conviendra de mesurer et peser un effectif de spécimens ≥ 20 .

Chez la crevette, les réserves énergétiques sont mesurées sur des extraits d'hépatopancréas selon la méthode initialement développée chez la dreissène *Dreissena polymorpha* (Palais et al., 2011) adaptée aux crevettes Palaemonidae (Amara et al., 2020). Pour cela, les animaux doivent être euthanasiés après une rapide anesthésie sur glace, de sorte à disséquer l'hépatopancréas immédiatement après. Les échantillons de tissus doivent être gradés au froid. Ces analyses peuvent être pratiquées sur des échantillons de tissus congelés et stockés à une température $\leq -20^\circ\text{C}$ (dans ce cas appliquer la procédure de façon systématique, pour des résultats comparables dans la durée). Les quantités de protéines totales, de lipides totaux et de glycogène pourront être ainsi évaluées *via* des dosages colorimétriques par spectrophotométrie d'absorbance sur un minimum de 10 spécimens / station d'encagement.

Références bibliographiques

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

Besse J-P, Coquery M, Lopes C, Chaumot A, Budzinski H, Labadie P, Geffard O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47: 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>

 	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez la crevette bouquet, <i>Palaemon serratus</i>		Taxon : CRUSTACE		
			Masse(s) d'eau		
			Continentale	Transition	Littorale

Campillo, A., 1979. Contribution à l'étude de la crevette rose *Palaemon serratus* (Pennant) : Exploitation, Biologie, Elevage, Epidémiologie. Thèse de doctorat - Université des sciences et techniques du Languedoc.

Cant A, Bonnard M, Porcher J-M, Prygiel J, Catteau A, Delahaut L, Palluel O, Turiès C, Geffard A, Bado-Nilles A, 2022. Integration of Genotoxic Biomarkers in Environmental Biomonitoring Analysis Using a Multi-Biomarker Approach in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758). *Toxics*, 10: 101-121. <https://doi.org/10.3390/toxics10030101>

Erraud A, 2018. Développement d'un biomarqueur de qualité spermatique chez deux espèces de crevettes Palaemonidae : état des lieux le long du continuum estuaire / littoral de la Seine. Thèse de doctorat, spécialité Physiologie et biologie des organismes – populations - interactions, Université Le Havre Normandie, Le Havre, France, 313 pp. <tel-02016489>

Erraud A, Bonnard M, Chaumot A, Geffard O, Duflot A, Forget-Leray J, Le Foll F, Geffard A, Xuereb B, 2018. Use of sperm DNA integrity as a marker for exposure to contamination in *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Intrinsic variability, baseline level and in situ deployment. *Water Research* 132: 124–134. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8754-6>

d'Udekem d'Acoz C. 1999. Inventaire et distribution des crustacés décapodes de l'Atlantique nord-oriental, de la Méditerranée et des eaux continentales adjacentes au nord de 25°N. Collection Patrimoines Naturels, 40. Muséum national d'Histoire Naturelle : Paris, France. 383 pp.

González-Ortegón E, Cuesta JA, 2006. An illustrated key to species of *Palaemon* and *Palaemonetes* (Crustacea: Decapoda: Caridea) from European waters, including the alien species *Palaemon macrodactylus*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 86: 93-102. <https://doi.org/10.1017/S0025315406012896>

González-Ortegón E, Pascual E, Cuesta JA, Drake P, 2006. Field distribution and osmoregulatory capacity of shrimps in a temperate European estuary (SW Spain). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 67: 293-302. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2019.01.025>

Palais F, Mouneyrac C, Dedourge-Geffard O, Giambérini L, Biagianti-Risbourg S, Geffard A (2011). One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83: 1062-1073. [10.1016/j.chemosphere.2011.01.060](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.01.060)

Rollin M, 2021. Activité chitinolytique et propriétés structurales de la cuticule chez la crevette *Palaemon serratus* : Description au cours du cycle de mue et perspectives d'utilisation en écotoxicologie. Thèse de doctorat, spécialité Physiologie et biologie des organismes – populations - interactions, Université Le Havre Normandie, Le Havre, France, 467 pp. <tel-03578339>

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez l'épinoche à trois-épines, <i>Gasterosteus aculeatus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez l'épinoche à trois-épines, *Gasterosteus aculeatus*

1 Présentation du modèle biologique, *Gasterosteus aculeatus*

L'espèce *Gasterosteus aculeatus* (**Encart 1**) pourra être mobilisée comme un modèle poisson pour investiguer les masses d'eau continentale et de transition. La présence d'épinoche en eau littorale et la capacité d'adaptation de notre souche durant d'autres projets à ces conditions de vie peuvent ouvrir vers une perspective de maintien en zone littorale.

Dans le cadre de la biosurveillance des milieux aquatiques d'eau douce, l'épinoche à trois épines, *Gasterosteus aculeatus*, un Téléostéen de l'ordre des Gasterosteiformes et de la famille des Gasterosteidae, est déjà utilisée depuis plusieurs années en tant qu'espèce sentinelle (Sanchez *et al.* 2007, Le Guernic *et al.* 2016b, Catteau *et al.* 2021). Ce petit poisson (3-7 cm) peut vivre sur l'ensemble du continuum eaux douces – eaux salées des zones tempérées et subpolaires de l'hémisphère Nord (Wootton 1984). Elle présente une tolérance relativement importante aux pollutions (Ernst *et al.* 1991, Svecevičius 2006), ce qui permet de la retrouver dans des milieux fortement impactés et de distinguer les réponses physiologiques précoces par rapport aux effets toxiques aiguës. Sa biologie, son écologie et son comportement sont largement documentés. Sa petite taille facilite sa manipulation tout en permettant un maintien aisé en encagement (Catteau *et al.* 2021). En biosurveillance, des approches multi-biomarqueurs ont été mises en place sur cette espèce modèle incluant l'intégrité de l'ADN (Santos *et al.* 2013, Cant *et al.* 2022) ainsi que les marqueurs d'immunotoxicité (Barber and Scharsack 2010, Bado-Nilles *et al.* 2014, Le Guernic *et al.* 2016a, Marchand *et al.* 2021).

Encart 1. Photographie d'une épinoche à trois-épines, *Gasterosteus aculeatus*, mâle (à gauche) et femelle (à droite) en période de reproduction (crédit : A. MARCHAND, UMR SEBIO) et carte de la répartition européenne (d'après Wootton, 1984).



2 Déploiement des organismes par encagement

2.1 Provenance du matériel biologique

Les épinoches à trois-épines utilisées lors des encagements sont des individus âgés d'environ 1 an, issus de l'élevage de l'INERIS. Elles sont nées dans les canaux témoins des mésocosmes l'année précédente et, si leur taille est inférieure à 25 mm, elles sont maintenues dans des bassins extérieurs. Ces bassins sont ensuite alimentés tout au long de l'année avec des apports quotidiens en vers de vase, artémies et larves de moustiques. Afin d'optimiser leur croissance, l'apport de nourriture varie qualitativement et quantitativement en fonction de la taille et du nombre de poissons.

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez l'épinoche à trois-épines, <i>Gasterosteus aculeatus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

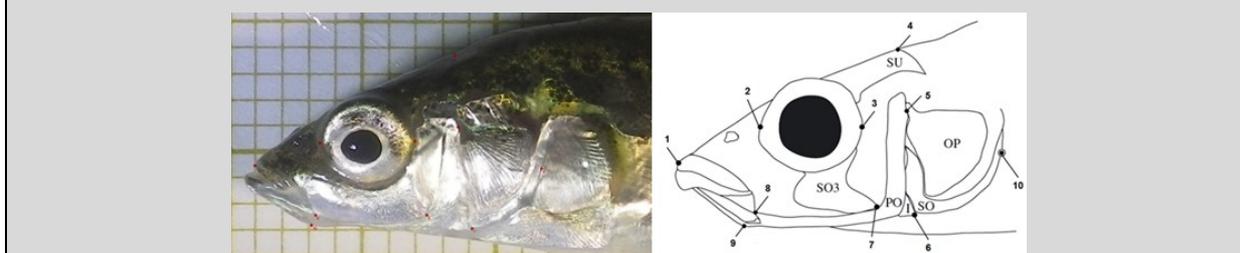
2.2 Stabulation en bassins extérieurs

Les bassins de stabulation extérieurs sont conçus pour présenter des conditions compatibles avec l'écologie de l'épinoche à trois-épines. Ils sont peu profonds (maximum 80 cm) et présentent un volume d'environ 1 000 L et une surface suffisante pour permettre aux épinoches de développer des comportements naturels (nage en banc, reproduction et comportements associés). Ils présentent une couche sédimentaire sur laquelle se développent plusieurs types de végétaux (potamot, callitriche) ainsi que plusieurs groupes d'invertébrés benthiques (aselles, gammarès, radix, sangsues...). Un enrichissement est également apporté par l'ajout de tubes en PVC percés servant de cachettes. Les bassins sont alimentés en eau potable avec un renouvellement continu et un courant faible. La conductivité y est stable (environ 700 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) et la température est suivie tout au long de l'année. Les épinoches s'y reproduisent naturellement démontrant le bien-être de l'animal dans ces conditions de maintien.

