



HAL
open science

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

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

► To cite this version:

B Xuereb, K Abbaci, Michel Auffret, A Bado-Nilles, Y Ben Cheikh, et al.. Projet SASHIMI : Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs. UMR I-02 SEBIO; OFB. 2023. hal-04246387

HAL Id: hal-04246387

<https://ofb.hal.science/hal-04246387v1>

Submitted on 18 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

Synthèse opérationnelle

Xuereb B¹, Abbaci K², Amara R³, Auffret M⁴, Bado-Nilles A⁵, Ben Cheikh Y¹, Bonnard I⁶, Bonnard M⁶, Burlion M¹, Chalghi H¹, Charle M⁶, Chaumot A², Costil K⁷, Coulaud R¹, Couteau J⁸, Delahaut L⁶, Dedourge-Geffard O⁶, Diop M³, Duflot A¹, Geffard O², Fisson C⁹, Le Foll F¹, Le Guernic A⁶, Maillet G⁸, Paolos-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

1	Contexte et objectifs généraux du projet	4
2	Définition des procédures d'engagement	5
2.1	Stratégie adoptée pour la définition des procédures d'engagement	5
2.2	Recueil, analyse et optimisation des procédures d'engagement	6
2.3	Choix de la période d'engagement	7
3	Harmonisation des protocoles analytiques des marqueurs, et adaptation à la surveillance	10
3.1	Marqueurs d'effets toxiques sur les systèmes immunitaires	10
3.1.1	Mesures des effets toxiques des contaminants environnementaux sur les systèmes immunitaires	10
3.1.2	Stratégie adoptée pour l'harmonisation des méthodes, dans le cadre du projet SASHIMI	11
3.1.3	Recueil, analyse et optimisation des procédures expérimentales pour l'ensemble des organismes du projet SASHIMI	11
3.1.4	Choix techniques pour l'opérationnalité terrain	14
3.2	Marqueurs d'altération de l'intégrité de l'ADN	14
3.2.1	Mesure des effets génotoxiques des contaminants	14
3.2.2	Stratégie adoptée pour l'harmonisation des méthodologies de COMET, dans le cadre du projet SASHIMI	15
3.2.3	Recueil et analyse des méthodologies de COMET mises œuvre au sein du consortium	15
3.2.4	Harmonisation et choix techniques pour l'opérationnalité terrain	16
3.3	Marqueurs d'atteinte à la fonction de reproduction	20
4	Cadre d'interprétation des marqueurs	22
4.1	Intégration de la variabilité naturelle et valeurs seuils	22
4.2	Définition des valeurs des référentiels d'interprétation pour les couples biomarqueurs/espèces, dans le cadre d'application du projet SASHIMI	22
5	Conclusion	25
6	Références bibliographiques	26

1 Contexte et objectifs généraux du projet

Cette action s'inscrit dans le cadre des missions de l'OFB relatives au soutien de programmes d'étude, de prospective et de recherche à visée opérationnelle, pour connaître et comprendre l'état et le fonctionnement des écosystèmes sous contraintes anthropiques. Plus spécifiquement, l'objectif est de développer et de mettre à disposition des méthodologies innovantes, permettant de caractériser la contamination chimique du milieu et d'en évaluer les impacts sur les organismes aquatiques le long d'un *continuum* terre-mer.

Pour établir le lien entre l'exposition à des contaminants et les effets toxiques, il est nécessaire de revenir à des observations aux niveaux d'organisation biologique inférieurs, de la molécule à l'individu. Le développement de biomarqueurs a été conduit, en ce sens, sur un grand nombre d'espèces dites sentinelles, selon des critères liés à leur sédentarité, leur aire de répartition et les connaissances sur leur biologie et écologie (e.g. Buisson et al., 2008 ; Xuereb et al., 2009 ; Bourgeault et al., 2010 ; Lacaze et al., 2011a, Di Poi et al., 2016 ; Erraud et al., 2018). Un précédent travail soutenu par l'OFB (i.e. Projet B&B¹) a permis d'une part la synthèse la plus exhaustive possible des couples biomarqueurs / espèce disponibles au sein des laboratoires-instituts français et d'autre part de définir une grille permettant d'apprécier le niveau d'opérationnalité de ces couples et/ou d'identifier les éléments de connaissance à acquérir pour un transfert vers la biosurveillance. Cependant, leur utilisation en surveillance reste très limitée, au regard de verrous techniques et scientifiques. D'un point de vue technique, il est difficile voire impossible de définir un corpus d'espèces sentinelles, que l'on puisse retrouver sur l'ensemble des systèmes aquatiques à surveiller (e.g. rivières de tête de bassin, fleuves, estuaires, littoral). D'autre part, leur interprétation se confronte encore souvent à l'absence de méthodologie permettant de considérer leur variabilité naturelle (i.e. l'influence de facteurs confondants). Une première réponse à ces limites, réside dans le développement d'approches de biosurveillance active (i.e. déploiement d'organismes dans des systèmes d'encagement), désormais proposée pour des organismes animaux couvrant différents groupes zoologiques (e.g. mollusque, crustacé, poisson ; Bourgeault et al., 2010 ; Kerambrun et al., 2016, Le Guernic et al., 2016 ; Prygiel et al., 2016 ; Ciliberti et al., 2017 ; Lopes et al., 2020). En effet, l'usage de l'approche active permet *i)* de **limiter la variabilité naturelle** des réponses biologiques sur la base du contrôle de l'exposition (i.e. durée et saison) et l'utilisation de spécimens calibrés (e.g. population de référence, genre, taille, statut reproducteur, état physiologique), et *ii)* d'assurer le **suivi des stations d'intérêts** indépendamment de la disponibilité des espèces dites sentinelles (e.g. Geffard et al., 2005 ; Geffard et al., 2007 ; Xuereb et al., 2009 ; Coulaud et al., 2011 ; Lacaze et al., 2011b ; Charron et al., 2014 ; Dedourge-Geffard et al., 2013 ; Pain-Devin et al., 2014 ; Séguin et al., 2016 ; Calvès et al., 2013). Ces approches offrent par conséquent la possibilité d'une meilleure comparaison des réponses de biomarqueurs entre différentes espèces engagées pour couvrir l'ensemble du *continuum* et appréhender une évaluation de la toxicité de ses masses d'eau.

Dans ce contexte, le projet SASHIMI proposait de façon originale de développer une **méthodologie de surveillance active**, reposant sur l'utilisation de plusieurs espèces de **groupes zoologiques différents** – i.e. poissons, mollusques et crustacés – pour un diagnostic et une comparaison de la qualité de masses d'eau très différentes, à l'échelle du *continuum* bassin versant - estuaire - littoral. La mobilisation de binômes ou trinômes d'espèces pour chacun des groupes zoologiques permet *i)* d'envisager l'investigation des différents districts du continuum, et *ii)* de considérer la question de la diversité de sensibilité de ces taxons vis-à-vis des réponses choisies. La stratégie du projet SASHIMI s'est focalisée sur des **effets toxiques impactant** le maintien de l'organisme – i.e. génotoxicité, immunotoxicité, et reprotoxicité - en ciblant tant que possible la mesure de marqueurs reconnus et applicables de façon consensuelle à l'ensemble des taxons ciblés. Les espèces sélectionnées pour le projet sont les **organismes modèles** du consortium de SASHIMI (**Figure 1**). Elles ont été, pour la *quasi-totalité*, déjà couramment étudiées dans un contexte de biosurveillance environnementale (cf. Projet

¹ Projet « Biomarqueurs & Biodiversité » - Office Français de la Biodiversité - AMI 2017. [Base de données finale](#).

B&B¹). Ces espèces représentent un intérêt pour de nombreux hydrosystèmes continentaux, estuariens et littoraux, aux niveaux national et européen (principalement l'Europe du nord), laissant envisager à terme une utilisation sur une large échelle géographique.

Pour répondre aux objectifs, le projet SASHIMI a été structuré autour de 3 actions visant à :

1. définir et/ou préciser les **conditions d'encagement** pour l'ensemble des modèles ;
2. harmoniser les **protocoles analytiques**, dans la limite du possible, afin de disposer de méthodes de mesures des biomarqueurs communes à l'ensemble des espèces et assurer la comparaison interspécifique ;
3. définir et/ou préciser des **référentiels** (i.e. **valeurs basales et seuils**) pour les différents couples 'réponse biologique/espèce', et **calibrer**, pour chaque réponse biologique, des **grilles de lecture** favorisant une interprétation interspécifique.

Le projet SASHIMI s'articule étroitement avec un second projet opérationnel, le projet BIOSURVEILLANCE². Ce dernier propose un pilote de déploiement, à l'échelle du bassin de la Seine et sur quelques petits estuaires de la côte Normande, des méthodologies développées/optimisées durant le projet SASHIMI (i.e. approche d'encagement, mesure des biomarqueurs et interprétation de leur modulation).

Le présent document propose une synthèse des principales avancées du projet en termes d'acquis techniques, points de vigilance, et perspectives de travaux futurs. Les méthodologies d'encagement et d'analyses des biomarqueurs propres à chaque modèle biologique sont disponibles dans le Recueil méthodologique associé à la présente synthèse.

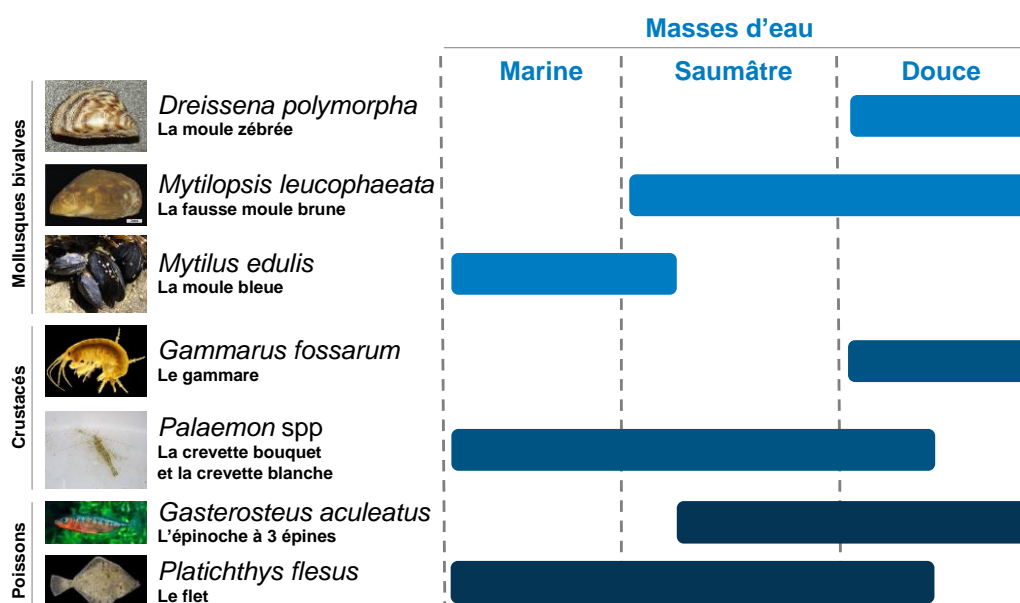


Figure 1. Espèces mobilisées dans le cadre du projet SASHIMI et leur attachement aux différentes masses d'eau.

2 Définition des procédures d'encagement

2.1 Stratégie adoptée pour la définition des procédures d'encagement

Les **approches actives** de biosurveillance basées sur la transplantation d'organismes dans des **systèmes d'encagement** sont désormais reconnues comme pertinentes pour surveiller la contamination et la toxicité des milieux aquatiques. Comme souligné précédemment, ces approches permettent de prendre en compte la **réalité et la complexité du terrain**, tout en autorisant le contrôle d'une partie

² Projet « BIOSURVEILLANCE » - Agence de l'Eau Seine Normandie (cf. lien [ici](#)).

des **paramètres d'exposition** – *i.e.* choix des stations investiguées, la durée et la période d'exposition, la calibration des spécimens (*e.g.* provenance, taille/âge, sexe, état reproductif) - connus pour influencer les réponses biologiques. Cela nécessite, toutefois, d'optimiser spécifiquement les procédures d'encagement, en fonction de l'espèce considérée et des paramètres mesurés. Concernant les espèces introduites³, il s'agira d'appliquer cette méthodologie sur uniquement les sites où leur présence est renseignée.

Les conditions d'encagement pour chacune des 7 espèces étudiées ont ainsi été définies et/ou précisées au regard du cadre défini par le projet SASHIMI. En effet, les **méthodologies d'encagement** se devaient d'être **cohérentes** vis-à-vis d'un **déploiement concomitant** des différentes espèces pour une **couverture du continuum**, d'une part, et de la mesure de biomarqueurs, d'autre part. Sur cette base,

1. les **méthodologies d'encagement** (*i.e.* techniques et durées) existantes ont été recueillies et optimisées le cas échéant, et les méthodologies manquantes ont été développées ;
2. une **période de l'année, optimale** pour le déploiement conjoint des espèces sur le *continuum*, a été définie.

2.2 Recueil, analyse et optimisation des procédures d'encagement

Sur le plan technique, les méthodologies d'encagement étaient déjà maîtrisées au sein du consortium pour le gammare, l'épinoche et la dreissène (*e.g.* Besse et al. 2013 ; Kerambrun et al., 2016 ; Le Guernic et al., 2016 ; Chaumot et al., 2019 ; Lopes et al., 2020 ; Cateau et al., 2022) – ou étaient déjà bien documentées – *i.e.* la moule bleue. Concernant le flet, les méthodes existantes (*e.g.* Bourcier et al., 2019) pouvaient être optimisées et/ou adaptées pour répondre aux objectifs du projet. Enfin, l'expertise manquante autour des modèles crevettes et moule brune a nécessité une phase de développement spécifique. Le **Tableau 1** présente une synthèse des procédures d'encagement optimisées et les points d'amélioration qui pourront être considérés dans une démarche d'amélioration continue. Le détail de la procédure est présenté respectivement pour chaque espèce, au sein des fiches méthodologiques (*cf.* Recueil méthodologique associé à la présente synthèse).

Brièvement, de nombreux perfectionnements ont été apportés afin d'améliorer les conditions d'encagement des flets au cours de la période d'exposition en intégrant notamment les nouvelles directives liées au bien-être animal. Un nouveau système de mise en place et de fixation des cages, logistiquement moins lourd et moins coûteux a été développé. Divers aménagements ont été développés et testés tels que la présence de zones de refuge contre les courants (*i.e.* tube PVC, bac en plastique, plaque de Plexiglas entourant le bas des cages sur une hauteur de 15 cm). L'une des principales limites de l'encagement d'organismes non filtreurs concerne l'alimentation des individus durant la période d'encagement. Dans le cas du flet, le problème a été résolu en développant, au sein des cages, des récifs de coquilles d'huitres. Les expérimentations réalisées ont montré que les récifs étaient très vite colonisés par de nombreux organismes tels que des amphipodes (*i.e.* proies pour les poissons). L'analyse des contenus stomacaux des poissons à la fin de l'encagement a confirmé que les poissons se nourrissaient bien des proies concentrées sur le récif. Il a ainsi été démontré que les poissons ne perdaient pas de poids durant les encagements, et présentaient des croissances comparables aux individus *in natura*. Les taux de survie après quinze jours d'encagement sont de l'ordre de 90 à 100 %.