2.3 Conditions spécifiques d'encagement

Pour éviter l'utilisation d'individus trop petits qui pourraient s'échapper à travers les mailles des cages, des épinoches de taille supérieure à 38 mm sont sélectionnés. Puis, grâce à une méthode d'analyse d'image basée sur la morphologie de la tête (de Kermoisan *et al.* 2013; **Encart 2**), elles sont triées selon leur sexe. Afin d'éliminer le stress lié aux manipulations, au moins deux semaines avant le début de l'expérimentation, les mâles et les femelles sont maintenus séparés dans des bassins de stabulation. Ils sont nourris quotidiennement jusqu'à la veille de l'encagement. La constitution des lots (13 femelles & 13 mâles), qui s'effectue la veille du dépôt des cages, assure un sexe-ratio équilibré et une taille homogène des individus entre les cages.

Encart 2. Détermination du sexe des épinoches basée sur la morphologie de la tête (De Kermoisan *et al.* 2013). À gauche : les dix points placés sur une photographie d'un individu. À droite : une représentation schématique du positionnement des points.



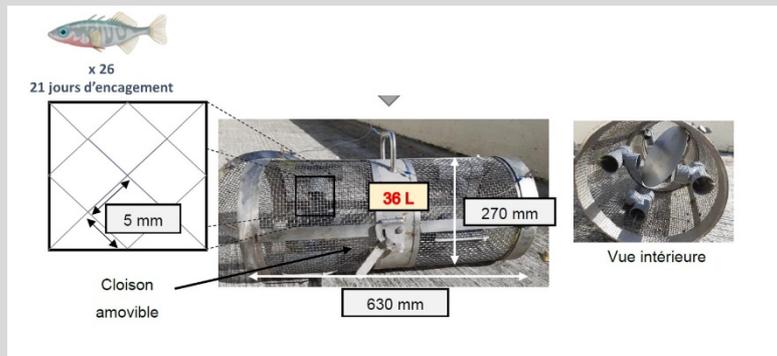
Avant tout encagement, il est important de faire une demande d'autorisation d'expérimentation animale, une demande d'autorisation de pêche scientifique et une information auprès des Voies Navigables de France de la position de la cage. Après accord, les animaux peuvent être transportés, selon la réglementation en vigueur (autorisation de transport, certificat vétérinaire, matériel adapté à leur transfert), sur les sites d'étude.

Une fois sur site, les poissons sont acclimatés une quinzaine de minutes dans un mélange eau des bacs de transport / eau du site d'étude. Puis après arrimage de la cage, les poissons sont placés à l'intérieur de la cage en même temps qu'un enregistreur de température. Les cages sont cylindriques et en acier inoxydable (**Encart 3**). D'une longueur de 63 cm pour un diamètre de 27 cm et un maillage de 5 mm de côté, elles s'ouvrent aux deux extrémités et présentent une cloison centrale qu'il est possible de refermer pour constituer deux lots séparés d'individus dans la même cage. Elles sont enrichies avec des

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez l'épinoche à trois-épines, <i>Gasterosteus aculeatus</i>		Taxon : POISSON		
			Masse(s) d'eau		
			Continentale	Transition	Littorale

tubes en PVC pour permettre aux poissons de conserver un comportement de fuite en cas de stress (agressivité d'autres épinoches & prédateur) et se protéger du courant. À l'issue des 21 jours d'encagement, les cages sont récupérées et le prélèvement des échantillons biologiques sur les animaux s'effectue sur le terrain.

Encart 3. Caractéristiques des cages utilisées pour l'encagement de l'épinoche à trois-épines



3 Analyses des réponses biologiques

Après les 21 jours d'encagement, les épinoches survivantes sont dénombrées et anesthésiées (Tricaine methanesulfonate à 100 mg/L) avant dislocation cervicale. Les animaux sont ensuite mesurés, pesés et sexés avant de prélever les organes nécessaires aux analyses des réponses biologiques.

À l'aide d'un cône préalablement hépariné, prélever 2 μL de sang à travers l'entaille et placer dans 100 μL tampon de citrate (Vindeløv and Christensen 1990). L'échantillon est ensuite maintenu en azote liquide jusqu'à analyse.

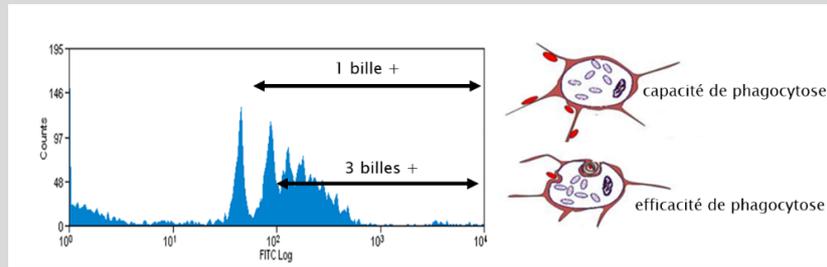
La suspension de leucocytes est obtenue par broyage manuel de la rate sur un tamis cellulaire (mailles \varnothing 40 μm) à l'aide de 1,8 mL de milieu Leibovitz 15 médium complétement (L15 complétement : 10 U/mL d'héparine, 500 U/mL de pénicilline et 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de streptomycine). Les échantillons sont maintenus à 4°C jusqu'à analyse, le lendemain de la dissection.

3.1 Réponse immunitaire

La concentration cellulaire est ajustée à 10^6 leucocytes/mL avec du L15 complétement. Pour chaque échantillon, 10 000 événements ont été analysés après excitation par un laser argon à 488 nm.

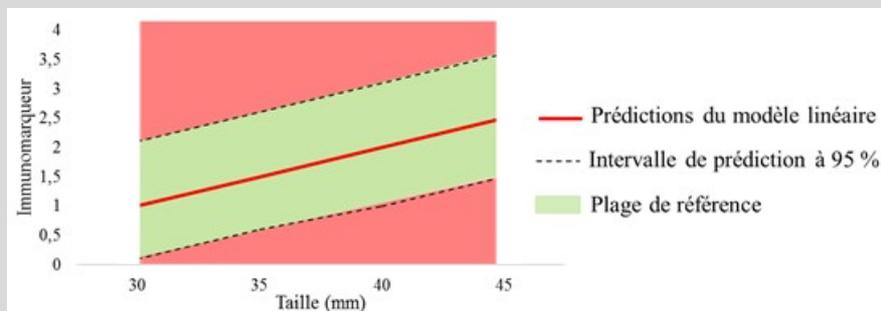
La capacité et l'efficacité de phagocytose sont évaluées sur un seul échantillon de 200 μL auquel 10 μL d'une solution de billes fluorescentes (fluorospheres® carboxylate-modified microspheres, diamètre 1 μm , Invitrogen, P8823, 2.7×10^{10} particules/mL) diluées au 1/10ème dans du L15 médium a été ajouté. Les échantillons sont incubés pendant 1 h à l'obscurité et à température ambiante d'après la méthode de Bado-Nilles *et al.* (2011). L'efficacité de phagocytose, détectée en fluorescence verte (FL1), correspond à l'attachement et/ou à l'internalisation de trois billes ou plus et la capacité de phagocytose à l'attachement et/ou à l'internalisation d'une bille ou plus (**Encart 4**).

Encart 4. Analyse de l'activité de phagocytose chez l'épinoche à trois épines



Au sein de l'INERIS, un modèle statistique a été développé chez l'épinoche pour des immunomarqueurs en intégrant l'effet de trois facteurs confondants, que sont la période de prélèvement, la taille et le sexe des organismes (Marchand *et al.* 2019). Ces facteurs confondants ont été sélectionnés car ils ne peuvent être pris en compte qu'en utilisant un modèle statistique (**Encart 5**). Afin de limiter les sources de variations naturelles, quatre classes de taille d'épinoches ont été maintenues en conditions contrôlées de laboratoire pendant un an avec une température et une photopériode mimant les variations saisonnières naturelles. Les organismes ont été prélevés tous les deux mois. Faisant suite aux expérimentations, les analyses statistiques ont montré l'importance de la période de prélèvement dans la création du modèle statistique. La prise en compte de la taille et du sexe augmente également sensiblement la qualité des modèles créés. Ce travail a permis d'obtenir et de valider, pour chaque immunomarqueur, un modèle linéaire prédisant, à une date donnée, les valeurs des immunomarqueurs et leur plage de variation naturelle (intervalle de prédiction à 95 %).

Encart 5. Schéma d'une plage de valeurs de référence théorique



Ce modèle est actuellement intégré dans deux campagnes d'encagement afin d'en éprouver sa validité (DIADeM¹⁴ & BIOSURVEILLANCE¹⁵).

De façon globale, différents points sont ressortis de ces études :

- amélioration de l'interprétation des données grâce au modèle statistique par identification de faux positifs liés notamment à des différences de taille dans les poissons échantillonnés.
- augmentation de la robustesse du modèle statistique et de sa prédictibilité en y intégrant des données issues de différents sites témoins.
- possibilité de classer les sites entre eux à partir du pourcentage de données localisées en dehors des valeurs de référence.