Avec le concours du SMEL⁴, de nombreux essais d'encagement ont été réalisés en eau de transition avec la crevette blanche *Palaemon longirostris* et sur zone côtière avec la crevette bouquet *P. serratus* de 2019 à 2021, permettant une amélioration continue des procédures. Les cages ont été garnies de nombreuses caches en grillage polyéthylène et tube PVC, permettant d'augmenter la surface d'accroche et de réduire les interactions entre spécimens. La durée d'exposition a été fixée à 15 jours, contrainte notamment par le calendrier de marée pour les encagements de la crevette bouquet sur

³ On considérera, ici, le terme « espèce introduite » comme une espèce non-indigène, déjà naturalisée.

⁴ syndicat mixte Synergie Mer Littoral – centre expérimental Zone conchylicole Parcelle n°45, 50560 Blainville-sur-Mer.

l'estran (*i.e.* accès aux stations immergées à marée basse de vive eau, restant accessibles par coefficient minimum de l'ordre de 80). Le suivi de la biométrie et des réserves énergétiques a montré que la condition des spécimens restait stable, en dépit des forts courants présents sur les stations d'encagement. Les taux de survie, pour la crevette blanche, étaient compris entre 70 et 90 % durant les derniers essais, malgré des dessalures rencontrées sur les stations les plus oligohalines (*i.e.* salinité < 1). En revanche, le taux de survie moyen mesuré pour la crevette bouquet était de l'ordre de 60 %, du fait d'un comportement de cannibalisme exacerbé en captivité, et ce malgré l'enrichissement des casiers. Le format de type « casier à crevette » aura autorisé une grande plasticité de déploiement (*e.g.* sur l'estran, depuis un embarcadère, en pleine mer) mais des leviers d'améliorations restent encore disponibles. Le dispositif d'encagement pourrait notamment être optimisé de façon à réduire davantage les interactions entre spécimens. Ces essais auront souligné par ailleurs l'importance de stabiliser le gisement d'approvisionnement en spécimens, dans le but de minimiser les variations intrinsèques des réponses biologiques mesurées. Une évolution vers une stratégie de production de crevettes dans un espace zootechnique (semi-)contrôlé répondrait de façon optimum aux variations de qualités du milieu qui peuvent être rencontrées chez des espèces mobiles, dans des milieux aussi ouverts que les estuaires et le littoral.

L'encagement de la moule bleue avait déjà été démontrée dans la littérature (*e.g.* Bolognesi et al., 2004 ; Cappello et al., 2013 ; Rossi et al. 2016). La durée d'exposition a été fixée à 15 jours, permettant des encagements simultanés à ceux de la crevette bouquet. Les différents essais menés entre 2019 et 2021 ont montré une très bonne survie des individus, avec des taux moyens de l'ordre de 90 %. Ici encore, le gisement d'origine des spécimens est ressorti comme un point de vigilance important. A ce titre, l'approvisionnement auprès de mytiliculteurs est ressorti comme une option satisfaisante.

L'encagement de *Mytilopsis leucophaeata* est aisé dans la mesure où cette petite espèce vit fixée sur différents supports durs et s'alimente par filtration, ce qui dispense de tout apport de nourriture. Une fois encagées, les moules s'agrègent rapidement formant ainsi des grappes dans les cages (grillagées en polypropylène). La durée d'encagement nécessaire pour obtenir des différences intersites dans la réponse immunitaire des moules a été testée avec l'exposition pendant 7 jours, 14 jours et 28 jours et si des différences apparaissent après 14 jours, elles sont plus marquées au bout de 28 jours. A l'issue de cette période d'encagement la survie des moules est supérieure à 90-95 % dans la plupart des sites. Une durée de 3 à 4 semaines peut ainsi être préconisée, comme c'est le cas pour l'espèce proche, *Dreissena polymorpha*.

2.3 Choix de la période d'encagement

L'intérêt de délimiter une période optimale d'encagement peut se résumer en 3 points : *i)* garantir une représentativité des mesures par rapport à la question posée, *ii)* garantir le succès des encagements et *iii)* le cas échéant, minimiser l'influence des variations saisonnières (*e.g.* variations des températures, cycles biologiques des organismes) sur l'homéostasie des réponses biologiques mesurées. Ce choix fait intervenir des considérations diverses, allant d'aspects logistiques (*e.g.* conditions météorologiques, conditions de crue et/ou d'étiage répondant aux objectifs), à des aspects purement biologiques (*e.g.* disponibilité des organismes, influence de la saison sur les couples biomarqueur/espèce).

L'objectif de cette partie a été de définir le meilleur compromis autorisant un déploiement simultané des différentes espèces le long du *continuum*. La saison automnale correspond à la période la plus favorable permettant *i)* de garantir l'approvisionnement de tous les organismes, *ii)* d'écarter les périodes de conditions climatiques et hydrodynamiques trop contraignantes, et *iii)* d'éviter la pleine saison de reproduction. En effet, concernant ce dernier point, les 3 modèles bivalves et l'épinoche présentent une période annuelle de pleine maturité sexuelle qui peut fortement influencer les constantes biologiques (*e.g.* Delaporte et al., 2006). Il convient, toutefois de souligner pour le modèle *M. leucophaeata*, le relatif étalement de la période de maturité sexuelle et de ponte sur une grande partie de l'année et ce

Tableau 1. Récapitulatif des conditions d'encagement de chacun des organismes d'étude.

	Dreissène	Moule brune	Moule bleue	Gammare	Crevettes	Flet	Épinoche
Stade de vie / taille	Adultes (22-25 mm)	Adultes (> 15 mm)	Adultes (40-50 mm)	Adultes (8-10 mm) Maîtrise du sex-ratio	Adultes (P.s. : 55-65 mm ; P.l. : 30-40 mm) Maîtrise du sex-ratio	Juveniles (80-90 mm)	Adultes (35-45 mm) Maîtrise du sex-ratio
Origine	Lac du Der	La Rivière Morte (La Touques), ports d'Ouistreham et/ou de Carentan	Mytiliculture (Blainville-sur-Mer)	Production contrôlée en cressonnière	P.s.: prélèvement (pêcheurs Cherbourg) P.l. : prélèvement (estuaire de Seine)	Canche Dépuration/acclimatation 10 jours	Production INERIS
Période	Automne	Toute l'année Préférence pour la fin de l'automne	Toute l'année Préférence pour l'automne	Toute l'année sauf excepté les pics de chaleur estivaux	Automne	Fin été/automne	Toute l'année Préférence pour l'automne
Durée	21 j	21-28 j (possible jusqu'à plusieurs mois)	15 j	7-21 jours	15 j	15-30 j	14-21 j
Densité (nb. individus / cage)	200	100-200 et jusqu'à 400	20 à 100	Entre 7 et 20 selon les biotests	20 ≤ ≤ 40 selon l'espèce	10 à 15	Jusqu'à 30
Profondeur d'immersion des cages (min - max)	0,5 – 3 m	50 cm - 2 m	2-15 m	- Sur fond des cours d'eau ayant une hauteur max de 50 – 60 cm - Dans la colonne d'eau à 50 cm – 1 m en dessus de la surface	≥ 0.5 m à BM en zone abritée ≥ 5 m à BM en zone exposée aux vagues	2 - 20 m	Max 5 m
Habitats pour déploiement (salinité, courant)	Eau douce Milieux calmes à fort hydrodynamisme	Eau douce et milieux mésosalins (7-15) Milieux calmes (faible hydrodynamisme)	20 à 35	Eau douce Milieux calmes à fort hydrodynamisme	P.s : 15 à 40 P.l : 0 à 40 Milieux calmes à fort hydrodynamisme	0 à 35 Milieux calmes à fort hydrodynamisme	Théorique : ≤ 35 Effectif : actuellement eau douce
Type de cage (dimensions, matériaux, fixation)	Petites cages en polyéthylène (20x10x10 cm)	Petites cages (20x5x5 cm) en polyéthylène (« amarinnées »), elles-mêmes placées dans des poches plus grandes (26x20x10 cm) sous les pontons	Casier 20 L - 60x16x22 cm - Mailles 5 mm ou Poches grillagées	Cage cylindrique : volume de 20-25 litres ou Cage rectangulaire (50x30x15 cm)	Casier 20 L (60x16x22 cm) ; mailles 5 mm - Montage type filières fixation ancrés - Amarrage sur l'estran (e.g. enrochements, structures conchylicoles) - Amarrage sur embarcadère	Cage rectangulaire : - 100x60x60 cm - Volume 360 L - Maille 15 mm - Armature Inox + filet - Fixation : ancrés	Cage cylindrique, cloison amovible, acier inoxydable - Volume : 36L - Longueur : 63cm - Diamètre : 27cm - Mailles : 5 mm - Fixation : câbles + serres câbles
Besoin moyen Nautique	Non	Non	Fonction du site d'encagement	Non	Fonction du site d'encagement	Oui	Non
Opérationnalité	Maîtrisé	Maîtrisé	Maîtrisé	Maîtrisé	Maîtrisé	Maîtrisé - Alimentation des poissons optimisée - Facilitation de la technique de mise en place des cages	Maîtrisé - Densité optimisée - Cage optimisée
Points d'optimisation et/ou limites		Provenance des spécimens Présence sur sites d'encagement à vérifier au préalable (espèce introduite)			Cannibalisme Provenance des spécimens		Exposition au courant
Laboratoire référent	UMR Sebio-URCA	UMR BOREA	UMR Sebio-ULHN	INRAe	UMR Sebio-ULHN	UMR LOG	UMR Sebio-INERIS

BM = Basse Mer ; *P.l.* = *Palaemon longirostris* ; *P.s.* = *Palaemon serratus*

jusqu'à l'hiver (Verween et al., 2009). Cette considération est moins vraie pour les modèles crustacés qui présentent une reproduction relativement étalée au cours de l'année et/ou dont le phénotype sexuel peut être facilement calibré, et n'a lieu d'être pour le flet dans la mesure où l'engagement concerne des spécimens juvéniles.

3 Harmonisation des protocoles analytiques des marqueurs, et adaptation à la surveillance

3.1 Marqueurs d'effets toxiques sur les systèmes immunitaires

3.1.1 Mesures des effets toxiques des contaminants environnementaux sur les systèmes immunitaires

Les études en matière de toxicologie ont démontré que le **système immunitaire** constitue une **cible d'action des xénobiotiques** à la fois chez l'espèce humaine (Proch, 1992 ; Dean, 1994 ; Anderson et Shane, 2018) et chez les organismes aquatiques de différents groupes taxinomiques ; à titre d'exemples, **mammifères** (Desforges et al., 2016 ; Desforges et al., 2017), **poissons** (Lugo et al., 2006 ; Datta et al., 2009 ; Bado-Nilles et al., 2015) et **bivalves** (Grundy, Ratcliffe et Moore, 1996 ; Gagné et al., 2002 ; Tryphonas et al., 2005 ; Auffret et al., 2006 ; Bado-Nilles et al., 2008 ; Hannam et al., 2009 ; Farcy et al., 2011 ; Evariste et al., 2017).

En exerçant des effets perturbateurs des réponses immunitaires, les polluants environnementaux sont à l'origine du développement de **pathologies** observables sur des individus vivant dans les hydrosystèmes contaminés. Ces pathologies révèlent des **dyfonctionnements** dans les mécanismes de lutte antitumorale, des **désordres histologiques** (Vos et al., 1989 ; Vethaak et Van Der Meer, 1991 ; Lorenzen, Des Clers et Anders, 1991 ; Akaishi et al., 2007) ou l'émergence de **maladies infectieuses** d'origine bactérienne (Ross, 2002) ou parasitaire (Chu et al., 2002). L'altération des capacités immunitaires a des conséquences à terme sur la **survie** des organismes (Zelikoff et al., 2000). Deux **groupes d'immunomarqueurs** sont classiquement considérés, les paramètres **hématologiques** et les marqueurs d'**immunocompétence**.

Parmi les paramètres hématologiques, la **cellularité** (*i.e.* concentration leucocytaire ou hémocytaire dans les organes hématopoïétiques, le sang ou l'hémolymphe), la **formule** (*i.e.* répartition des immunocytes en différents phénotypes) et la **viabilité** immunocytaires sont des indicateurs d'intérêt dans la mesure où ils sont **affectés par les contaminants environnementaux** à la fois chez les vertébrés et les invertébrés (Luster et al., 1992 ; Fournier et al., 2000 ; Auffret et al., 2002 ; Basova 2017).

Les marqueurs d'immunocompétence renseignent sur l'**efficacité des défenses anti-infectieuses**. Ces défenses divisent le monde animal en deux groupes distinguant classiquement les organismes dotés d'une **immunité exclusivement innée** d'une part, c'est-à-dire figée dans le génome germinale, et les animaux qui acquièrent une **défense adaptée aux pathogènes** *via* la production d'anticorps spécifique (Flajnik et Du Pasquier, 2004). Parmi l'ensemble des voies de défenses déployées par les êtres vivants, la **phagocytose** constitue une arme **universelle**, observée fondamentalement dans tout le règne animal (Jiravanichpaisal, Lee et Söderhäll, 2006 ; Yutin et al., 2009). Ce processus, permettant aux cellules d'ingérer et de détruire les microorganismes, se définit comme la capacité à internaliser des particules de plus de 0,4 µm de diamètre (Haas, 2007). L'activité phagocytaire peut également être modulée par les contaminants environnementaux, à la fois chez les vertébrés et les invertébrés (Fournier et al., 2000 ; Anne Bado-Nilles et al., 2008 ; Covantes-Rosales et al., 2019 ; Marchand et al., 2020).

3.1.2 Stratégie adoptée pour l'harmonisation des méthodes, dans le cadre du projet SASHIMI

Sur la base des connaissances scientifiques et techniques disponibles au sein du consortium, une liste de proxys révélateurs de l'état des fonctions immunitaires et quantifiables chez tous les modèles biologiques de l'étude a été retenue (**Figure 2**) :

1. Sur le plan hématologique : **cellularité, formule et viabilité immunocytaire**,
2. Sur le plan fonctionnel : **activité phagocytaire**.

L'approche analytique unique est la **cytométrie en flux**.

La démarche expérimentale s'est appuyée sur les acquis du consortium afin d'aboutir à un protocole de mesure optimisé :

1. **Recueil et analyse des procédures** expérimentales maîtrisées : *Mytilus* spp, *Dreissena polymorpha* et *Gasterosteus aculeatus*,
2. **Transfert des procédures expérimentales** chez les nouvelles espèces : *Mytilopsis leucophaeata*, *Palemon* spp, *Gammarus fossarum* et *Platichthys flesus*,
3. **Identification des verrous** méthodologiques pour une **application en biosurveillance active** et définition de l'ensemble des choix techniques pour l'opérationnalité sur le terrain,
4. **Optimisation des procédures** avec un effort d'homogénéisation dans le respect des contraintes imposées par les spécificités biologiques des organismes.