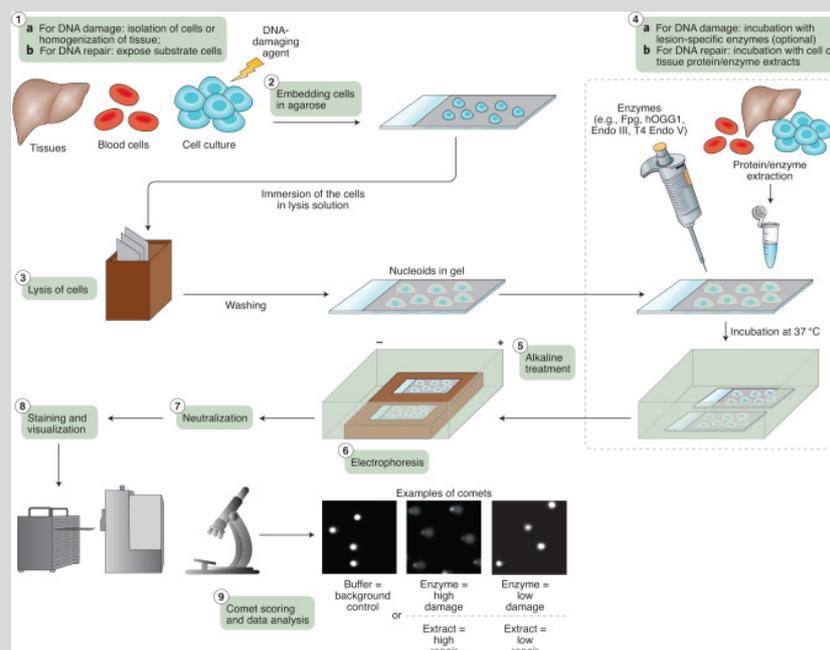
¹⁴ 2017-2020 INTERREG IV France - Wallonie – Vlaanderen DIADeM « Développement d'une approche intégrée pour le diagnostic de la qualité des eaux de la Meuse ».

¹⁵ 2019-2020 Agence de l'Eau Seine Normandie « Proposition d'un pilote basé sur l'utilisation de biomarqueurs pour un appui à la surveillance de la qualité des masses d'eau du district Seine-Normandie ».

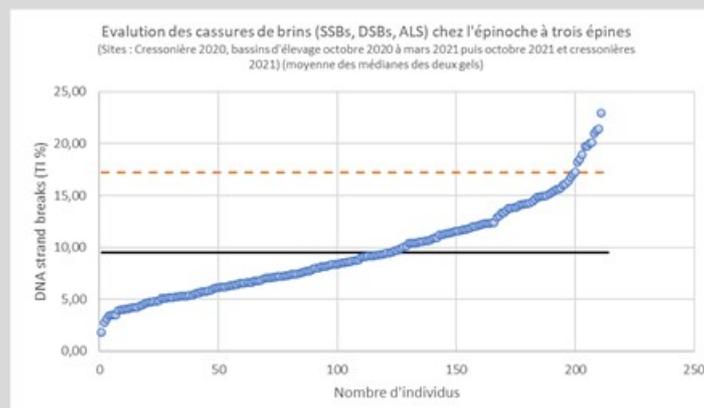
4 Analyses des taux de dommages à l'ADN des érythrocytes

Les cassures de brin (SSBs, DSBs, ALS) ont été évaluées par l'application du test des comètes dans sa version alcaline sur les érythrocytes cryoconservés selon le protocole défini par Singh *et al.* (1988) et précédemment adapté chez l'épinoche à trois-épines par Santos *et al.* (2016), tel qu'illustré dans l'**Encart 6**. Brièvement, après décongélation et ajustement de la densité cellulaire de l'échantillon, deux dépôts du mélange cellules/agarose ont été réalisés sur lames microscopiques. Les érythrocytes ont ensuite été traités pour accéder au nucléoïde (solution de lyse) et obtenir un ADN monocaténaire (tampon de dénaturation) avant de révéler les cassures sur chacun des brins par électrophorèse. Le réappariement partiel des brins a ensuite été effectué (tampon de neutralisation) avant la déshydratation des lames (éthanol absolu). Les lames ont été maintenues à température ambiante dans le noir jusqu'à leur coloration au Sybr Green 1 X. Après photographie au microscope à fluorescence (EVOS), 100 comètes par gel soit au total 200 comètes (= érythrocytes) par poisson ont été scorées avec un logiciel d'analyse d'image semi-automatisé (Comet IV software). Les cassures de brin sont exprimées en % de « tail intensity » (% TI).

Encart 6. Protocole du test des comètes alcalin.



Encart 7. Plage de variation naturelle dans un intervalle à 95 % sur les données issues des stations étudiées.



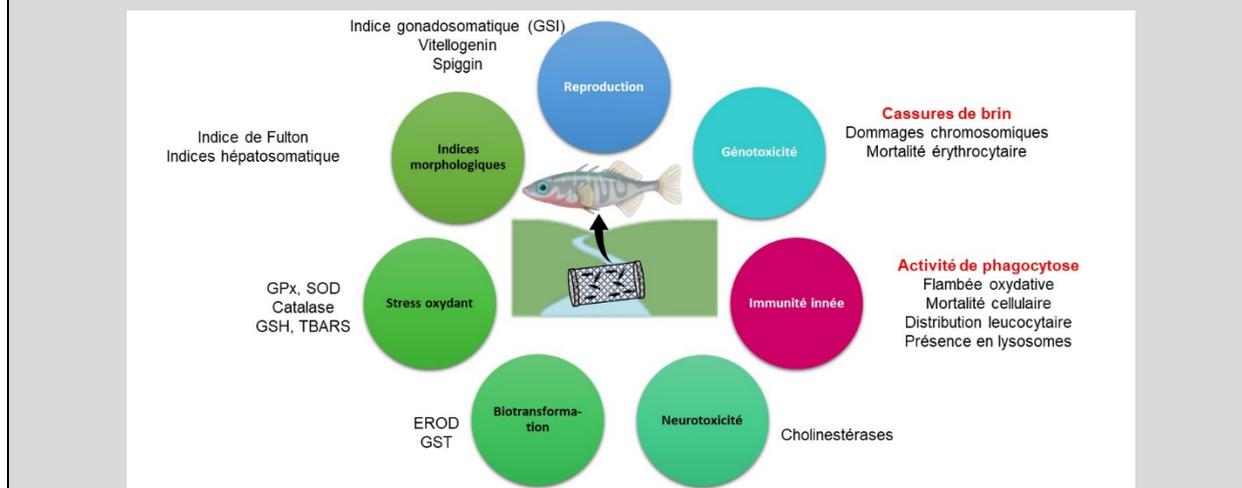
	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez l'épinoche à trois-épines, <i>Gasterosteus aculeatus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Une première évaluation de la variation naturelle des biomarqueurs a été effectuée en prenant en considération le quantile à 95 % que l'ensemble des valeurs issues des stations témoins (données issues des bassins d'élevage extérieur de l'INERIS et cressonniers étudiés au cours du projet, **Encart 7**). Comme pour les immunomarqueurs, un modèle mathématique plus poussé est en cours de développement.

5 Analyse multi-biomarqueurs

En plus des biomarqueurs cités, un panel plus large de biomarqueurs est également dosé dans le cadre des campagnes de terrain (**Encart 8**). Ces différents biomarqueurs vont permettre de renseigner plus finement sur les réponses physiologiques obtenues. Néanmoins, des paramètres plus en lien avec le métabolisme énergétique doivent être également proposés en routine et les réponses physiologiques pourront également être étayées par de nouveaux biomarqueurs.

Encart 8. Ensemble des paramètres biologiques suivis en routine chez l'épinoche à trois-épines. En rouge les biomarqueurs proposés dans le cadre du projet SASHIMI.



Références bibliographiques

- Bado-Nilles, A., C. Quentel, D. Mazurais, J. L. Zambonino-Infante, M. Auffret, H. Thomas-Guyon, and S. Le Floch. 2011. In vivo effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74**:1896-1906.
- Bado-Nilles, A., R. Techer, J. M. Porcher, A. Geffard, B. Gagnaire, S. Betoulle, and W. Sanchez. 2014. Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Environmental Toxicology and Pharmacology* **38**:672-683.
- Barber, I., and J. P. Scharsack. 2010. The three-spined stickleback-*Schistocephalus solidus* system: an experimental model for investigating host-parasite interactions in fish. *Parasitology* **137**:411-424.
- Cant, A., M. Bonnard, J. M. Porcher, J. Prygiel, A. Catteau, L. Delahaut, O. Palluel, C. Turiès, A. Geffard, and A. Bado-Nilles. 2022. Integration of Genotoxic Biomarkers in Environmental Biomonitoring Analysis Using a

	Procédure de d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez l'épinoche à trois-épines, <i>Gasterosteus aculeatus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Multi-Biomarker Approach in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus* Linnaeus, 1758). Toxics **10**.

- Catteau, A., A. Bado-Nilles, R. Beaudouin, C. Tebby, S. Joachim, O. Palluel, C. Turiès, N. Chrétien, K. Nott, S. Ronkart, A. Geffard, and J.-M. Porcher. 2021. Water quality of the Meuse watershed: Assessment using a multi-biomarker approach with caged three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **208**:111407.
- de Kermoyan, G., A. R. Péry, J. M. Porcher, and R. Beaudouin. 2013. A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions. *Math Biosci* **244**:148-153.
- Ernst, W., K. Doe, P. Jonah, J. Young, G. Julien, and P. Hennigar. 1991. The toxicity of chlorothalonil to aquatic fauna and the impact of its operational use on a pond ecosystem. *Arch Environ Contam Toxicol* **21**:1-9.
- Le Guernic, A., W. Sanchez, A. Bado-Nilles, O. Palluel, C. Turies, E. Chadili, I. Cavalié, L. Delahaut, C. Adam-Guillermin, J.-M. Porcher, A. Geffard, S. Betoulle, and B. Gagnaire. 2016a. *In situ* effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). *Ecotoxicology* **25**:1234-1259.
- Le Guernic, A., W. Sanchez, O. Palluel, A. Bado-Nilles, C. Turies, E. Chadili, I. Cavalié, C. Adam-Guillermin, J.-M. Porcher, A. Geffard, S. Betoulle, and B. Gagnaire. 2016b. *In situ* experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* **42**:643-657.
- Marchand, A., C. Tebby, R. Beaudouin, Y. M. I. Hani, J. M. Porcher, C. Turies, and A. Bado-Nilles. 2019. Modelling the effect of season, sex, and body size on the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, cellular innate immunomarkers: A proposition of laboratory reference ranges. *Sci Total Environ* **648**:337-349.
- Marchand, A., C. Tebby, A. Catteau, C. Turiès, J. M. Porcher, and A. Bado-Nilles. 2021. Application in a biomonitoring context of three-spined stickleback immunomarker reference ranges. *Ecotoxicol Environ Saf* **223**:112580.
- Sanchez, W., S. Aït-Aïssa, O. Palluel, J.-M. Ditché, and J.-M. Porcher. 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* **16**:279-287.
- Santos, R., A. Joyeux, O. Palluel, M. Palos-Ladeiro, A. Besnard, C. Blanchard, J. M. Porcher, S. Bony, A. Devaux, and W. Sanchez. 2016. Characterization of a genotoxicity biomarker in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): Biotic variability and integration in a battery of biomarkers for environmental monitoring. *Environmental Toxicology* **31**:415-426.
- Santos, R., M. Palos-Ladeiro, A. Besnard, J. M. Porcher, S. Bony, W. Sanchez, and A. Devaux. 2013. Relationship between DNA damage in sperm after *ex vivo* exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. *Reproductive Toxicology* **36**:6-11.
- Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice, and E. L. Schneider. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **175**:184-191.
- Svecevičius, G. 2006. Acute Toxicity of Hexavalent Chromium to European Freshwater Fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **77**:741-747.
- Vindeløv, L. L., and I. J. Christensen. 1990. A review of techniques and results obtained in one laboratory by an integrated system of methods designed for routine clinical flow cytometric DNA analysis. *Cytometry* **11**:753-770.
- Wootton, R. 1984. Functional biology of sticklebacks. Department of Zoology, university of Sheffield, London.

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le flet, <i>Platichthys flesus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le flet, *Platichthys flesus*

1 Présentation du modèle biologique : le flet (*Platichthys flesus*)

Le flet est une espèce amphihaline qui réalise une très grosse partie de son cycle biologique en estuaire (de son recrutement à l'état juvénile dans les zones de nurseries estuariennes, à sa reproduction à l'embouchure des estuaires). C'est un modèle biologique intégrateur de la qualité de l'habitat estuarien aux niveaux chimique, physique et hydro-climatique. Cette espèce est donc particulièrement pertinente pour valider des méthodologies exploratoires sur le fonctionnement de populations soumises à des stress environnementaux dans des écosystèmes estuariens, de la zone oligohaline à la zone polyhaline. Les juvéniles de flet sont utilisés dans de nombreuses expériences d'encagement pour faire des suivis de la pollution en milieux marins et estuariens (Husoy et al., 1996 ; Beyer et al., 1986 ; George et al., 2000 ; Borcier et al., 2019 ; Kazour et al., 2020).



Figure1. Le flet (*Platichthys flesus*).

2 Déploiement des organismes par encagement

2.1 Acquisition des juvéniles de flet

Les juvéniles de flet utilisés pour l'encagement sont des individus sauvages capturés dans un petit estuaire peu anthropisé, l'estuaire de la Canche. Les pêches des juvéniles de flet sont réalisées dans la partie mésohaline de l'estuaire entre la fin de l'été et le début de l'automne (entre septembre et novembre). A cette période, les juvéniles de flet mesurent entre 7 et 10 cm et ont vécu en estuaire entre 4 à 5 mois. Il est possible d'utiliser aussi des juvéniles de flet issus d'élevage (reproduction artificielle). A notre connaissance, le seul fournisseur se trouve au Danemark (<https://fishlab.dk/>).

L'échantillonnage en estuaire se fait à l'aide d'un petit chalut à perche remorqué par un bateau semi-rigide type Zodiac. Le chalut utilisé a une ouverture de 1,5m et le maillage du filet à l'extrémité du chalut est de 5 mm. Les poissons sont pêchés à contre-courant et la vitesse de pêche du bateau doit être d'environ 2 nœuds. Pour éviter de stresser les poissons et de les récolter en bon état, la durée des traits de chalut est courte de l'ordre de 10 minutes. A la remontée du chalut, les poissons récupérés (individus dont la taille est comprise entre 7 et 10 cm) doivent être maintenus dans un grand bac rempli avec de l'eau du lieu de pêche. L'eau du bac doit être oxygénée (bulleurs) et renouvelée régulièrement.

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le flet, <i>Platichthys flesus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

pour éviter de stresser les poissons et de les maintenir en vie jusqu'au laboratoire.

La température, la salinité et l'oxygène dissous de la zone de prélèvement doivent être mesurées (sonde multiparamètres) pour acclimater les poissons au laboratoire dans les mêmes conditions.

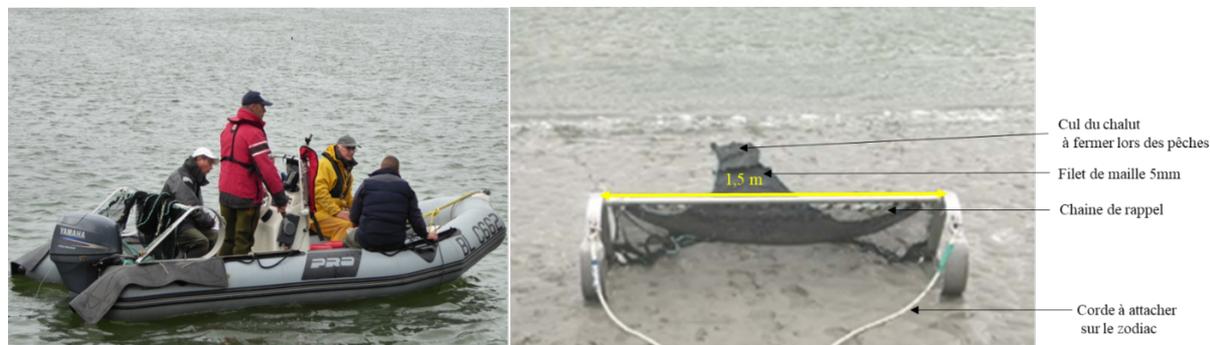


Figure 2. Pêche des flets avec le Zodiac (A). Chalut à perche utilisé pour la pêche des flets (B ; 3 personnes au minimum)

2.2 Stabulation des flets au laboratoire

Les juvéniles de flets doivent être acclimatés au laboratoire durant une quinzaine de jours. Le rôle de l'acclimatation des poissons est double. L'acclimatation permet une dépurcation des poissons d'une part et d'autre part de les adapter aux conditions physico-chimiques (température, salinité etc.) du ou des milieux où ils vont être déployés pour l'encagement.

L'acclimatation peut se faire dans un bac de 500 litres placé dans une salle thermostatée. Le bac est alimenté par de l'eau de mer filtrée à 1µm (filtration décroissante sur des filtres de 100 µm, 50 µm, 25 µm, 10 µm). Pour avoir la même salinité que le lieu où les poissons ont été pêchés, il faut ajuster la salinité avec l'eau du robinet déchlorée 24 h avant utilisation. L'eau du bac doit être aérée avec des bulleurs afin de maintenir une teneur en oxygène dissous dans l'eau du bac entre 6 et 10 mg/l. Elle doit être renouvelée au 1/3 au minimum deux fois par semaine. La température et la photopériode de la salle thermostatée doit correspondre à celle du milieu où les organismes ont été pêchés puis réglée progressivement ensuite de façon à ce qu'elle soit identique à celle du lieu d'encagement.