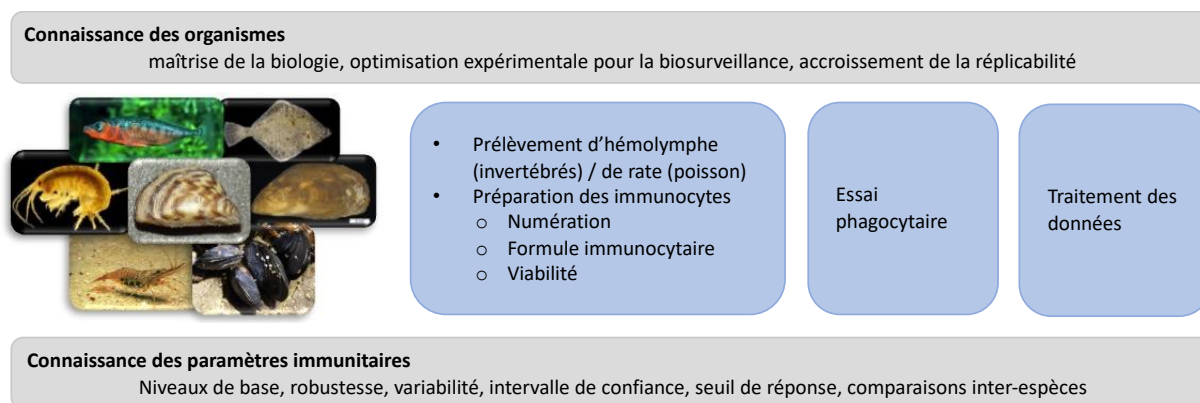


Figure 2. Cadre scientifique de l'application des immunomarqueurs en biosurveillance, du programme SASHIMI.

3.1.3 Recueil, analyse et optimisation des procédures expérimentales pour l'ensemble des organismes du projet SASHIMI

Une synthèse des procédures expérimentales, par étape et par espèce, est présentée en **Figure 3**. Le principal résultat de cette phase du programme est la **démonstration de la faisabilité** d'inclure les organismes *M. leucophaeata*, *Palemon* spp et *G. fossarum* dans le dispositif. Une reprise des conditions expérimentales appliquées dans les différentes équipes, chez les espèces déjà investiguées dans différents programmes de surveillance, a permis de proposer un cadre méthodologique permettant la détermination des paramètres phagocytaires chez la moule brune, la crevette et le gammarus.

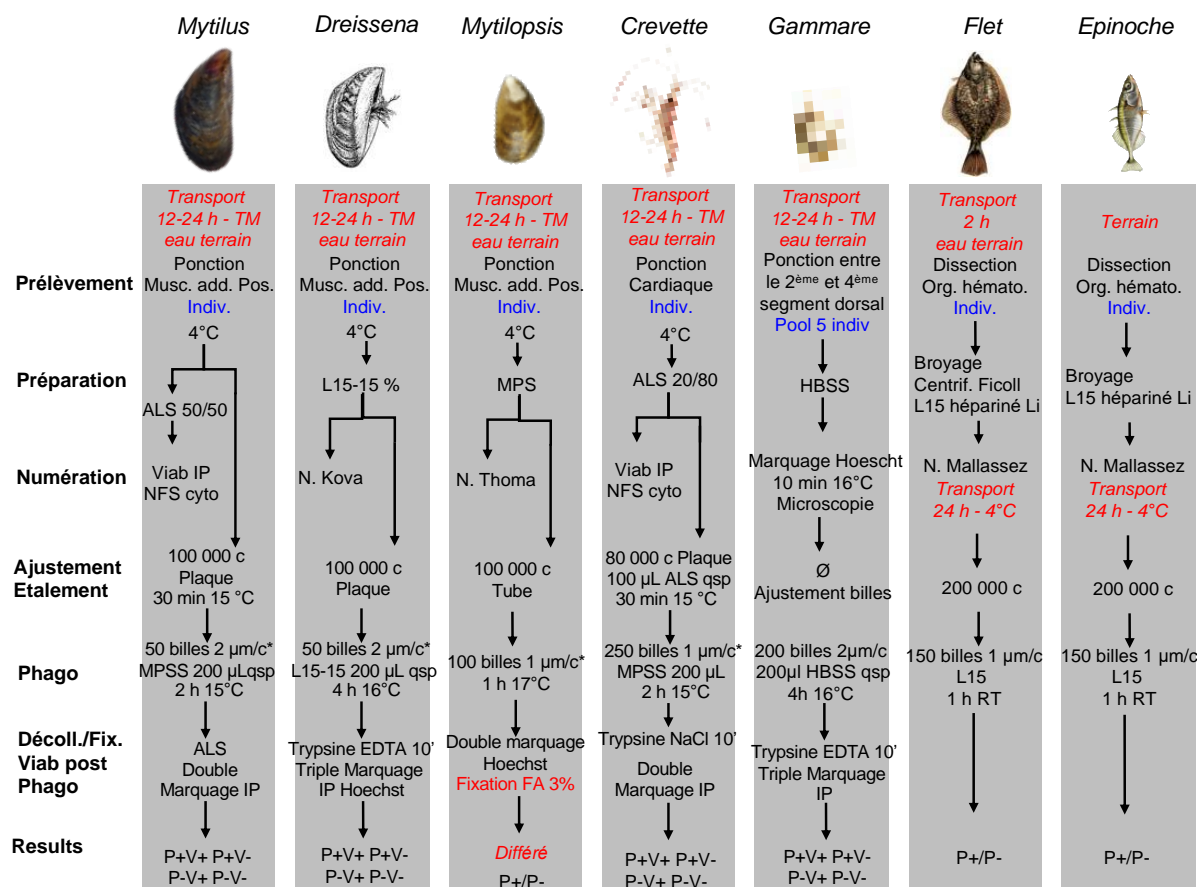


Figure 3. Synthèse des procédures d'analyses d'immunomarqueurs sur une collection d'espèces sentinelles d'intérêt pour la bioévaluation de la qualité des hydrosystèmes continentaux, estuariens et littoraux représentatifs de l'Europe du nord. TM = Température au plus proche de celle du Milieu des stations étudiées, durant la période d'encagement ; P = phagocytose ; V = viabilité ; "+" = positive ; "-" = négative.

Les protocoles retenus permettent la mesure quantitative des populations cellulaires à partir de l'analyse **morphologique en taille/complexité** et la détermination **du taux de cellules viables** dans l'échantillon prélevé par un marquage à l'iodure de propidium (**Figure 4**). Pour les bivalves et les crustacés, une attention particulière a été portée à l'obtention de **suspensions d'immunocytes mono-dispersées** sans agrégat, ni réaction hémostatique, aux deux étapes clés du protocole, lors du prélèvement sanguin d'une part, et lors du décollement des cellules adhérentes après l'étape de phagocytose. Ces suspensions sont obtenues avec des solutions différentes en fonction des organismes, par dissociation enzymatique douce pour les crustacés et la dreissène, par chélation du Ca²⁺ en milieu légèrement hypotonique pour la moule bleue. L'expérimentation en tube pour *Mytilopsis* dispense de l'étape de décollement des hémocytes. Les leucocytes de poissons restent dispersés en solution.

La procédure de phagocytose repose sur l'**incubation** des cellules (de 1 h à 4 h en fonction de l'optimum physiologique de l'espèce) avec des **microbilles fluorescentes** et la détection des événements d'internalisation des billes. La phase d'optimisation a reposé sur la définition des meilleures conditions expérimentales en termes de **probabilité de rencontre** entre le phagocyte et ses cibles. Ainsi, pour chaque organisme, la démarche consiste à rechercher le nombre optimal d'immunocytes par unité de volume (phagocytose en suspension chez les poissons et *Mytilopsis*) ou de surface d'essai (phagocytose sur cellules adhérentes chez les bivalves et crustacés), ainsi que de **ratio billes/cellule**. Les paramètres phagocytaires analysés sont au nombre de trois, *i*) la **capacité phagocytaire** correspond au pourcentage de cellules ayant internalisé au moins 1 bille (région M3-All+, **Figure 4**), *ii*) l'**efficacité phagocytaire** correspond au pourcentage de cellules ayant internalisé au moins 3 billes (région M2-3+, **Figure 4**) et *iii*) l'**avidité** qui correspond au nombre moyen de billes phagocytées par les cellules ayant phagocyté 1 billes et plus. Un exemple d'optimisation est fourni en

Figure 5 pour *Gammarus fossarum*.

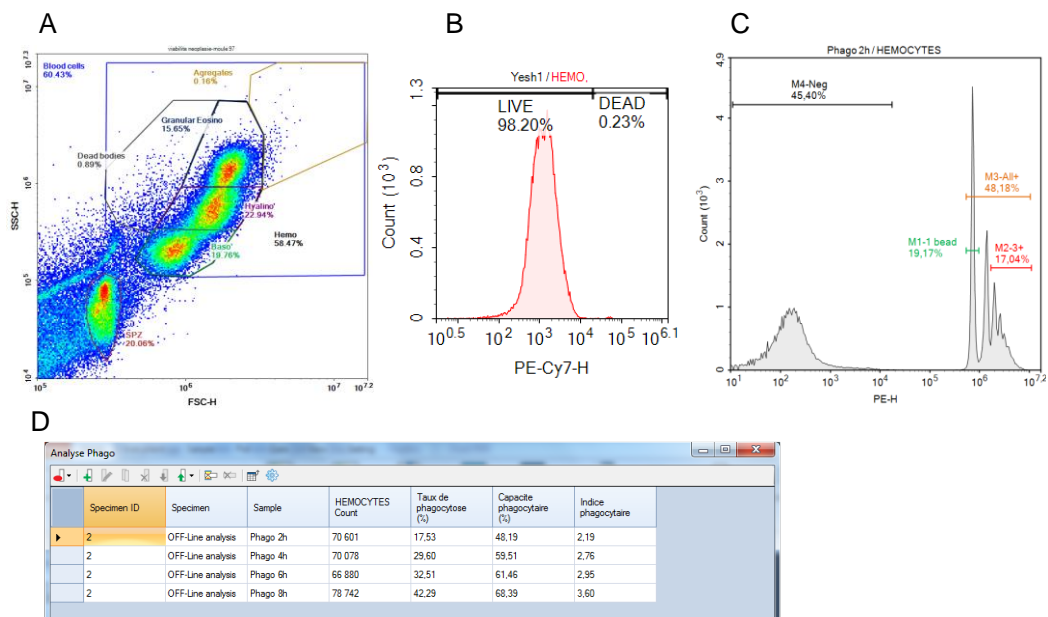


Figure 4. Résultats représentatifs de l'analyse des immunomarqueurs par cytométrie en flux chez *Mytilus edulis*. **A**, nuage de points bi-paramétrique des différentes populations cellulaires de l'échantillon en taille (FSC-H) / complexité (SSC-H). **B**, histogramme mono-paramétrique présentant la fluorescence cellulaire après marquage à l'iodure de propidium afin de déterminer la viabilité des immunocytes. **C**, histogramme monoparamétrique permettant la détermination des paramètres phagocytaires après 2 heures de phagocytose sur une surface couverte avec 50 microbilles par hémocyte (Fluosphères™ Carboxylate Modified Microsphère 2 µm, #F8824 ; ThermoFisher). **D**, analyse de la phagocytose pour quatre échantillons d'hémolymphe.

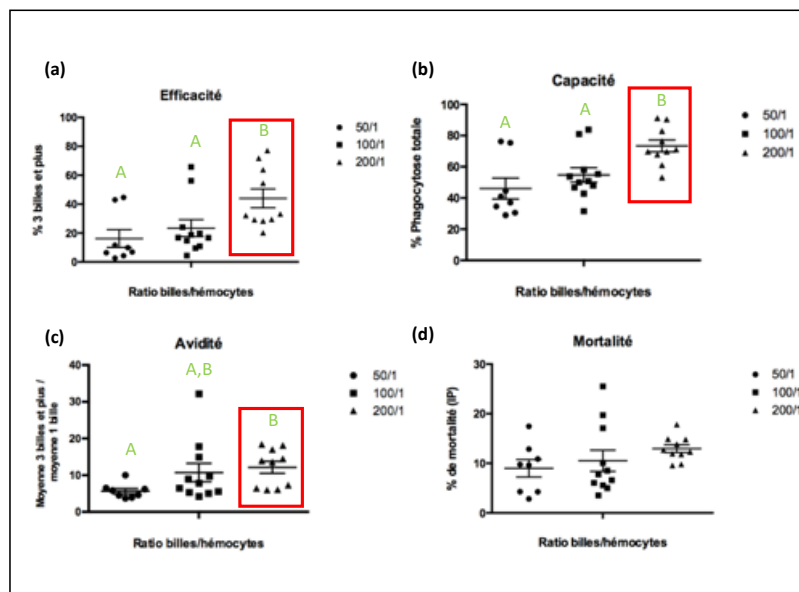


Figure 5. Étude par cytométrie en flux du ratio billes/hémocytes de *Gammarus fossarum*. Résultats d'efficacité (a), de capacité (b), d'avidité (c) et de mortalité (d) à l'iodure de propidium suivant différentes concentrations en billes de phagocytose (Fluosphères™ Carboxylate Modified Microsphère 2 µm, #F8824 ; ThermoFisher) sur des hémocytes de *Gammarus fossarum* à 4 h d'incubation. Les lettres capitales (A,B) représentent une différence significative selon les résultats d'une ANOVA à mesures répétées suivie d'un test de HSD Tukey au risque 5 % sur un pool de 5 gammarus ($n = 10/13$).

3.1.4 Choix techniques pour l'opérationnalité terrain

Dans le cadre de l'applicabilité des procédures à des organismes issus de cages déployées sur le terrain, trois contraintes principales ont été identifiées :

1. les **délais successifs** séparant la collecte des individus engagés, les prélèvements d'hémolymphe/rate, la préparation des échantillons et l'analyse,
2. les **variations de température** entre les conditions environnementales et le laboratoire,
3. les **différentes techniques** mises en œuvre au moment du prélèvement et de l'analyse par cytométrie.

En conséquence, afin de préserver la **qualité des procédures expérimentales**, il est apparu important de **dissocier la partie analytique des étapes terrain**. Ainsi les trois phases principales sont découpées en, *i*) retour des organismes, *ii*) prélèvement et préparation des échantillons et *iii*) analyse de l'activité de phagocytose. Cette démarche expérimentale permet de segmenter les besoins techniques entre le personnel de terrain, les biologistes préleveurs et les cytométristes. Le schéma synoptique de l'ensemble de la procédure est illustré **Figure 6**. Les étapes optionnelles reposant sur une fixation post-phagocytose pour une analyse différée des échantillons sont encore en phase de mise au point.

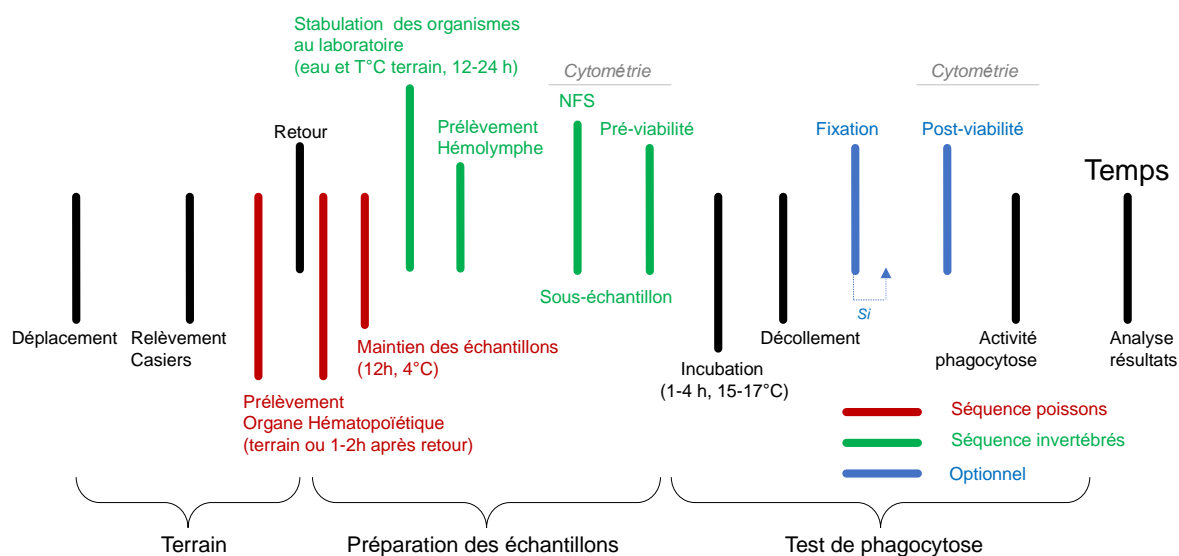


Figure 6. Synoptique de la procédure expérimentale "suivi des immunomarqueurs en biosurveillance" du programme SASHIMI. Après collecte, au retour au laboratoire, les organismes sont conservés dans l'eau du site d'encagement à la température du terrain. Après un délai de 12 à 24 h, l'hémolymphe est collectée et les échantillons sont préparés pour la NFS afin de renseigner les paramètres hématologiques et de déterminer les conditions de phagocytose. Pour les poissons, les leucocytes sont préparés sur le terrain et conservés pour une durée équivalente, à 4°C. L'essai de phagocytose est effectué par incubation avec des billes fluorescentes de 1 à 2 µm sur une durée de 1 à 2 h à une température fixe, typiquement 15°C. Une étape de fixation, optionnelle, permet de différer l'analyse en cytométrie. Un deuxième marquage, dit "post-viabilité" permettant de déterminer la viabilité des phagocytes après la phagocytose, peut être proposé.

3.2 Marqueurs d'altération de l'intégrité de l'ADN

3.2.1 Mesure des effets génotoxiques des contaminants

Parmi les biomarqueurs de dommages, les biomarqueurs de génotoxicité sont considérés comme des outils intégrés, capables de fournir une information complémentaire aux analyses chimiques et écologiques pour évaluer la toxicité liée à la pollution aquatique affectant les organismes à tous les niveaux trophiques (Jah, 2008 ; Lacaze et al., 2011a ; Bolognesi et al., 2014 ; Hussain et al., 2018). En effet, les molécules décrites comme potentiellement génotoxiques représenteraient le tiers des contami-

nants rejetés dans les compartiments aquatiques (Claxton et al., 1998). Ces molécules entraînent des impacts, directement ou indirectement, avec une atteinte de l'intégrité du matériel génétique d'une cellule (ADN, ARN), susceptible de provoquer des effets mutagènes, cancérigènes ou tératogènes (Kaur et al., 2018). Par ailleurs, l'interaction de ces composés sur le processus de reproduction est susceptible d'avoir de graves répercussions au niveau populationnel (Aitken et De Luliis, 2007).

Différents degrés de dommages à l'ADN – *i.e.* dommages primaires à l'ADN (potentiellement réparables), mutations et/ou dommages chromosomiques (effets clastogènes et/ou aneugènes, irréparables) - peuvent être distingués (Orsière, 2005). Parmi les biomarqueurs, la mesure de l'intégrité de l'ADN par le test Comet (*i.e.* *Single cell gel electrophoresis assay*) est particulièrement préconisée pour la biosurveillance de la génotoxicité environnementale (Bolognesi et al., 2014). Celui-ci consiste à estimer, sur des cellules individualisées, les niveaux d'altération du génome par électrophorèse des noyaux cellulaires sur micro-gels d'agarose. Le test Comet est une méthode sensible, fiable et assez peu coûteuse, applicable sur différents types cellulaires (Collins et al., 1997). Les **cellules circulantes** telles que les **hémocytes** chez les invertébrés ou les **érythrocytes** chez les poissons, sont parmi les cellules somatiques les plus employées en raison *i)* de leur prélèvement non léthal pour les organismes, *ii)* de leur disponibilité tout au long de l'année et *iii)* de leur sensibilité à de nombreux génotoxiques environnementaux. Par ailleurs, les érythrocytes de poissons semblent être dépourvus de capacités de réparation de l'ADN, renforçant ainsi leur caractère intégrateur (Santos et al., 2014). Les **cellules germinales**, en particulier les **spermatozoïdes**, sont également d'un fort intérêt au regard de leur implication dans la fonction de reproduction qui leur confère *a priori* un caractère prédictif d'effets à des niveaux d'organisation biologique plus élevés. De plus, à l'instar des érythrocytes de poissons, la faible présence, voir l'absence de mécanismes de défense ou de réparation des dommages à l'ADN, rendent les spermatozoïdes intégrateurs et sensibles à l'ensemble des pressions génotoxiques (Erraud et al., 2019a,b ; Lacaze et al., 2011b).

3.2.2 Stratégie adoptée pour l'harmonisation des méthodologies de COMET, dans le cadre du projet SASHIMI

Étant donné sa sensibilité, Le **test Comet en condition alcaline** (*i.e.* pH > 13, tel que préconisé par Singh et al. (1988) et largement appliqué en toxicologie/écotoxicologie), a été sélectionné pour mesurer l'intégrité de l'ADN dans le cadre du projet SASHIMI. Sa version alcaline permet la mise en évidence des cassures simple (SSBs) et double (DSBs) brins de l'ADN, ainsi que l'expression des sites alcali-labiles (ALS⁵), renforçant ainsi son caractère intégrateur (Singh et al, 1988). Le choix des modèles cellulaires a été établi sur la base de l'**expertise scientifique et technique** déjà présente au sein **du consortium**, à savoir :

1. les érythrocytes de poissons (*i.e.* épinoche à trois épines, flet),
2. les hémocytes de mollusques (*i.e.* moule zébrée, moule brune, moule marine),
3. les spermatozoïdes de crustacés (*i.e.* gammare, crevette).

La démarche expérimentale s'est articulée en deux temps :

1. **recueil et calibration inter-laboratoire** des **méthodologies de Comet** mises en œuvre par les différentes équipes du consortium,
2. **identification des verrous** méthodologiques, **points de vigilance** et définition des **choix techniques**, pour une **application en biosurveillance active** répondant aux exigences cadrées par la problématique du projet SASHIMI.

3.2.3 Recueil et analyse des méthodologies de COMET mises œuvre au sein du consortium

La première démarche a donc consisté en un état des lieux des connaissances relatives à l'évaluation de la génotoxicité chez les différents modèles biologiques et, le cas échéant, du protocole de Comet

⁵ Les sites alcali-labiles correspondent à des défauts et/ou fragilités de la structure d'ADN (*i.e.* présence d'une base azotée sans le sucre associé ; présence d'intermédiaires dans la voie de réparation par excision des bases), générant des fragments d'ADN endommagés supplémentaires en condition très alcaline.

employé par les laboratoires du consortium. Le niveau de détail est allé jusqu'à l'enregistrement des références du matériel de laboratoire (e.g. générateurs et cuves électrophorétiques, supports d'analyses microscopiques), ainsi que des réactifs utilisés pour la réalisation du test.

En raison de la spécificité des différents protocoles de Comet (e.g. en termes de réactifs, matériels et protocoles de scoring), il a été décidé de tester la reproductibilité des résultats obtenus entre les laboratoires au moyen d'un comparateur commun. Des échantillons cryopréservés d'érythrocytes d'épinoche (i.e. répliques de 20 µL à 1 million de cellules par mL), préalablement exposés ou non à un génotoxique de référence (i.e. Méthylméthane Sulfonate pendant 1 h à 5 mM, 4°C, obscurité) ont été analysés par chacun des partenaires, selon une base de procédure commune, à l'occasion d'une série de 3 expérimentations indépendantes. Chaque échantillon a été dupliqué de sorte à pouvoir comparer les analyses des comètes effectuées sur place par chacun des laboratoires, avec une analyse centralisée au sein d'un laboratoire désigné comme référence (nommé laboratoire A). Les résultats des premiers essais figurent dans le **Tableau 2**. Il est ressorti de ces expérimentations une bonne répétabilité des mesures effectuées au cours du temps au sein de chacun des laboratoires. En revanche, la comparaison des résultats inter-laboratoires a témoigné, d'une mauvaise reproductibilité. Ce défaut dans la reproductibilité des résultats pourrait résulter de différences dans le traitement, l'envoi, le stockage à -80°C des échantillons au sein de chaque laboratoire, bien qu'il s'agisse plus probablement d'un effet lié aux différents matériels utilisés par les laboratoires partenaires (tel qu'indiqué précédemment). L'harmonisation des procédures de Comet est par conséquent ressortie comme un point de vigilance extrêmement important.

Tableau 2. Synthèse des résultats obtenus visant à évaluer la répétabilité et la reproductibilité des expérimentations autour du référentiel commun. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'ADN endommagé (% Tail DNA), hormis pour le laboratoire B (exprimés en unités arbitraires : AU).

	Lecture par chaque laboratoire		Lecture par le Laboratoire A	
	Échantillons non traités	Échantillons traités	Échantillons non traités	Échantillons traités
Laboratoire A (avant envoi)	4.8/4.7/5.8/6.7 Moyenne 5.75	40/44/48/57 Moyenne 47.25	4.8/4.7/5.8/6.7 Moyenne 5.75	40/44/48/57 Moyenne 47.25
Laboratoire B	16/20/15 (AU) Moyenne 17	296/333/301(AU) Moyenne 310	30/15/22 Moyenne 22.3	52/58/45 Moyenne 48.3
Laboratoire C	16/15/17/17 Moyenne 16.25	37/33/35/39 Moyenne 36	17/9/6/10 Moyenne 10.5	55/34 Moyenne 44.5
Laboratoire D	37/32/33 Moyenne 34	57/58/56 Moyenne 57	13/11/11 Moyenne 11.6	25/27/34 Moyenne 28.6

3.2.4 Harmonisation et choix techniques pour l'opérationnalité terrain

La **figure 7** présente le schéma synoptique de l'ensemble de la procédure d'évaluation des dommages à l'ADN par le test Comet. Comme précédemment vu pour les marqueurs de la réponse immunitaire, on retrouve trois phases principales, à savoir *i*) le retour des organismes au laboratoire, *ii*) le prélèvement et la préparation des échantillons et *iii*) la réalisation du test Comet à proprement parler. L'enjeu a été d'**harmoniser** au maximum la procédure, au regard des **spécificités propres à chaque espèce/type cellulaire** et des **délais successifs** séparant la collecte des individus encagés, les prélèvements, la préparation des échantillons et la réalisation du test Comet.

Les **méthodes de prélèvement** des échantillons cellulaires étaient déjà bien maîtrisées au sein du consortium. Chez les **poissons**, les échantillons de sang contenant les érythrocytes sont récupérés au niveau d'une incision à l'aide de matériel hépariné et immédiatement vitrifiés à l'azote liquide dans du milieu de Vindeløv (Santos et al., 2016). Pour le reste des organismes, les prélèvements ont lieu dans les 24 heures après rapatriement au laboratoire. Concernant les **mollusques bivalves**, le prélèvement des hémocytes s'effectue par ponction de l'hémolymphe dans le muscle adducteur. Des essais réalisés en amont avaient démontré la faisabilité de cette technique chez la moule brune en dépit de la petitesse de l'espèce. Pour les **crustacés**, le prélèvement des spermatozoïdes est propre à la physiologie de l'espèce considérée. Il s'effectue par dilacération de la gonade mâle chez le gammare (Lacaze et al., 2010) ou par dilacération des spermatophores chez la crevette (Erraud et al., 2018b).

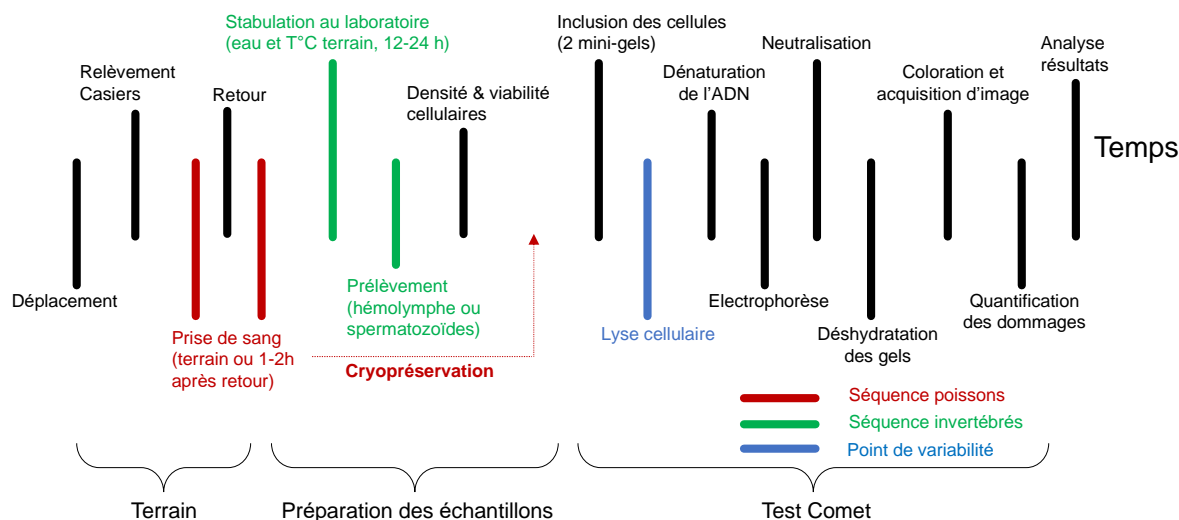


Figure 7. Synoptique de la procédure expérimentale du programme SASHIMI pour le suivi des dommages à l'ADN en biosurveillance, au moyen du test Comet. Les coupures dans la frise marquent les possibilités de différer les étapes. Après collecte les organismes sont conservés dans l'eau du site d'encagement à la température du terrain. Concernant les poissons, les érythrocytes sont prélevés sur le terrain (*i.e.* épinoche) ou immédiatement après retour au laboratoire (*i.e.* flet). Pour les invertébrés, les organismes sont traités dans un délai de 12 à 24 h, après retour au laboratoire. Chaque échantillon cellulaire (*i.e.* sang, hémolymphes ou spermatozoïdes) fraîchement collecté est validé au regard de la densité et la viabilité cellulaire, et préparé pour l'inclusion en 2 mini-gel d'agarose sur lame microscopique. Une étape de cryopréservation, optionnelle, après collecte des échantillons cellulaires permet de différer la procédure d'inclusion. Dans le cas contraire, les premières étapes du test Comet doivent être effectuées dans la foulée. Les échantillons déshydratés peuvent être préservés plusieurs semaines à l'abri de la lumière après déshydratation. Sitôt la révélation par marquage fluorescent de l'ADN, l'acquisition des images doit être effectuée. La quantification des dommages sur images enregistrées peut être décalée dans le temps.