Les poissons peuvent être nourris deux fois par jour avec des proies vivantes congelées ou frais (Krill, artémias, mysidacés etc.). La température, la salinité, l'oxygène dissous et la turbidité doivent être vérifiés deux fois par jour (matin et soir) avant de nourrir les poissons.

NB : 1) Vérifier l'état général des poissons idéalement au moment de la distribution de la nourriture. 2) Ne jamais utiliser l'eau du robinet directement sans l'avoir déchloré dans le bac contenant les poissons. L'eau du robinet détruirait une bonne partie des bactéries épuratrices. 3) Nettoyer les sucres des bulleurs, les filtres de la pompe régulièrement avec de l'eau de mer propre. 4) Racler le fond du bac avec une époussette pour ramasser les restes des aliments et siphonner les détritrus accumulés sur la paroi du bac avant de nourrir les poissons.



Figure 3. Dispositif utilisé pour l'acclimatation des flets.

2.3 Conditions spécifiques de mise en cage

Les encagements peuvent se dérouler sur une durée de 15 à 30 jours. Les cages utilisées pour l'encagement des flets ont une dimension de 100 cm de longueur, 60 cm de largeur et 60 cm de hauteur. L'armature est en Inox et le grillage (en plastique) a un maillage de 15mm. Le volume total d'une cage est de 360 litres. Sur l'armature inférieure de la cage, une chaîne est fixée pour assurer le maintien de la cage en contact avec le fond.

Pour le déploiement des cages dans le milieu naturel, il faut une petite embarcation. Les cages seront fixées sur le fond avec des ancrs plates de 15 kg (2 ancrs par cage). Elles seront repérées par des bouées de repérage attachées à la cage à l'aide d'une corde dont la longueur doit être égale à deux fois la hauteur de l'eau en période de vive-eau.

24h avant leur mise en cage, les juvéniles de flet devront être anesthésiés en les plaçant sur de la glace, puis rapidement pesés individuellement (à 0,01g près) et leur longueur totale mesurée (à 0,1mm près)

Pour chaque cage, préparer 15 poissons et les placer dans un bidon contenant de l'eau présentant les mêmes caractéristiques de température et de salinité que le milieu où les poissons vont être encagés. Pour le transport, essayer de maintenir la température et bien oxygénée l'eau. Il convient de ne pas nourrir les flets 24h avant l'encagement.

Une fois sur site, les poissons sont acclimatés une quinzaine de minutes dans un mélange eau des bidons de transport / eau du site d'étude. Les poissons sont ensuite mis dans la cage à l'intérieur du bac préalablement rempli d'eau du lieu d'encagement.

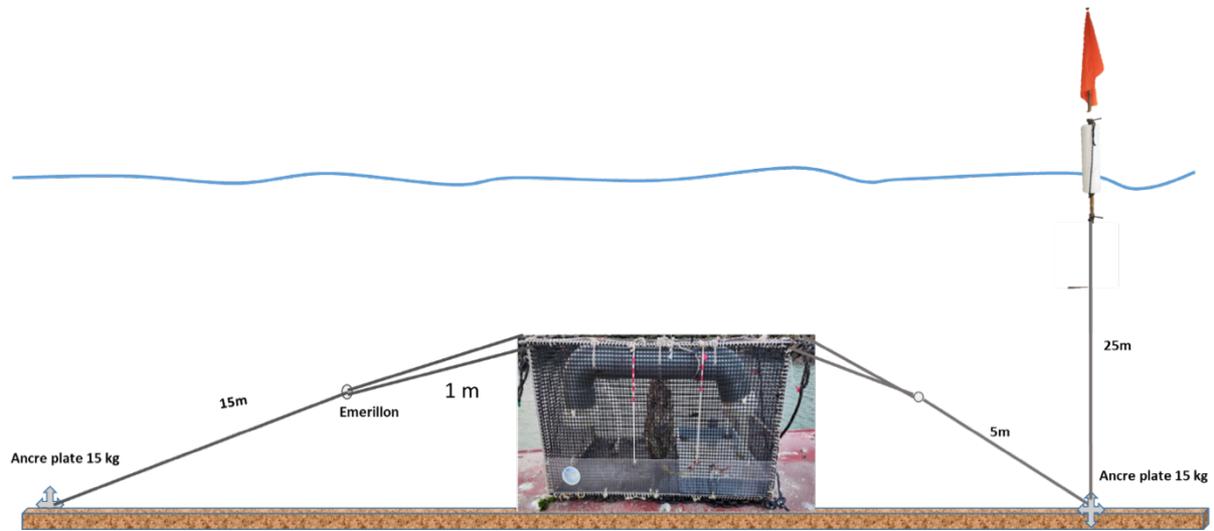


Figure 4. Schéma récapitulatif de fixation des cages de flets.

Encart 1. Le projet SASHIMI nous a permis d'améliorer et d'optimiser nos cages avec des dispositifs permettant d'une part d'améliorer le bien-être des poissons et d'autre part de faciliter la fixation et le développement des proies vivantes pour les poissons.

Le dispositif de protection contre les courants est constitué de plaques en Plexiglas fixées sur la base des 4 côtés de chaque cage, d'un tuyau en PVC courbé sur les deux extrémités puis trouées pour faciliter la circulation de l'eau et d'un bac de 10 cm de hauteur fixé sur la base de la cage. Afin de faciliter l'accès à la nourriture aux poissons, un récif constitué de coquilles d'huîtres est fixé à l'intérieur de chaque cage. Les récifs doivent être préalablement placés dans l'eau de mer ou d'eau douce selon le lieu d'encagement pendant 15 jours avant d'être fixés dans les cages le jour de la mise en cage ; cela permet le développement et la fixation de divers proies. La figure ci-dessous montre les différentes améliorations apportées aux cages.

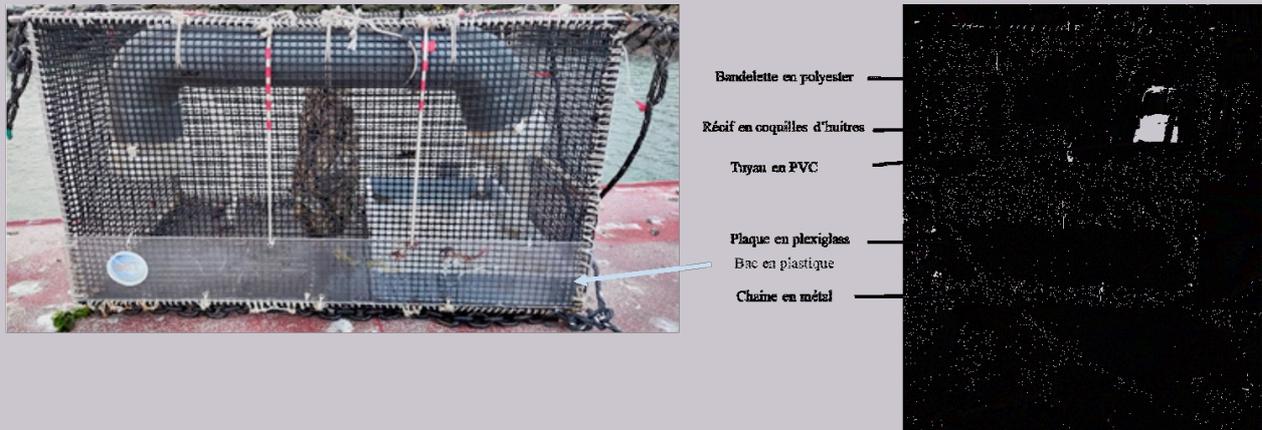


Figure 5. Cages améliorées utilisées pour l'encagement des juvéniles de flets.

Avant l'amélioration des cages, nous avons observé sur les poissons encagés comparés aux témoins, une baisse des indices de fitness comme le ratio ARN/ADN et les protéines totales dues probablement à un problème d'accès à la nourriture. Avec l'amélioration des cages, nous observons une meilleure performance physiologique sur les poissons encagés comparés aux témoins de la même année. Avec ces nouveaux développements, les taux de survie sont proches de 100%.