L'estimation de la « mortalité » cellulaire est fortement recommandée afin de s'assurer que les dommages à l'ADN mesurés par le test Comet ne soient pas liés à des effets cytotoxiques (*i.e.* mortalité cellulaire par nécrose ou apoptose). Bien qu'il n'y ait aucun essai qui soit recommandé pour évaluer ce marqueur en complément de la quantification des dommages par le test des comètes, l'estimation de la « mortalité » cellulaire se fait principalement à l'aide d'un marqueur d'intégrité membranaire et doit être réalisée directement après la récupération des cellules d'intérêt *i)* soit par microscopie optique après marquage des cellules au Bleu Trypan, *ii)* soit par cytométrie en flux après marquage des cellules à des fluorochromes spécifiques (IP ou kits spécifiques). La nature de la technique sollicitée n'a aucune répercussion sur la quantification des dommages à l'ADN par la suite. L'estimation du bon état général des cellules d'intérêt peut se faire également *a posteriori*, avec un niveau de base de dommages à l'ADN qui devrait être de l'ordre de 10 % à 20 % de *Tail Intensity* (ou % Tail DNA) pour les cellules somatiques et germinales, respectivement. De même, l'identification d'une distribution bimodale des dommages à l'ADN (*i.e.* présence de deux cohortes de nucléoïdes, présentant un ADN faiblement endommagé ou un ADN très fortement endommagé) traduirait plutôt un effet cytotoxique que génotoxique. Par ailleurs, il convient de **respecter une densité cellulaire optimale** (*i.e.* généralement $6 \cdot 10^5$ à 10^6 cellules / mL pour un système de deux mini-gels/lame) pour assurer de bonnes conditions de lecture des gels de Comet durant la phase de quantification des dommages (*i.e.* non-chevauchement des comètes, nucléoïdes en densité optimale). Ce point de vigilance est particulièrement important dans le cas des prélèvements d'érythrocytes de poissons qui nécessitent d'importants facteurs de dilution pour répondre à ces conditions.

Hormis la **composition du milieu** propre au maintien de chaque **type cellulaire** (*e.g.* pH, osmolarité), il en ressort deux stratégies différentes concernant l'application du test des comètes : une application du test Comet sur cellules « fraîches » ou sur cellules « cryopréservées ». La **cryopréservation** est une étape optionnelle autorisant une analyse différée des échantillons. Cette étape permet d'assouplir les **contraintes de délais successifs** séparant, d'une part, la collecte des individus encagés et,

d'autre part, le prélèvement des échantillons cellulaires, de l'inclusion des cellules et la réalisation du test Comet - *i.e.* nécessité d'appliquer le protocole du test des comètes en condition « frais » sitôt ou le lendemain de l'échantillonnage des organismes (**Figure 7**). L'intérêt principal est d'augmenter la capacité analytique (*i.e.* nombre de spécimens échantillonnés et donc nombre de stations engagées simultanément) ; condition plus favorable pour un déploiement à large échelle et un transfert vers des acteurs opérationnels (*e.g.* gestionnaires et bureau d'études). Toutefois, il est impératif de s'assurer, en amont, que les conditions de cryopréservation n'impactent pas ou peu le niveau de dommages à l'ADN des cellules, de sorte à préserver le potentiel discriminant du marqueur et éviter toute erreur d'interprétation. La cryopréservation des échantillons cellulaires pour l'application du test Comet était maîtrisée par des laboratoires du consortium concernant les érythrocytes de poissons (*i.e.* SEBIO-INNERIS et TOXEM respectivement pour l'épinoche et le flet ; Vindelov et Christensen, 1990). Des expérimentations ont été menées sur hémocytes de dreissène/moule bleue et spermatozoïdes de crevette. Un effet significatif de la cryopréservation sur l'intégrité de l'ADN des hémocytes de bivalves a toujours été observé quelle que soit la technique utilisée. *A contrario*, les résultats obtenus sur spermatozoïdes de crevette ont démontré l'applicabilité de la procédure sur ce modèle cellulaire (**Encart 1**). Toutefois, il est nécessaire d'acquérir un retour d'expérience plus important avant d'envisager une application en routine, étant donné les interactions suggérées entre le stress chimique et la cryopréservation sur le taux de dommage.

Encart 1. Illustration des essais de cryopréservation des suspensions spermatisques de *Palaemon* sp.

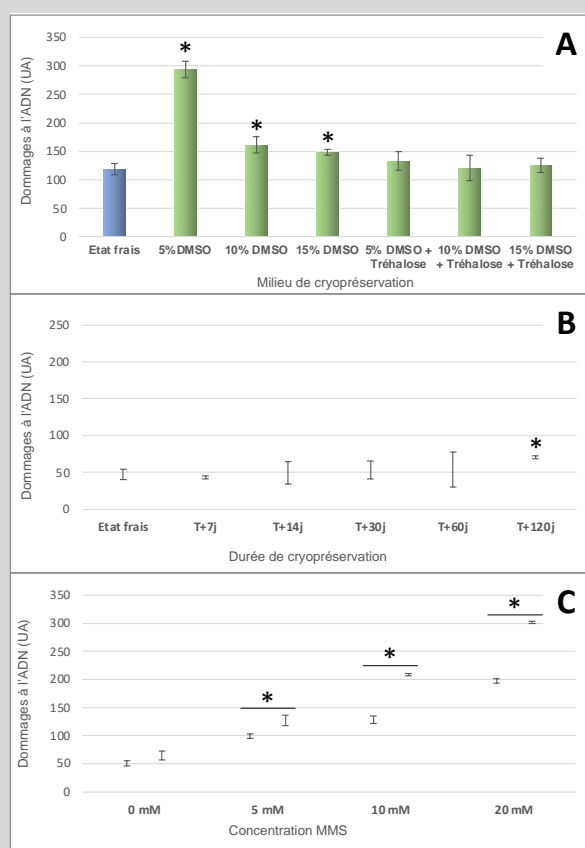


Figure 9. Illustration des essais de cryopréservation de suspensions de spermatozoïdes de *Palaemon serratus*. La cryopréservation a été réalisée au moyen du système Mr. Frosty™ (Thermo Scientific™) et stockage à -80 °C, assurant un refroidissement de -1°C.min⁻¹. Les échantillons ont été décongelés durant 1 min dans un Bain-Marie à 37 °C, puis immédiatement traités en test Comet. Pour chacune des expérimentations, les différents échantillons étaient obtenus par aliquotage d'un seul et même pool de spermatozoïdes collectés sur une dizaine de spécimens.

(A) Taux de dommages à l'ADN (moyenne ± SD ; n = 3) d'échantillons cellulaires frais (en bleu) versus cryopréservés 7 jours en présence de différentes compositions de préservateurs (en vert). **Le mélange DMSO/Tréhalose a permis une préservation de l'intégrité de l'ADN durant la congélation (*i.e.* ± 5 % des valeurs à l'état frais).**

(B) Taux de dommages à l'ADN (moyenne ± SD ; n = 3) d'échantillons cellulaires frais (en bleu) versus différentes durées de cryopréservation en présence de 10% de DMSO et de tréhalose (en vert). **La cryoconservation a montré un effet significatif sur l'intégrité de l'ADN, après 120 jours.**

(C) Taux de dommages à l'ADN (moyenne ± SD ; n = 3) d'échantillons cellulaires frais (en bleu) versus cryopréservés 7 jours en présence de 10% de DMSO et de tréhalose (en vert), préalablement exposées *in vitro*, durant 1 h, à un gradient de Méthylméthane Sulfonate (*i.e.* MMS). **Le niveau de dommage à l'ADN induit par le MMS est accentué d'environ 30 % après cryoconservation.**

Les **étapes expérimentales** propres au test Comet ont été **harmonisées** pour l'ensemble des 7 espèces du projet (**Figure 8**), sur la base du protocole de Cant et al. (2022). Cette harmonisation a concerné aussi bien les procédures que le matériel et les réactifs mobilisés. La seule exception concerne le temps de lyse beaucoup plus long pour les spermatozoïdes de gammare du fait de la forte compaction de l'ADN de ce type cellulaire. Cette stratégie nécessite toutefois de centraliser le gros de l'effort

expérimental sur un seul laboratoire.








	<i>Mytilus</i>	<i>Dreissena</i>	<i>Mytilopsis</i>	<i>Crevette</i>	<i>Gammaré</i>	<i>Flet</i>	<i>Epinouche</i>
Echantillons							
	Hémocytes Ponction muscle adducteur		Spermatozoïdes Spermatophores Testicules		Erythrocytes Prise de sang		
	Après maintien au laboratoire 12-24 h, 15 °C, eau terrain					Retour Terrain	Terrain
	Echantillons frais					Echantillons cryopréservés	
Viabilité/densité	≥ 85 % de survie / 6.10 ⁵ -10 ⁶ cell./mL						
Inclusion	2 min-gels agarose 0.5 % Support : Lame microscope						
Lyse	2.5 M NaCl, 100 mM Na2EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10						
	1 h		18 h		1 h		
Dénaturation	300 mM NaOH, 1 mM Na2EDTA, pH >13 ; 30 min						
Electrophorèse	300 mA / 20 V ; 24 min Cuve 20 lames						
Neutralisation	0.4 mM Tris-HCl, pH 7.5 ; 2 x 10 min						
Déshydratation	EtOH absolue ; 5 min						
Coloration	SYBR Gold (1X) ; 5 min Système d'acquisition d'image : EVOS®						
Quantification	100 noyaux / gel Unité : % tail DNA Système d'analyse : Comet assay IV®						

Figure 8. Synthèse des procédures d'analyses des dommages à l'ADN au moyen du test Comet sur une collection d'espèces sentinelles d'intérêt pour la bioévaluation de la qualité des hydrosystèmes continentaux, estuariens et littoraux de l'Europe du nord.

Le protocole du test des comètes se déroule en majeure partie (hormis les dernières étapes) à l'obscurité (ou sous lumière inactinique), avec un maintien permanent des échantillons biologiques à 4°C afin de préserver la qualité de l'ADN. Dans le cadre du projet Sashimi, il a été convenu de réaliser le test des comètes en duplicat de gels (2x30 µL) par lame microscopique, pour chacun des modèles d'étude. Bien que d'autres méthodologies permettant un meilleur rendement existent (e.g. dépôts de mini-gels de l'ordre de 5 µL sur lame microscopique ou film Gelbond), des travaux ont montré des variations des niveaux d'endommagement, principalement liées aux forces de migration électrophorétiques différentes entre les systèmes « mini-gels » et « gels classiques » (Bonnard et al., non-publié). Il était donc important de conserver une méthodologie commune et maîtrisée en amont du projet par l'ensemble des partenaires. De la même façon, une concentration finale d'agarose à 0.5 % dans laquelle sont mélangées les cellules d'intérêt a été sélectionnée pour l'ensemble des modèles cellulaires, afin de permettre de façon optimale la migration des brins d'ADN endommagés dans le gel d'agarose (Bonnard et al., non-publié) et offrir une meilleure sensibilité du test des comètes.

Les différences d'équipement entre les laboratoires partenaires (e.g. formats horizontal/vertical et dimensions des cuves électrophorétiques, puissances des générateurs) seraient vraisemblablement à l'origine des différences constatées lors des premières expérimentations d'harmonisation (cf. section 3.2.3). Bien que difficilement viable à long terme, une solution consiste à désigner un laboratoire de « référence » pour traiter dans la mesure du possible l'échantillon jusqu'à l'analyse de ses dommages. Il est toutefois primordial d'améliorer nos connaissances et maîtriser les facteurs responsables des

sources de variabilité inter-laboratoires concernant la méthodologie du test des comètes. Des essais ont été réalisés dans le cadre du projet Sashimi et du projet connexe Biosurveillance afin de proposer comme standard des érythrocytes d'épinoche (présentant l'avantage d'une densité cellulaire élevée) ou des cellules « contrôles » issues du commerce (des essais de calibration ont été entrepris par le laboratoire A). Une réflexion mérite d'être menée autour de la **définition d'un standard méthodologique** similaire/commun dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique permettant une « correction » et une harmonisation optimale des résultats entre les laboratoires, quel que soit leur équipement. Cela nécessiterait, soit pour les laboratoires d'acquérir les équipements et d'avoir les compétences requises pour le maintien/la croissance-culture/la cryoconservation de ce standard méthodologique, soit l'approvisionnement de ce standard méthodologique est assuré par une structure commerciale à un coût économiquement acceptable. Pour chaque modèle d'étude, il est essentiel de bien connaître la variabilité naturelle des taux de cassures de brins de l'ADN, au sein même de l'échantillon (suspension cellulaire) de même que la variabilité inter-individuelle du biomarqueur.