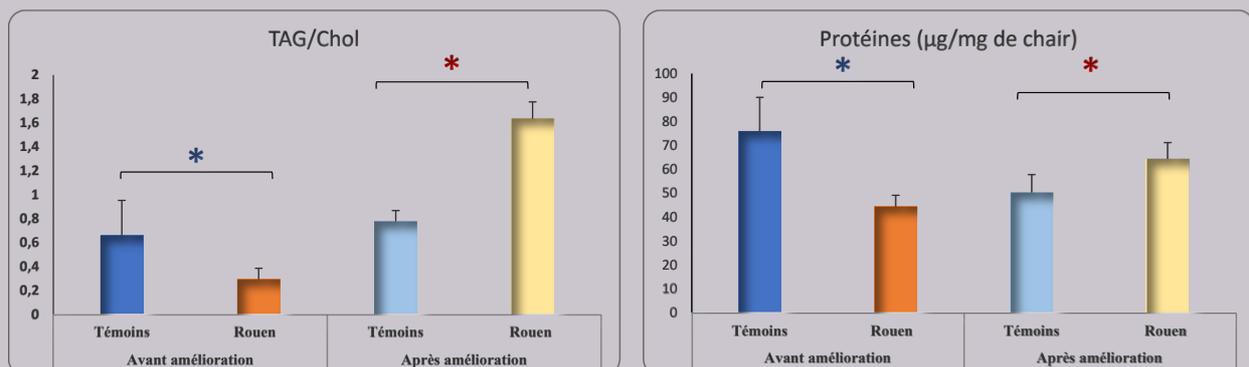


Figure 6. Comparaison du ratio TAG/Chol et les concentrations en protéines totales des flets mis en cages avant et après l'ajout des dispositifs de protection et d'accès à la nourriture. * Différence significative entre les témoins et les poissons encagés

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le flet, <i>Platichthys flesus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

3 Analyse de la réponse immunitaire

Les paramètres immunologiques ont été mesurés dans les leucocytes spléniques en raison de la capacité de cet organe à filtrer le plasma, à piéger les substances véhiculées par le sang et à enrichir le sang en nouvelles cellules immunitaires (Press et Evensen, 1999). Pour obtenir des suspensions de leucocytes dans la rate, celle-ci devra être broyée sur un filtre en Nylon stérilisé (Sigma) de maille 40 µm puis récupérée dans 5 ml de milieu de Leibovitz 15 (L15) (Sigma) supplémenté avec 10 U/mL d'héparine lithium (Sigma), 500 U/mL de pénicilline (Sigma) et 500 U/mL de streptomycine (Sigma). Pour éliminer les biais liés aux stress du poisson avant d'être sacrifié, les suspensions cellulaires doivent être stockées à 4°C durant 12h (Anne Bado-Nilles et al., 2014). Ensuite, les échantillons devront être chargés sur des gradients de Ficoll (Histopaques1077, Eurobio) à une densité de 1077 g/ml. Après centrifugation (400g, 30 min, 4 ° C), les suspensions enrichies en leucocytes seront recueillies à l'interface et lavées deux fois (300g, 5 min, 4 ° C) avec le milieu L15 par centrifugation à basse vitesse pour éliminer les thrombocytes. Les cellules devront être remises en suspension dans 1 ml du milieu L15. Pour obtenir des résultats comparables, la concentration en leucocytes dans l'échantillon sera ajustée à 10⁶ cellules/ml dans du milieu L15 avec un hémocytomètre de Malassez avant l'analyse par cytométrie de flux. Les analyses seront effectuées sur des leucocytes entiers, en utilisant un cytomètre de flux CyAn™ ADP (Beckman coulter). Au total, 10 000 événements par échantillon devront être analysés après excitation cellulaire par un laser à argon à 488 nm. Les sous-populations de leucocytes (lymphocytes et granulocytes - macrophages) seront identifiées par leur taille et leur complexité en utilisant leurs paramètres relatifs Forward scatter (FSC) et Size scatter (SSC). La distribution des leucocytes est évaluée en pourcentage de chaque sous-population).

L'activité de la phagocytose est évaluée après une heure d'incubation dans l'obscurité et à la température ambiante d'une suspension de leucocytes de la rate avec une microsphère fluorescente à une concentration de 2,7 x 10⁷ particules/ml (microsphère modifiée par du carboxylate de Fluorospheres®, diamètre 1 µm, Invitrogen) (Gagnaire et al., 2004). L'activité de phagocytose est définie par : la capacité de phagocytose (capacité d'adhésion de la membrane plasmique des leucocytes ; fluorescence d'au moins une perle) et l'efficacité de phagocytose (pourcentage de leucocytes englobant des microsphères ; fluorescence d'au moins trois billes).

Acquisition des valeurs basales de l'efficacité et de la capacité de phagocytose des flets

Les valeurs basales des réponses immunitaires ont été calculées à partir d'une base de données réalisée sur des flets pêchés dans l'estuaire de la Canche et acclimatés durant 14 jours au laboratoire puis exposés dans des viviers au laboratoire pendant 15 jours. La base de données a été réalisée sur trois années (*i.e.* de 2018, 2020 et 2021). Pour s'affranchir des facteurs confondants (taille, sexe, âge) sur la variation des réponses de l'immunité innée, les juvéniles de flets utilisés sont de la même gamme de taille (7 – 9 cm) et pêchés à la même période (fin d'été-début d'automne). Pour chaque année, le coefficient de variation, la moyenne, l'écart-type et l'intervalle de confiance à 95 % ont été calculés pour évaluer la capacité de phagocytose et l'efficacité de phagocytose des flets. Le coefficient de variation a été calculé d'après la formule suivante :

$$CV = 100 * \frac{m}{ET}$$

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le flet, <i>Platichthys flesus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

Où m représente la moyenne arithmétique et ET l'écart-type.

Les résultats des calculs montrent une faible variabilité des réponses de la capacité de phagocytose mesurée sur les poissons de la même année contrairement à l'efficacité de phagocytose où les réponses varient légèrement entre les individus d'une même année. Si on compare les moyennes des pourcentages de capacité de phagocytose (CP) entre les flets exposés au laboratoire des différentes années, on voit que les flets de 2020 présentent les valeurs significativement plus faibles que les autres années qui ne présentent aucune différences significatives (Kruskal Wallis $p < 0,05$). Les % de CP (\pm IC 95%) sont respectivement $77,42 \pm 1,40$ % ; $72,08 \pm 2,20$ % et $75,11 \pm 1,80$ % pour les témoins exposés au laboratoire de 2018, 2020 et 2021. Pour l'efficacité de phagocytose (EF), ce sont les flets de 2018 avec un pourcentage d'EF égal à $30,02 \pm 2,07$ % qui présentent une différence significativement plus faible (Kruskal Wallis $p < 0,05$) que ceux des flets de 2020 et de 2021. Ces derniers présentent des % de d'EF identiques avec respectivement $47,24 \pm 4,66$ % et $47,05 \pm 3,48$ % pour les témoins exposés au laboratoire de 2020 et 2021. Etant donné que les réponses phagocytaires sont différentes d'une année à l'autre pour les flets exposer dans les mêmes conditions, pour établir leurs valeurs, nous avons défini dans un premier temps des intervalles pour l'EF et pour la CP. Pour l'EF, les témoins exposés au laboratoire de 2020 et de 2021 présentant les mêmes valeurs vont constituer l'intervalle supérieur et le % d'EF des témoins de 2018 vont constituer la limite inférieure. Une valeur basale intermédiaire est ensuite calculée (figure 7). De même, pour la CP, la limite supérieure de l'intervalle des valeurs basales est calculée en utilisant les témoins exposés au laboratoire des années 2018 et 2021 et la limite inférieure correspond à la valeur basale calculée sur les témoins exposés au laboratoire de 2020 (figure 7).

Ainsi pour l'efficacité de phagocytose l'intervalle des valeurs basales est : $30,02 \pm 2,07$ % < $38,73 \pm 2,78$ % < $47,14 \pm 2,73$ %.

Pour la capacité de phagocytose l'intervalle des valeurs basales est : $72,08 \pm 2,20$ % < $75,47 \pm 1,52$ % < $76,63 \pm 1,77$ %.

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm IC 95%. Le seuil d'inhibition correspond à -25% de l'intervalle inférieur pour la capacité de phagocytose et pour l'efficacité de phagocytose.

Les valeurs basales calculées ici sont issues des juvéniles de flets dont la taille est comprise entre 7 et 10 cm, acclimatés dans des conditions strictes au laboratoire en fin d'été début automne. Ces données ne peuvent être utilisées que pour des juvéniles Des données supplémentaires issues des témoins au laboratoire et des sites témoins sont nécessaires pour consolider les valeurs basales et établir un modèle qui permettra de déclasser les sites présentant des réponses immunitaires différentes des juvéniles de flet.

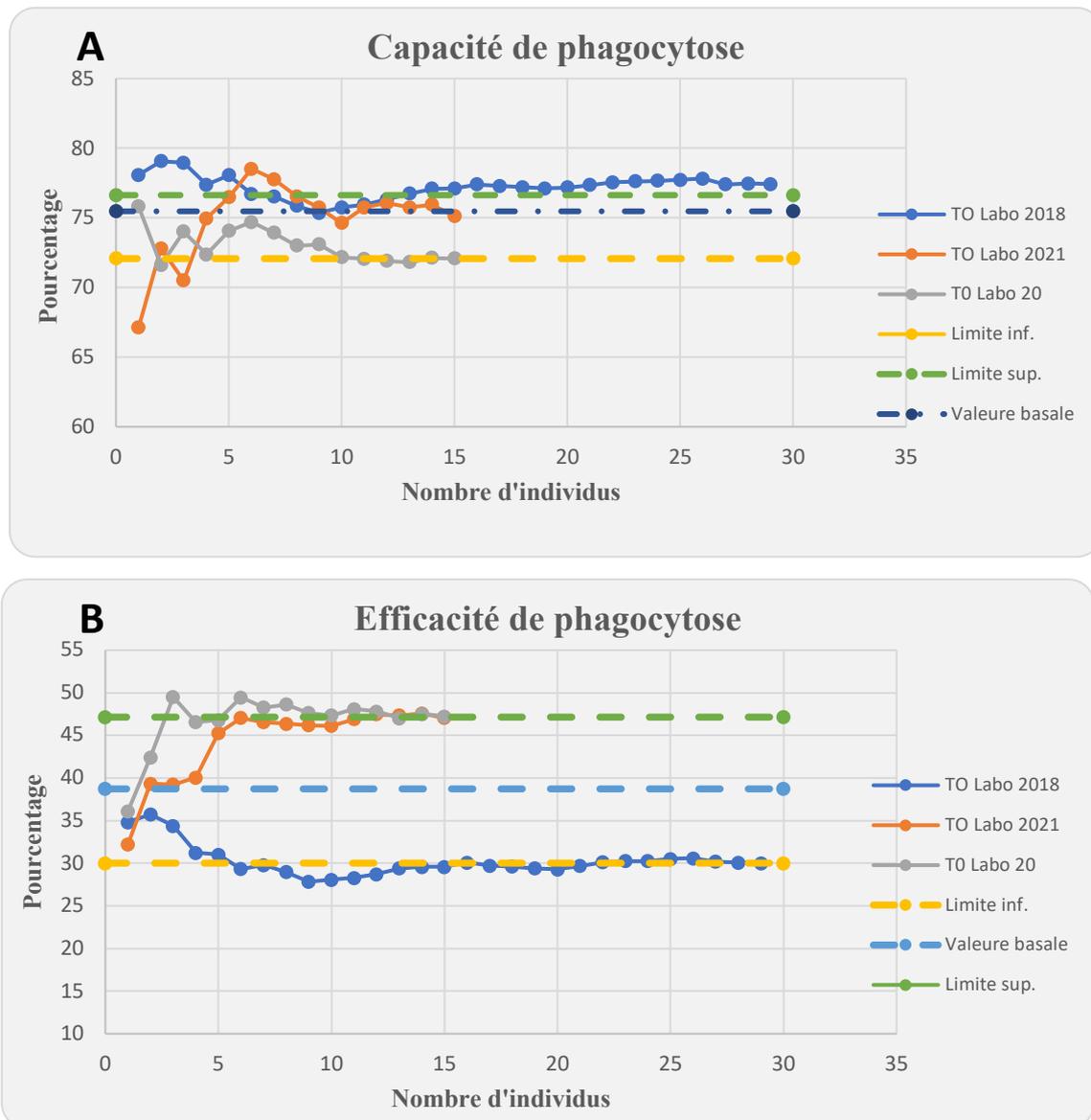


Figure 7. Variation des moyennes des % de capacité de phagocytose calculées sur les témoins des différentes années (T0 2018, T0 2020 et T0 2021) et l'intervalle des valeurs basales calculé (A) et variation des moyennes des % d'efficacité de phagocytose calculées sur les témoins des différentes années (T0 2018, T0 2020 et T0 2021) et l'intervalle des valeurs basales calculé (B).

4 Analyse des taux de dommage à l'ADN érythrocytaire

Les taux de dommage à l'ADN chez les flets sont mesurés dans des échantillons de sang selon le protocole décrit par Singh *et al.* (1988) avec quelques modifications. Pour cela, les échantillons doivent être prélevés à l'aide d'une seringue héparinée, 10 µl de sang doivent être ajoutés à 1ml de milieu de cryopréservation Vindeloff (250mM sucrose, 40 mM trisodium citrate, 5% DMSO, pH7.6), immédiatement congelés dans l'azote liquide puis conservés à - 80°C jusqu'à utilisation. Après une décongélation rapide des échantillons de sang, 10⁵ cellules vivantes doivent être prélevées et mélangées avec 90 µl d'Agarose

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le flet, <i>Platichthys flesus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

(Low Melting Point à 0,7%). 10 µl de ce mélange devront être déposés sur une lame préalablement recouverte d'une couche d'agarose (Normal Melting Point à 1%). Une fois les gels solidifiés sur glace, les lames sont traitées avec un tampon de lyse (100 mM EDTA, 2,5 M NaCl, 1% N-Laurylsarcosine, 10 mM Tris Base, 1% TritonX-100, 10% DMSO) froid au minimum pendant 1h à 4°C. La suite de l'expérimentation devra se dérouler dans la plus grande obscurité (sous lumière rouge) pour éviter la dégradation de l'ADN par la lumière. Pour la suite, les lames devront être recouvertes avec un tampon alcalin (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH>13) glacé pendant 40 min. La migration de l'ADN sera ensuite réalisée par électrophorèse en condition alcaline (tampon alcalin : 300 mM NaOH, 1mM EDTA, pH>13) pendant 20 min à 23V (0,8 V/cm) et 300 mA. La migration devra être neutralisée par incubation des lames dans un tampon Tris 0,4 M glacé pendant 3x5 min. Après séchage à température ambiante, l'ADN devra être coloré avec un colorant SYBrGold et les lames recouvertes d'une lamelle avec un milieu de montage Mowiol avant d'être conservées à l'obscurité et à température ambiante pendant une nuit avant analyse.

L'analyse automatisée sera réalisée à l'aide d'un analyseur d'image CellInsight CX5 HCS® (Thermo). Les résultats de cette analyse sont exprimés en pourcentage d'ADN dans la queue de comète (% DNA tail) ou en Olive Tail Moment (unité arbitraire) à l'aide du logiciel HCS Studio® (Thermo Scientific).

Acquisition des valeurs basales des comètes

Comme pour les réponses immunitaires, les valeurs basales des comètes ont été calculées à partir d'une base données réalisée sur des témoins pêchés dans l'estuaire de la Canche et acclimatés durant 14 jours au laboratoire puis exposés au laboratoire durant 15 jours. La base de données a été réalisée sur les trois années (*i.e* de 2018 ; 2020 et 2021). Pour s'affranchir des facteurs confondants (taille, sexe, âge) sur la variation des taux de dommage à l'ADN, les juvéniles de flets utilisés sont de la même gamme de taille (7 – 9 cm) et pêchés à la même période (fin d'été-début d'automne). Le tableau 1 présente les moyennes, les écart-types, les coefficients de variation et les intervalles de confiance des taux de dommage à l'ADN calculés pour chaque année.

Tableau 1. Niveau des taux de dommage à l'ADN chez les flets stabulés au laboratoire. Les valeurs sont exprimées en moyenne ± intervalle de confiance à 95 % (IC 95%). CV % représente le taux de variation.

Saison	Localisation	Années	Moyenne	±	IC 95%	Ecart-type	CV %
Automne	Labo	2018	32,01	±	1,64	4,52	14,13
Automne	Labo	2020	32,91	±	2,6	5,13	15,59
Automne	Labo	2021	32,14	±	2,03	4,02	12,51

Le premier constat que nous pouvons faire est qu'il y'a une faible variabilité entre les individus de la même année. Les coefficients de variations sont compris entre 12 et 15,59% pour tous les témoins des différentes années d'études. Les moyennes des valeurs basales calculées pour chaque année montrent qu'elles sont égales d'une année à l'autre. La comparaison par paires de Tuckey réalisée sur les taux de dommage de l'ADN des différentes années ne permet pas de déclasser les différentes années. Ainsi un seul groupe s'est formé pour les 3 années (figure 8).

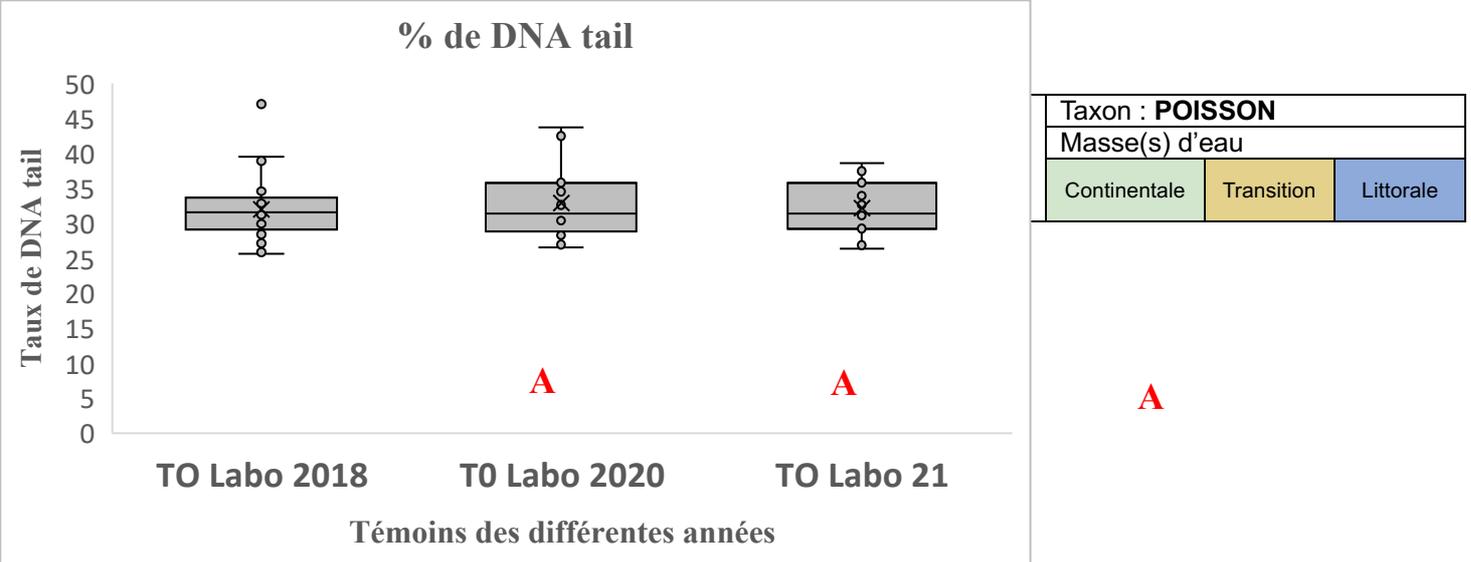


Figure 8. Variation des taux de dommages de l'ADN érythrocytaire des témoins exposés au laboratoire des différentes années d'études.