Le **nombre nécessaire de réplicats** biologiques (nucléoïdes scorés, nombre de gels, nombre d'individus) garantit l'établissement d'un référentiel de qualité du biomarqueur de même que son opérationnalité dans le cadre de campagnes de biosurveillance. Sur cette base, il a été proposé pour l'ensemble des modèles d'étude, de mesurer les dommages à l'ADN sur un minimum de 100 nucléoïdes par gel à raison de 2 gels par individu, un minimum de 50-100 individus « témoins » pour l'établissement du référentiel pour les modèles qui n'avaient pas de données « historiques », et un minimum de 10 individus par site lors de campagnes de biosurveillance. Le **critère utilisé pour exprimer le niveau de cassures** de brins de l'ADN est le paramètre *% Tail Intensity* ou *% Tail DNA* ; qui correspond au pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (ou ADN endommagé). Ce paramètre recommandé dans la littérature est plus informatif du niveau de dommages en comparaison d'autres métriques (e.g. *Extent/Olive Tail Moment*, *Tail Length*) de même qu'il est indépendant de l'équipement des laboratoires. Bien qu'historiquement, il était proposé d'exprimer les dommages à l'ADN sous forme de moyenne des deux moyennes de gels (comprenant chacun 100 nucléoïdes scorés), nous avons privilégié la **moyenne des deux médianes** de gels qui est de plus en plus recommandée. En effet, la distribution des dommages ne suit pas forcément une loi normale en fonction de l'espèce/type cellulaire considéré. De même, la moyenne est beaucoup plus sensible aux valeurs extrêmes en comparaison de la médiane, ce qui peut fausser l'interprétation des résultats. Sur le même principe que les évaluations toxicologiques, des réflexions méritent d'être menées au niveau national/international concernant l'harmonisation des paramètres à fournir dans l'évaluation de la génotoxicité environnementale, considérant le nombre de réplicats biologiques, la prise en compte d'un seuil de mortalité cellulaire ou de pourcentage de nucléoïdes présentant un ADN fortement endommagé et non comptabilisé invalidant l'échantillon biologique, en complément des paramètres d'expression des dommages à l'ADN.

Dans le cadre du projet Sashimi, l'**analyse des dommages** à l'ADN des différents modèles d'étude a été **harmonisée** entre les partenaires et réalisée de façon semi-automatisée via l'utilisation du logiciel d'analyse d'images Comet Assay IV (Perceptive Instruments). Particulièrement robuste avec la visualisation de chaque comète analysée, cette phase de quantification des dommages présente néanmoins l'inconvénient d'être particulièrement chronophage pour l'expérimentateur, et trouve donc ses limites dans le cadre de projets de recherche où un très grand nombre d'échantillons biologiques nécessite d'être analysé. Des systèmes entièrement automatisés de quantification des dommages existent qui présentent l'avantage d'être indépendant de l'expérimentateur, bien que des données antérieures confirment l'absence de cet effet pour de la quantification semi-automatisée. Ces systèmes restent néanmoins coûteux et nécessitent d'être calibrés pour nos modèles d'étude (i.e. hémocytes, spermatozoïdes), qui au sein de la suspension cellulaire peut présenter une diversité de taille/d'aspect du nucléoïde en comparaison par exemple des lignées cellulaires de poissons ou mammifères.

3.3 Marqueurs d'atteinte à la fonction de reproduction

La reprotoxicité désigne l'altération des capacités reproductrices d'un organisme que ce soit au niveau

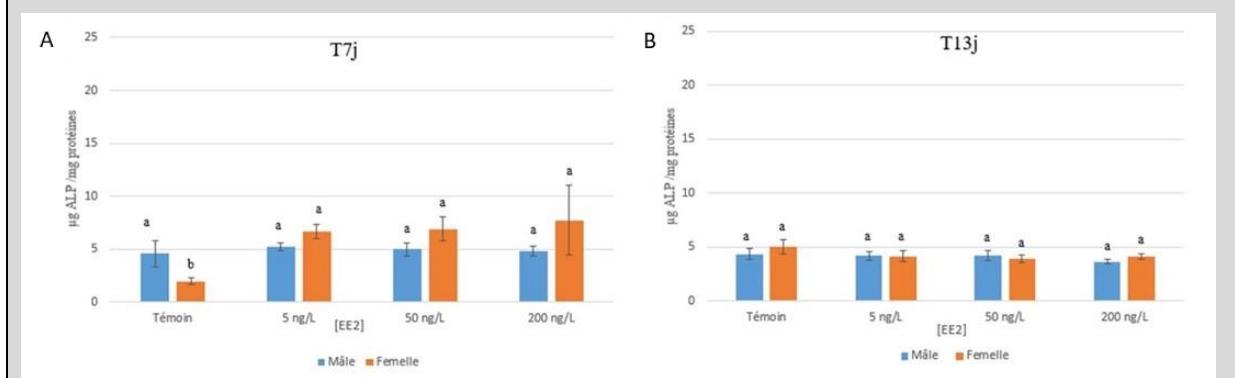
de la fécondité ou des mécanismes moléculaires sous-jacents. L'évaluation de la reproduction des organismes aquatiques est généralement réalisée à partir d'approches histologiques, notamment chez les bivalves qui présentent une gonade diffuse au sein de tissus somatiques, par le calcul d'indices gonado-somatiques suite à la réalisation de mesures biométriques ou par le dosage de la vitellogénine, en particulier chez les poissons.

La possibilité d'appliquer ces approches dans le cadre dicté par le projet SASHIMI, a été étudiée au regard de :

1. **la saisonnalité du cycle reproducteur** des 7 espèces étudiées (données bibliographiques et connaissance des espèces),
2. **la description du cycle reproducteur** de ces espèces (aspects méthodologiques),
3. **la faisabilité de l'approche histopathologique**,
4. **la mesure de la vitellogénine (VTG)** comme biomarqueur de reprotoxicité.

Si la mesure de la VGT est bien maîtrisée chez les poissons tels que l'épinoche (méthode ELISA), des développements méthodologiques demeuraient nécessaires chez les bivalves. Ainsi, la méthode dite « ALP » reposant sur le dosage des phosphates alkali-labiles qui sont des marqueurs indirects de la VTG (Gagné et Blaise, 2000) a été testée chez *Mytilopsis*. Cette technique a été choisie du fait de sa facilité d'application qui ne nécessite pas la caractérisation complète de la VTG et de sa faisabilité sur une grande variété d'espèces et de tissus (Gagné *et al.*, 2002 ; Quinn *et al.*, 2004 ; Quinn *et al.*, 2006). Ainsi, des individus de *Mytilopsis* ont été exposés à des concentrations de 5 à 200 ng/L de 17 β -estradiol (E2) pendant 13 jours (**Encart 2**). Aucune différence significative n'a été enregistrée entre les concentrations mais également entre les mâles et les femelles, ce qui invalide la méthode chez la moule brune. Sánchez-Marín *et al.* (2017) et Tran *et al.* (2019) ont également invalidé la méthode ALP chez les mollusques en soulignant la faible reproductivité de la méthode en raison de fortes variations techniques et des réponses des espèces testées. De plus, chez *Mytilopsis*, nous avons analysé des échantillons de tissus (gonade et glande digestive) de mâles et de femelles en spectrométrie de masse (plateforme Proteogen de SF ICORE) en utilisant les séquences de VTG caractérisées chez d'autres espèces de Mollusques. Les résultats de 7 échantillons ont indiqué une absence de détection de la VTG qui pourrait ne pas être bien conservée au cours de l'évolution chez *M. leucophaeata*.

Encart 2. Niveaux moyens de Vtg \pm SEM exprimés en μ g phosphates alkali labiles/mg protéines dans la gonade de *Mytilopsis leucophaeata* en fonction du sexe et de la condition d'exposition au 17 β -estradiol. **A** : 7 jours d'exposition ; **B** : 13 jours d'exposition.



Par ailleurs et à titre prospectif, des essais d'immunohistochimie (IHC) basée sur la détection de l'antigène nucléaire des cellules proliférantes (*i.e. proliferating cell nuclear antigen*, PCNA) ont été réalisés chez *Mytilus edulis* (qui offre davantage de surfaces histologiques comparé à *Mytilus*). Ce marqueur de proliférations cellulaires lors de la gamétogenèse (*i.e. mitoses goniales*) pourrait permettre d'étudier les différentiels d'avancement inter-individus et inter-sites de ce processus. Les paramètres techniques (*e.g.* temps d'incubation, dilution de l'anticorps primaire) ont été testés et une

détection de marquage positif a été enregistrée. Néanmoins, cette méthode semble peu adaptée à la biosurveillance active principalement du fait qu'elle est plus qualitative que quantitative.

Au final, compte tenu de la diversité des modes et des cycles de reproduction, et les méthodologies actuellement existantes, il n'est pas apparu possible d'étudier une réponse commune aux 7 espèces ni de proposer une complète homogénéisation des protocoles de mesures de reprotoxicité (adaptées à la biosurveillance). Le développement des nouvelles technologies d'écotoxicité-protéomiques (Projet Protéomique ciblée pour la quantification multiplexée de biomarqueurs⁶) permettra sans doute de lever ce type de verrous dans un futur proche.

4 Cadre d'interprétation des marqueurs

4.1 Intégration de la variabilité naturelle et valeurs seuils

Pour être totalement opérationnels dans un réseau de surveillance environnementale, les indicateurs, qu'ils soient chimiques, biologiques ou écologiques, doivent produire un **diagnostic** de l'état de préservation ou de dégradation du milieu concerné. En surveillance environnementale, cela se traduit généralement par une transformation des données sur une échelle qualitative qui rend l'interprétation complètement abordable pour tout tiers non expert dans les techniques analytiques. En contrepartie, cela nécessite d'avoir acquis un **bon niveau de maîtrise** tant dans l'**application** et l'**analyse** que dans l'**interprétation**.

Dans le cas d'une réponse biologique (e.g. biomarqueurs), la **compréhension et l'intégration de sa variabilité naturelle** constituent des **prérequis essentiels** pour discriminer les effets d'un stress anthropique (e.g. stress chimique) du bruit de fond lié à la modulation naturelle de cette réponse biologique. La variabilité naturelle peut être induite par des caractéristiques biologiques intrinsèques aux organismes (e.g. âge/taille, sexe, stade de reproduction, distance génétique) et/ou par des facteurs environnementaux (e.g. température, salinité, oxygène dissous, interactions biotiques). Comme cité précédemment, le choix d'une stratégie de biosurveillance active par encagement, sur une saison bien définie, permet de limiter en partie cette variabilité. A titre d'exemple, la calibration des spécimens déployés, de même que le choix d'une période d'encagement optimum, vont considérablement diminuer la part de variabilité intrinsèque et atténuer les variations de température (e.g. Xuereb et al., 2009). Pour les facteurs environnementaux ne pouvant être maîtrisés, il conviendra de *i*) s'assurer en amont de leur absence d'effet (e.g. Erraud et al., 2019) ou *ii*) d'intégrer leur effet au moyen d'un modèle mathématique (e.g. Coulaud et al., 2011 ; Lopes et al., 2020). Pour le reste, une des stratégies consiste à produire une **distribution de données de référence** (i.e. spatiales et/ou chronologiques) dans des conditions contrastées (i.e. bon état *versus* état moyen ou mauvais état) et de définir à partir de là, des **valeurs guides** telles que *i*) un **niveau de base** de la réponse et *ii*) un ou des **seuil(s) de significativité** qui permettront de traduire la valeur du biomarqueur dans une grille de lecture qualitative. A ce stade, il est important de bien comprendre que ces valeurs de référence seront **spécifiques de la stratégie employées** (e.g. encagement ou non, provenance des spécimens, calibre des spécimens) et seront **vouées à être affinées** avec le recul sur expérience – i.e. plus l'acquisition de données sera importante et plus ces différentes valeurs deviendront robustes.

4.2 Définition des valeurs des référentiels d'interprétation pour les couples biomarqueurs/espèces, dans le cadre d'application du projet SASHIMI

⁶ Projet « Protéomique ciblée pour la quantification multiplexée de biomarqueurs : perspectives pour la surveillance environnementale » - Office Français de la Biodiversité – Programme 2019/2020 – Action n°4. <https://professionnels.ofb.fr/fr/node/1474>.

Un **niveau de base** et un ou de(s) **seuils de significativité** ont été définis pour chacun des couples biomarqueurs/espèces. Les méthodologies mobilisées et le degré de robustesse des référentiels ainsi produits étaient dépendants *i)* du profil et de la taille des jeux de données disponibles, *ii)* des contraintes liées aux espèces et/ou *iii)* du niveau d'expertise des différentes équipes impliquées. Ainsi, une méthodologie unique à l'ensemble des espèces ne peut être proposée. L'origine des données et les méthodologies utilisées pour la définition des valeurs de référence et seuil pour chaque couple biomarqueur-espèce sont présentées de façon détaillée au sein de chaque fiche méthodologique (cf. Recueil méthodologique). Une synthèse des principales informations est présentée dans le **Tableau 3**. De façon similaire aux différentes espèces, un seul type de modulation est retenu pour le marqueur de génotoxicité. En effet, seule une induction des dommages à l'ADN (% Tail DNA) a été retenue comme réponse interprétable au regard d'un stress chimique et pour l'évaluation de la toxicité d'une masse d'eau. A l'inverse, les réponses physiologiques pour les marqueurs de l'immunité permettent théoriquement de définir des effets pro-inflammatoires (*i.e.* inducteurs de phagocytose) ou des effets inhibiteurs anti-inflammatoires immunosuppresseurs (*i.e.* inhibiteurs de phagocytose). Sur la base des données actuellement disponibles, différents schémas de réponse à la qualité chimique du milieu sont proposés en fonction de l'espèce. Chez certaines espèces, seule une inhibition (*e.g.* dreissène, moule brune) ou seule une induction (*e.g.* moule bleue pour les paramètres efficacité et avidité) des réponses sera traduite comme un effet de la qualité chimique du milieu sur l'immunité des organismes, alors que pour d'autres espèces (*e.g.* gammare, crevette, épinoche, flet, capacité moule bleue) un effet de la qualité chimique du milieu pourra se traduire par une inhibition ou une induction de la réponse. Ceci s'explique par les différences de dispersion des réponses observées chez les différents taxons. Là où chez les vertébrés, les phagocytes assurent une réponse très répétable (*e.g.* 3 points de variabilité pour la capacité de phagocytose et 4 points pour l'efficacité) permettant aisément de dégager des seuils à l'induction et à l'inhibition, les invertébrés montrent généralement une plus forte variabilité naturelle. Pour les trois paramètres chez les crustacés et la capacité phagocytaire chez la moule bleue cependant, la distribution des valeurs permet également de proposer deux types de seuils. Lorsque les niveaux de base sont plus élevés, il n'est pas possible de proposer des seuils à l'induction (*e.g.* dreissène et moule brune).

Une fois un référentiel (*i.e.* valeurs de référence et valeur seuil) établi pour chaque couple biomarqueur-espèce, une **grille d'interprétation** des niveaux de réponse a été proposée. De façon similaire pour chaque couple biomarqueur-espèce, la grille comporte trois niveaux – *i.e.* « état de référence », « effet marqué » et « effet très marqué ». Cette grille a été établie sur la base des connaissances actuelles concernant chaque couple biomarqueur-espèce et vise une appréciation semi-quantitative de la réponse de ces outils pour une interprétation plus accessible par un public non-spécialiste. De façon similaire au référentiel, la méthodologie de définition de ces trois niveaux a été réalisée selon une méthodologie dépendante du jeu de données disponibles pour chaque espèce et présenté de façon détaillée dans les fiches méthodologiques.

Tableau 3. Récapitulatif des méthodes mobilisées pour le calcul des valeurs de références, pour chacun des couples biomarqueur/espèce, dans les conditions d'application cadrées par le projet SASHIMI.