Étant donné qu'il n'y a aucune différence (Anova, $p < 0.05$) entre les taux de dommages à l'ADN des trois années, pour l'établissement des valeurs basales nous avons calculé la moyenne des taux de dommages en prenant en compte tous les individus de toutes les années. La valeur basale des taux de DNA tail exprimée en moyenne \pm intervalle de confiance à 95 % calculée est égale à $32,28 \pm 1,16\%$. L'intervalle inférieur est calculé en retranchant l'IC 95% de la moyenne basale et l'intervalle supérieure est déterminé en additionnant l'IC 95% à la moyenne basale. La figure 9 représente l'évolution des moyennes des taux de dommage à l'ADN calculées sur les différents individus, la valeur basale calculée pour chaque année et les intervalles (supérieure et inférieure) de la valeur basale.

Ainsi l'intervalle des valeurs basales qu'on peut établir pour les taux de dommages des érythrocytes des flets est le suivant : $31.12\% < 32.28\% < 33.44\%$.

NB : Les valeurs basales pour les réponses immunitaires et les taux de dommages des comètes doivent être utilisées avec beaucoup de précautions. Ces valeurs ont été calculées sur des juvéniles de flets pêchés en fin d'été, début automne puis acclimatés dans des conditions strictes au laboratoire puis exposés au laboratoire. Ces valeurs basales nécessitent d'être consolidées avec des données issus des juvéniles de flets exposés dans des bassins extérieurs propres.

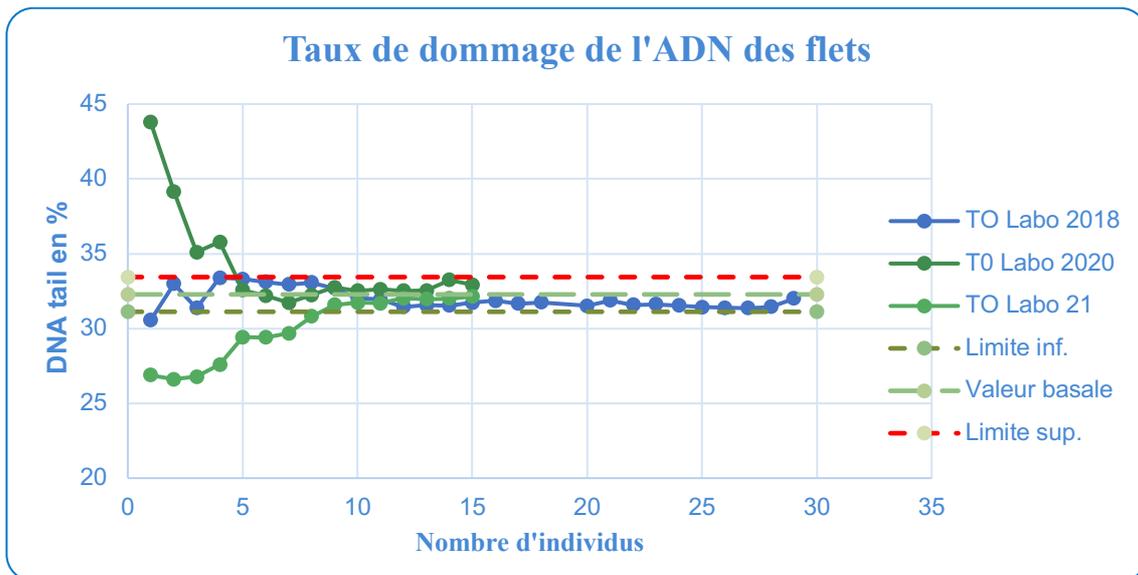


Figure 9. Variation des moyennes des taux de dommage à l'ADN calculées sur les flets exposés au laboratoire des différentes années (TO 2018, TO 2020 et TO 2021), la valeur basale calculée pour toutes les années et l'intervalle de la valeur basale (limite inférieure et limite supérieure).

5 Analyse de la condition globale des flets

Sur les flets nous avons évalué les protéines totales, le rapport ARN/ADN et le rapport TAG/Chol, comme des indicateurs d'état nutritionnel et l'indice de condition de Fulton K comme un indicateur du bien-être général du poisson. L'indice morphométrique de Fulton est calculé suivant la formule :

$$K = 100 \frac{L}{W^3}$$

Les lettres L et W représentent respectivement la longueur totale et le poids du poisson.

Les protéines, les ARN et les ADN ont été mesurés dans les muscles de la face ventrale antérieure des flets suivant la procédure décrite par Clemmsen (1989). Toute la procédure doit se passer à une température avoisinant les 4°C. La quantité de protéine, d'ARN et d'ADN pourra être déterminée par fluorimétrie à l'aide d'un Qubit (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) en utilisant un kit d'analyse spécifique de protéine, d'ARN et d'ADN HS (Invitrogen, Life Technologies).

Les lipides totaux sont extraits dans les muscles de la face dorsale des flets après lyophilisation à -80°C selon la méthode de Folch légèrement modifiée.

Les classes de lipides sont séparées et quantifiées à partir des lipides totaux par chromatographie sur couche mince en utilisant le Iatroscan (MK-6s instrument Analyser Iatron Laboratories, Tokyo, Japan) équipé d'un détecteur à ionisation de flamme. Les classes de lipides seront identifiées suivant leur temps de rétention et l'aire des pics sera calculée en utilisant un logiciel (ChromStar CHS-1).

Références bibliographiques

Bado-Nilles, Anne, Stéphane Betouille, Alain Geffard, Jean-Marc Porcher, Béatrice Gagnaire, et Wilfried Sanchez.

	Procédure d'encagement et de mesures de biomarqueurs chez le flet, <i>Platichthys flesus</i>	Taxon : POISSON		
		Masse(s) d'eau		
		Continentale	Transition	Littorale

- « Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology. » *Environmental Science and Pollution Research* 20, n° 5 (2013): 2692-2704.
- Bado-Nilles, Anne, Sabrina Jolly, Jean-Marc Porcher, Olivier Palluel, Alain Geffard, Béatrice Gagnaire, Stéphane Betoulle, et Wilfried Sanchez. « Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus* sp. » *Environmental pollution* 184 (2014): 9-17.
- Beyer, Jonny, Endre Aas, Hild Karin Borgenvik, et Per Ravn. « Bioavailability of PAH in effluent water from an aluminium works evaluated by transplant caging and biliary fluorescence measurements of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) ». *Marine Environmental Research* 46, n° 1-5 (1998): 233-36.
- Borcier, Elodie, Sébastien Artigaud, Jean-Charles Gaillard, Jean Armengaud, Grégory Charrier, Jérôme Couteau, Justine Receveur, Baghdad Ouddane, Mamadou Diop, et Rachid Amara. « 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 (2019): 133760.
- Clemmesen, Catriona M. « Laboratory studies on RNA/DNA ratios of starved and fed herring (*Clupea harengus*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae ». *ICES Journal of Marine Science* 43, no 2 (1987): 122-28.
- Gagnaire, Beatrice, H Thomas-Guyon, et Tristan Renault. « In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes ». *Fish & Shellfish Immunology* 16, n° 4 (2004): 501-12.
- George, S, J Wright, E Carpena, et M Kindt. « Kinetics and magnitude of metallothionein induction by Cd, Cu, Hg and Zn in European flounder—calibration for environmental monitoring ». *Marine Environmental Research* 50, n° 1-5 (2000): 433-34.
- Singh, Narendra P, Michael T McCoy, Raymond R Tice, et Edward L Schneider. « A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells ». *Experimental cell research* 175, no 1 (1988): 184-91.
- Husøy, Astrid-Mette, Mark S Myers, et Anders Goksøy. « Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sørkjorden, Norway ». *Aquatic Toxicology* 36, n° 1-2 (1996): 53-74.
- Kazour, Maria, Sharif Jemaa, Maria El Rakwe, Guillaume Duflos, Ludovic Hermabassiere, Alexandre Dehaut, Flo-rane Le Bihanic, Jerome Cachot, Vincent Cornille, et Khalef Rabhi. « Juvenile fish caging as a tool for assessing microplastics contamination in estuarine fish nursery grounds ». *Environmental Science and Pollution Research* 27, n° 4 (2020): 3548-59.