	IMMUNOMARQUEURS				TEST COMET			
	Provenance des jeux de données / Méthode de calcul des valeurs seuils		Valeurs de référence Valeur basale +/- [seuils de significativité]		Provenance des jeux de données / Méthode de calcul des valeurs seuils		Valeurs de référence Valeur basale [+ seuil de significativité]	
Dreissène	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Méthode de Besse et al. 2013	Capacité de phagocytose : 74.0 - [seuil d'inhibition : 66.0] % Efficacité de phagocytose : 56.0 - [seuil d'inhibition : 41.0] %	non publié (projets annexes : EQUAL, AEAP, PIREN)	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Méthode de Besse et al. 2013	% DNA tail : 4.2 + [seuil d'induction : 8.7] %	non publié (projets annexes : EQUAL, AEAP, PIREN)
Moule brune	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Seuil d'inhibition = 33 % inférieur à la valeur moyenne du jeu de données	Capacité de phagocytose : 53.8 - [seuil d'inhibition : 36.0] % Efficacité de phagocytose : 22.4 - [seuil d'inhibition : 15.0] %	non publié (projet SASHIMI)	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Seuil d'induction = 33 % supérieur à la valeur moyenne du jeu de données	% DNA tail : 9.2 + [seuil d'induction : 12.3] %	non publié (projet SASHIMI)
Moule bleue	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Méthode de Besse et al. 2013	Capacité de phagocytose : 41.1 ± [seuils : 15.4 – 66.9] % Efficacité de phagocytose : 17.5 - [seuil d'inhibition : 37.0] %	non publié (projet SASHIMI)	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Méthode de Besse et al. 2013	% DNA tail : 2.4 + [seuil d'induction : 6.3] %	non publié (projet SASHIMI)
Gammare	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Seuil d'inhibition = quartil inférieur du jeu de données	Capacité de phagocytose : 60.8 ± [seuils : 42.2 – 80.7] % Efficacité de phagocytose : 31.4 ± [seuils : 17.5 – 58.2] %	non publié (projets SASHIMI et annexes : AEAP, AERMC)	Suivi du site d'élevage	Seuil d'induction = quartil supérieur du jeu de données	% DNA tail : 10.1 + [seuil d'induction : 18.5] %	non publié (projet SASHIMI)
Crevettes	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Méthode de Besse et al. 2013	Capacité de phagocytose <i>Ps</i> : 49.3 ± [seuils : 32.3 – 65.6] % Efficacité de phagocytose <i>Ps</i> : 18.4 ± [seuils : 8.4 – 30.4] %	non publié (projet SASHIMI)	Compilation de données de différentes campagnes d'encagements terrain (sites contrastés)	Méthode de Besse et al. 2013	% DNA tail : 4.7 + [seuil d'induction : 11.4] %	non publié (projet SASHIMI)
Flet	Flet de la canche (2018, 2020 et 2021) Acclimatés 14 j, puis encagés 15 j sous condition contrôlées en laboratoire	Seuils = moyenne haute (2018) et moyenne (2020) observées les différentes années	Capacité de phagocytose : 75.5 ± [74.0-77.0] % Efficacité de phagocytose : 38.7 ± [35.9-40.5] %	non publié (projet SASHIMI/BIOSURVEILLANCE)	Flet de la canche (2018, 2020 et 2021), acclimatés 14 j, puis encagés 15 j sous condition contrôlées en laboratoire	Seuil d'induction = IC 95% de l'entièreté du jeu de données	% DNA tail : 32.3 + [seuil d'induction : 33.5] %	non publié (projet SASHIMI/BIOSURVEILLANCE)
Épinoche	Suivi annuel dans les bassins d'élevage + données de différentes campagnes d'encagements (sites de référence)	Modèle linéaire intégrant 3 facteurs (saison, sexe et taille)	Valeurs dépendantes des conditions initiales	Marchand et al. (2020, 2021) ; non publié (projet SASHIMI BIOSURVEILLANCE)	Suivi annuel dans les bassins d'élevage et site de référence (2020 et 2021)	Seuil d'induction = IC 95% de l'entièreté du jeu de données	% DNA tail : 7.61 + [seuil d'induction : 17.60] %	non publié (projet SASHIMI/BIOSURVEILLANCE)

Ps = uniquement valable chez *Palaemon serratus*.

5 Conclusion

En définitive, le projet SASHIMI a contribué à produire une méthodologie de suivi de biomarqueurs multi-espèces sur organismes engagés, optimisée et harmonisée, pour répondre au cadre d'une bio-surveillance active le long d'un *continuum* de masses d'eau. Ces travaux ont notamment permis d'émettre un certain nombre de recommandations, points de vigilance et perspectives d'améliorations pour l'avenir.

La méthodologie proposée par le projet SASHIMI fait actuellement l'objet d'un déploiement opérationnel à l'échelle du district Seine-Normandie, dans le cadre du projet BIOSURVEILLANCE (**Figure 9**). Cette mise en application à large échelle, durant 2 années consécutives (2020 et 2021), sur l'ensemble des espèces mobilisées dans le projet SASHIMI, apportera un retour critique et objectif sur les aspects méthodologiques. L'évaluation la qualité immunotoxique et génotoxique des masses d'eau sur l'ensemble du bassin de la Seine, ainsi qu'au niveau des estuaires de l'Orne et de la Vire, sera notamment valorisée par la production d'une cartographie simplifiée, accessible à l'ensemble des acteurs des bassins. Les résultats devraient ainsi offrir différentes perspectives de lectures (e.g. dans leur globalité, par groupe taxonomique, par espèce), en autorisant un regard sur la diversité des réponses entre espèce vis-à-vis d'une même pression, au niveau des stations sur lesquels les espèces ont été engagées simultanément.

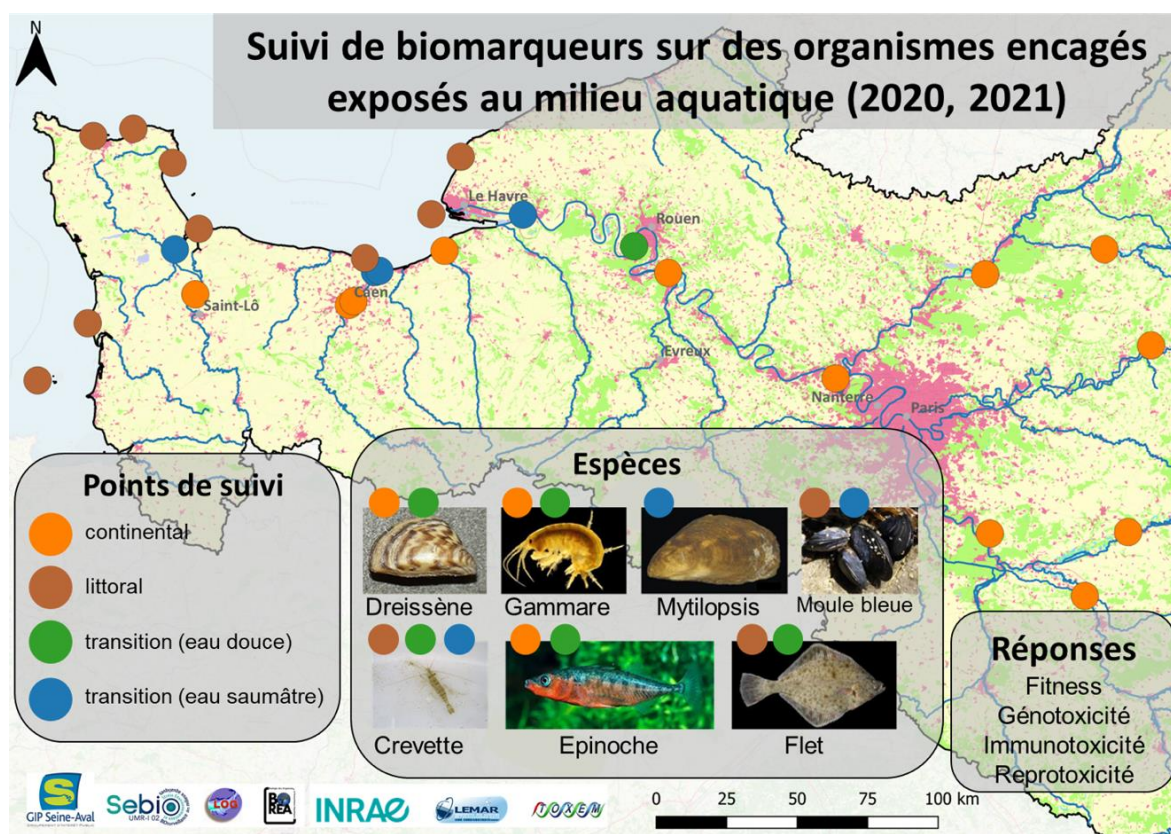


Figure 9. Carte des 27 stations d'engagement du projet BIOSURVEILLANCE, sur le bassin de la Seine (n = 12), la rivière de la Touque (n=2), l'estuaire de l'Orne (n = 5) et de la Vire (n = 3) et le long du littoral du Cotentin (n = 5).

6 Références bibliographiques

- Aitken R J, De Iuliis G N, 2007. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive Biomedicine Online* 14: 727-733.
- Akaishi FM, St-Jean SD, Bishay F, Clarke J, Rabitto I da S, de Oliveira Ribeiro CA, 2007. Immunological Responses, Histopathological Finding and Disease Resistance of Blue Mussel (*Mytilus Edulis*) Exposed to Treated and Untreated Municipal Wastewater. *Aquatic Toxicology*, 82: 1–14.
- Anderson SE, Shane HL, 2018. Investigative Immunotoxicology. In Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols, edited by DeWitt JC, Rockwell CE, Bowman CC, 27–46. *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer.
- Auffret M, Mujdzic N, Corporeau C, Moraga D, 2002. Xenobiotic-Induced Immunomodulation in the European Flat Oyster, *Ostrea Edulis*. *Marine Environmental Research*, 54: 585–89.
- Auffret M, Rousseau S, Boutet I, Tanguy A, Baron J, Moraga D, Duchemin M, 2006. A Multiparametric Approach for Monitoring Immunotoxic Responses in Mussels from Contaminated Sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63: 393–405.
- Bado-Nilles A, Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Le Floch S, Renault T, 2008. Effects of 16 Pure Hydrocarbons and Two Oils on Haemocyte and Haemolymphatic Parameters in the Pacific Oyster, *Crassostrea Gigas* (Thunberg). *Toxicology in Vitro*, 22: 1610–17.
- Bado-Nilles A, Jolly S, Lamand F, Geffard A, Gagnaire B, Turies C, Porcher J-M, Sanchez W, Betoulle S, 2015. Involvement of Fish Immunomarkers in Environmental Biomonitoring Approach: Urban and Agri-Viticultural Context. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 120: 35–40.
- Basova M M, 2017. White Blood Cell Count of the Scorpion Fish *Scorpaena Porcus* as a Biomarker of Anthropogenic Pollution in the Black Sea Coastal Waters. *Journal of Ichthyology*, 57: 467–72.
- 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.
- Bolognesi C, Cirillo S, 2014. Genotoxicity Biomarkers in Aquatic Bioindicators. *Current Zoology* 60: 273–284.
- Bolognesi C, Frenzilli G, Lasagna C, Perrone E, Roggeri P, 2004. Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 552: 153-162.
- Boulangé-Lecomte C, Xuereb B, Trémolet G, Duflo A, Giusti N, Olivier S, Lengrand E, Forget-Leray J, 2017. Controversial use of vitellogenin as a biomarker of endocrine disruption in crustaceans: New adverse pieces of evidence in the copepod *Eurytemora affinis*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 201: 66-75.
- Borcier E, Artigaud S, Gaillard J-C, Armengaud J, Charrier G, Couteau J, Receveur J, Ouddane B, Diop M, Amara R, Laroche J, Pichereau V, 2019. Coupling caging and proteomics on the European flounder (*Platichthys flesus*) to assess the estuarine water quality at micro scale. *Science of The Total Environment*, 695: 133760.
- Bourgeault A, Gourlay-Francé C, Vincent-Hubert F, Palais F, Geffard A, Biagianni-Risbourg S, Pain-Devin S, Tusseau-Villemin M H, 2010. Lessons from a transplantation of zebra mussels in a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology*, 25: 468-478.
- Buisson S, Bouchart V, Guerlet E, Malas J P, Costil K, 2008. Level of contamination and impact of pesticides in cupped oyster, *Crassostrea gigas*, reared in a shellfish production area in Normandy (France). *Journal of Environmental Science and Health*, 43: 655-664.
- Calvès I, Lavergne E, Meistertzheim A, Charrier G, Cabral H, Guinand B, Quiniou L, Laroche J, 2013. Genetic structure of European flounder *Platichthys flesus*: effects of both the southern limit of the species' range and chemical stress. *Marine Ecological Progress Series*, 472: 257-273.
- Campillo A, 1979. Contribution à la crevette rose, *Palaemon serratus* (Pennant) ; Exploitation, biolo-

- gie, élevage, épidémiologie. *Thèse de l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc et ISTPM de Nantes*, 350 pp.
- 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.
- Cappello T, Mauceria A, Corsaro C, Maisanoa M, Parrino V, Lo Paro G, Messina G, Fasulo S, 2013. Impact of environmental pollution on caged mussels *Mytilus galloprovincialis* using NMR-based metabolomics. *Marine Pollution Bulletin*, 77: 132-139.
- Catteau A, Porcher J-M, Bado-Nilles A, Bonnard I, Bonnard M, Chaumot A, David E, Dedourge-Geffard O, Delahaut L, Delorme N, François A, Garnero L, Lopes C, Nott K, Noury P, Palluel O, Palos-Ladeiro M, Quéau H, Ronkart S, Sossey-Alaoui K, Turiès C, Tychon B, Geffard O, Geffard A., 2022. Interest of a multispecies approach in active biomonitoring: application in the Meuse watershed. *Science of The Total Environment*, 808: 152148.
- Charron L, Geffard O, Chaumot A, Coulaud R, Jaffal A, Gaillet V, Dedourge-Geffard O, Geffard A, 2014. Influence of molting and starvation on digestive enzyme activities and energy storage in *Gammarus fossarum*. *PloS one*, 9: e96393.
- Chaumot A, Coulaud R, Adam O, Quéau H, Lopes C, Geffard O., 2019. In Situ Reproductive Bioassay with Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 1—Gauging the Confounding Influence of Temperature and Water Hardness. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39: 667-677.
- Chu F-L E, Volety A K, Hale R C, Huang Y, 2002. Cellular Responses and Disease Expression in Oysters (*Crassostrea Virginica*) Exposed to Suspended Field — Contaminated Sediments. *Marine Environmental Research*, 53: 17–35.
- Ciliberti A, Chaumot A, Recoura-Massaquant R, Chandesris A, François A, Coquery M, Ferréol M, Geffard O, 2017. Caged *Gammarus* as biomonitors identifying thresholds of toxic metal bioavailability that affect gammarid densities at the French national scale. *Water Research*, 118: 131-140.
- Claxton L D, Houk V S, Hughes T J, 1998. Genotoxicity of Industrial Wastes and Effluents. *Mutation Research*, 410: 237–243.
- Collins A R, Dobson V L, Dušinská M, Kennedy G, Štetina R, 1997. The Comet Assay: What Can It Really Tell Us? *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 375: 183–193.
- Coulaud R, Geffard O, Xuereb B, Lacaze E, Quéau H, Garric J, Charles S, Chaumot A, 2011. *In situ* feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research*, 45: 6417-6429.
- Covantes-Rosales C.E., Trujillo-Lepe A.M., Díaz-Reséndiz K.J.G., Toledo-Ibarra G.A., Ventura-Ramón G.H., Ortiz-Lazareno P.C., Girón-Pérez M.I., 2019. Phagocytosis and ROS Production as Biomarkers in Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Leukocytes by Exposure to Organophosphorus Pesticides. *Fish and Shellfish Immunology*, 84: 189–95.
- Datta S, Ghosh D, Saha D R, Bhattacharaya S, Mazumder S, 2009. Chronic Exposure to Low Concentration of Arsenic Is Immunotoxic to Fish: Role of Head Kidney Macrophages as Biomarkers of Arsenic Toxicity to *Clarias Batrachus*. *Aquatic Toxicology*, 92: 86–94.
- Dean, J H, 1994. Immunotoxicology: An Overview. *Toxicology in Vitro*, 8: 933–37.
- Dedourge-Geffard O, Charron L, Hofbauer C, Gaillet V, Palais F, Lacaze E, Geffard A, Geffard O, 2013. Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97: 139-146.
- Delaporte M, Soudant P, Lambert C, Moal J, Pouvreau S, Sa-main JF, 2006. Impact of food availability on energy storage and defense related hemocyte parameters of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* during an experimental reproductive cycle. *Aquaculture*, 254: 571-582.
- Desforges J-P, Sonne C, Levin M, Siebert U, De Guise S, Dietz R, 2016. Immunotoxic Effects of Environmental Pollutants in Marine Mammals. *Environment International*, 86: 126–39.
- Desforges, J-P, Levin M, Jasperse L, De Guise S, Eulaers I, Letcher R J, Acquarone M, et al., 2017.

- “Effects of Polar Bear and Killer Whale Derived Contaminant Cocktails on Marine Mammal Immunity.” *Environmental Science and Technology*, 51: 11431–39.
- Di Poi C, Evariste L, Séguin A, Mottier A, Pedelucq J, Lebel J M, Serpentine A, Budzinski H, Costil K, 2016. Subchronic exposure to fluoxetine in juvenile oysters (*Crassostrea gigas*): uptake and biological effects. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 5002-5018.
- Erraud A, Bonnard M, Chaumot A, Geffard O, Duflot A, Forget-Leray J, Le Foll F, Geffard A, Xuereb B, 2018a. Use of the 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.
- Erraud A, Bonnard M, Duflot A, Geffard A, Danger J-M, Forget-Leray J, Xuereb B., 2018b. Assessment of sperm quality in palaemonid prawns using Comet assay: methodological optimization. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 11226-11237.
- Erraud A, Bonnard M, Geffard O, Coulaud R C, Poret A, Duflot A, Forget-Leray J, Geffard A, Xuereb B, 2019a. Signification of DNA integrity in sperm of *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Kinetic responses and reproduction impairment. *Marine Environmental Research* 144: 130-140.
- Erraud A, Bonnard M, Geffard O, Chaumot A, Duflot A, Geffard A, Forget-Leray J, Xuereb B, 2019b. Assessment of sperm DNA integrity within the *Palaemon longirostris* (H. Milne-Edwards, 1837) population of the Seine estuary. *Environmental Pollution*, 245: 485-493.
- Evariste L, Rioult D, Brousseau P, Geffard A, David E, Auffret M, Fournier M, Betoulle S, 2017. Differential Sensitivity to Cadmium of Immunomarkers Measured in Hemocyte Subpopulations of Zebra Mussel *Dreissena Polymorpha*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137: 78–85.
- Farcy E, Gagné F, Martel L, Fortier M, Trépanier S, Brousseau P, Fournier M, 2011. Short-term physiological effects of a xenobiotic mixture on the freshwater mussel *Elliptio complanata* exposed to municipal effluents. *Environmental Research*, 111: 1096–1106.
- Flajnik M F, Du Pasquier L, 2004. Evolution of Innate and Adaptive Immunity: Can We Draw a Line? *Trends Immunol*, 25: 640–44.
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P, 2000. Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *Integrative and Comparative Biology*, 40: 412–20.
- Franco A, Jouaux A, Mathieu M, Sourdain P, Lelong C, Kellner K, Heude Berthelin C, 2010. Proliferating cell nuclear antigen in gonad and associated storage tissue of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*: seasonal immunodetection and expression in laser microdissected tissues. *Cell Tissue Research*, 340, 201-210.
- Gagné F, Blaise C, 2000. Organic alkali-labile phosphates in biological materials: a generic assay to detect vitellogenin in biological tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 134: 189-198.
- Gagné F, Blaise C, Aoyama I, Luo R, Gagnon C, Couillard Y, Campbell P, Salazar M, 2002. Biomarker Study of a Municipal Effluent Dispersion Plume in Two Species of Freshwater Mussels. *Environmental Toxicology* 17: 149–59.
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J-C, 2005. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels *Mytilus edulis*? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 61: 209-220.
- Geffard A, Quéau H, Dedourge O, Biagiante-Risboug S, Geffard O, 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 145: 631-640.
- Grundy M M, Ratcliffe N A, Moore M N, 1996. Immune Inhibition in Marine Mussels by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Marine Environmental Research, Pollutant Responses In Marine Organisms* 42: 187–90.
- Haas A, 2007. The Phagosome: Compartment with a License to Kill. *Traffic* 8: 311–30.
- Hannam M L, Bamber S D, Sundt R C, Galloway T S, 2009. “Immune Modulation in the Blue Mussel *Mytilus Edulis* Exposed to North Sea Produced Water.” *Environmental Pollution* 157: 1939–44.
- Hussain B, Sultana T, Sultana S, Masoud M S, Ahmed Z, Mahboob S, 2018. Fish Eco-

- Genotoxicology: Comet and Micronucleus Assay in Fish Erythrocytes as in Situ Biomarker of Freshwater Pollution. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 25: 393–398.
- Jha A N, 2008. Ecotoxicological Applications and Significance of the Comet Assay. *Mutagenesis*, 23: 207–221.
- Jiravanichpaisal P, Lee B L, Söderhäll K, 2006. Cell-Mediated Immunity in Arthropods: Hematopoiesis, Coagulation, Melanization and Opsonization. *Immunobiology* 211: 213–36.
- Jubeaux G, 2012. Développement de la mesure de la Vtg chez les invertébrés & utilisation de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez le crustacé amphipode *Gammarus fossarum*. Thèse de l'Université de Lyon 1. 265 pp.
- Kaur R, Shah T K, Kaur S, Rani SA, 2018. Review on Genotoxicity in Aquatic Organisms and Environment. *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 7: 353–359.
- Kerambrun E, Palos Ladeiro M, Bigot-Clivot A, Dedourge-Geffard O, Dupuis E, Villena I, Aubert D, Geffard A, 2016. Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii*. *Journal of Applied Microbiology*, 120: 498-508.
- Lacaze E, Geffard O, Bony S, Devaux A, 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod *Gammarus fossarum* by use of the alkaline Comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 700: 32–38.
- Lacaze E, Devaux A, Jubeaux G, Mons R, Gardette M, Bony S, Garric J, Geffard O, 2011a. DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level. *Science of Total Environment*, 409: 3230-3236
- Lacaze E, Geffard O, Goyet D, Bony S, Devaux A, 2011b. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental Research*, 111: 626-634.
- Le Guernic A, Sanchez W, Palluel O, Bado-Nilles A, Turies C, Chadili E, Cavalié I, Adam-Guillermin C, Porcher J-M, Geffard A, Betoulle S, Gagnaire B, 2016. *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.
- Levallois A, 2019. La moule *Mytilopsis leucophaeata* dans les eaux saumâtres normandes : répartition géographique et évaluation de sa valeur bioindicatrice en reprotoxicité et immunotoxicité. *Rapport de stage de M2R « Sciences de la Mer »*, Université de Caen Normandie, 25 pp.
- Lopes C, Chaumot A, Xuereb B, Coulaud R, Jubeaux G, Quéau H, François A, Geffard O, 2020. *In situ* reproductive bioassay with caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 2 - evaluating the relevance of using a molt cycle temperature - dependent model as reference to assess toxicity in freshwater monitoring. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39: 678-691.
- Lorenzen K, Des Clers S A, Anders K, 1991. Population Dynamics of Lymphocystis Disease in Estuarine Flounder, *Platichthys Flesus* (L.). *Journal of Fish Biology* 39 (4): 577–87.
- Lugo R S, Nathali G, Villalobos L B, Mairin L, 2006. Immunological Response of the Freshwater Fish *Colossoma Macropomum* as a Biomarker of Copper Exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77 (6): 925–30.
- Luster M I, Portier C, Pait D G, White K L, Gennings C, Munson A E, Rosenthal G J, 1992. Risk Assessment in Immunotoxicology: I. Sensitivity and Predictability of Immune Tests. *Toxicological Sciences* 18: 200–210.
- Marchand A, Tebby C, Beaudouin R, Catteau A, Porcher J-M, Turiès C, Bado-Nilles A, 2020. Reliability Evaluation of Biomarker Reference Ranges for Mesocosm and Field Conditions: Cellular Innate Immunomarkers in *Gasterosteus Aculeatus*. *Science of The Total Environment* 698: 134333.
- Marchand A, Tebby C, Catteau A, Turiès C, Porcher JM, Bado-Nilles A, 2021. Application in a biomonitoring context of three-spined stickleback immunomarker reference ranges. *Ecotoxicology and Environmental Safty*, 223:112580.
- Orsière T, 2005. De La Génotoxicologie à La Biosurveillance. *Annales, Journée Nationales de Santé au Travail dans le BTP*, 28: 25-28.
- Pain-Devin S, Cossu-Leguille C, Geffard A, Giambérini L, Jouenne T, Minguez L, Naudin B, Parant M,

- Rodius F, Rousselle P, Tarnowska K, Daguin-Thiébaud C, Viard F, Devin S, 2014. Towards a better understanding of biomarker response in field survey: A case study in eight populations of zebra mussels. *Aquatic Toxicology*, 155: 52-61
- Proch J, 1992. Analysis of the Immunotoxic Effects of Xenobiotics. *Human & Experimental Toxicology* 11: 65–70.
- Prygiel E, Billon G, François A, Dumoulin D, Chaumot A, Geffard O, Criquet J, Prygiel, 2016. Active biomonitoring for assessing effects of metal polluted sediment resuspension on gammarid amphipods during fluvial traffic. *Environmental Pollution*, 218: 129-139.
- Quinn B, Gagné F, Costello M, McKenzie C, Wilson J, Mothersill C, 2004. The endocrine disrupting effect of municipal effluent on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Aquatic Toxicology*, 66: 279-292.
- Quinn B, Gagné F, Blaise C, Costello M J, Wilson J G, Mothersill C, 2006. Evaluation of the lethal and sub-lethal toxicity and potential endocrine disrupting effect of nonylphenol on the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 142: 118-127.
- Ross P S, 2002. The Role of Immunotoxic Environmental Contaminants in Facilitating the Emergence of Infectious Diseases in Marine Mammals. *Human and Ecological Risk Assessment* 8: 277–92.
- Rossi F, Palombella S, Pirrone C, Mancini G, Bernardini G, Gornati R, 2016. Evaluation of tissue morphology and gene expression as biomarkers of pollution in mussel *Mytilus galloprovincialis* caging experiment. *Aquatic Toxicology*, 181: 57-66.
- Sánchez-Marín P, Fernández-González L E, Mantilla-Aldana L, Diz A P, Beiras R, 2017. Shotgun proteomics analysis discards alkali labile phosphate as a reliable method to assess vitellogenin levels in *Mytilus galloprovincialis*. *Environmental Science and Technology*, 51, 7572-7580.
- Santos R, Palos-Ladeiro M, Besnard A, Vulliet E, Porcher J-M, Bony S, Devaux A, Sanchez W, 2014. Kinetic response of a genotoxicity biomarker in the three-spined stickleback and implication for environmental monitoring. *Ecotoxicology and Environmental Safty*, 102: 6-11.
- Santos R, Joyeux A, Palluel O, Palos-Ladeiro M, Besnard A, Blanchard C, Porcher J-M, Bony S, Devaux A, Sanchez W, 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.
- Seguin A, Caplat C, Serpentine A, Lebel J-M, Menet-Nedelec F, Costil K, 2016. Metal bioaccumulation and physiological condition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) reared in two shellfish basins and a marina in Normandy (northwest France). *Marine Pollution Bulletin*, 106: 202-214.
- Singh N P, McCoy M T, Tice R R, Schneider E L, 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA Damage in Individual Cells. *Experimental Cell Research*, 175: 184–191.
- Tran T K A, Yu R M K, Islam R, Nguyen T H T, Bui T L H, Kong R Y C, O'Connor W A, Leusch F D L, Andrew-Priestley M, MacFarlane G R, 2019. The utility of vitellogenin as a biomarker of estrogenic endocrine disrupting chemicals in molluscs. *Environmental Pollution*, 248 :1067-1078.
- Tryphonas H, Fournier M, Blakley B R, Smits J, Brousseau P, 2005. Bivalves as Models for Marine Immunotoxicology. *Investigative Immunotoxicology*. January 27, 2005.
- Verween A, Vincx M, Degraer S, 2009. Seasonal variation in gameto-genesis and spawning of *Mytilopsis leucophaeata*, an invasive bivalve in Europe. *Journal of Molluscan Studies*, 75: 307-310.
- Vethaak D, Van Der Meer J, 1991. Fish Disease Monitoring in the Dutch Part of the North Sea in Relation to the Dumping of Waste from Titanium Dioxide Production. *Chemistry and Ecology* 5: 149–70.
- Vindelø, L L, Christensen I J, 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.
- Vos J, Van Loveren H, Wester P, Vethaak D, 1989. Toxic Effects of Environmental Chemicals on the Immune System. *Trends in Pharmacological Sciences* 10: 289–92.
- Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O, 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field

surveys. *Aquatic Toxicology*, 93: 225-233.

Yutin N, Wolf M, Wolf Y, Koonin E, 2009. The Origins of Phagocytosis and Eukaryogenesis. *Biology Direct* 4 (February): 9.

Zelikoff J T, Raymond A, Carlson E, Li Y, Beaman J R, Anderson M, 2000. Biomarkers of Immunotoxicity in Fish: From the Lab to the Ocean. *Toxicology Letters* 112–113: 325–31.