

THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

ECOLE DOCTORALE N°598
Sciences de la Mer et du Littoral
Spécialité : *Biologie Marine*

Par

Jennifer LAURENT

Ecologie du stress et qualité écologique de l'estuaire de Seine et des fleuves côtiers bretons : signatures environnementales et moléculaires chez une espèce sentinelle, le Flet (*Platichthys flesus*)

Thèse présentée et soutenue à Brest, le 12 décembre 2023
Unité de recherche : Lemar UMR 6539

Rapporteurs avant soutenance :

Frank LE FOLL
Béatrice GAGNAIRE

Professeur – Université Le Havre Normandie
Chercheuse HDR – IRSN

Composition du Jury :

Président : Karine PICHAVANT

Professeure – Université de Bretagne Occidentale

Examineurs : Frank LE FOLL
Béatrice GAGNAIRE
Sylvie GOBERT

Professeur – Université Le Havre Normandie
Chercheuse HDR – IRSN
Professeure – Université de Liège

Dir. de thèse : Vianney PICHEREAU

Professeur – Lemar, IUEM, UBO

Invité(s)

Jean LAROCHE
Stéphane LE FLOCH

Professeur émérite – Lemar, IUEM, UBO
Chercheur & Chef du Service Recherche – CEDRE

Université de Bretagne Occidentale
Institut Universitaire et Européen de la Mer
Laboratoire des Sciences de l'Environnement Marin
Ecole Doctorale des Sciences de la Mer

**Ecologie du stress et qualité écologique de l'estuaire de Seine
et des fleuves côtiers bretons :
signatures environnementales et moléculaires chez une
espèce sentinelle, le Flet (*Platichthys flesus*)**

Manuscrit de Jennifer LAURENT

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (Ph.D)
en Biologie Marine

Membres du Jury

Frank Le Foll, Professeur – Université Le Havre Normandie	<i>Rapporteur</i>
Béatrice Gagnaire, Chercheuse – IRSN	<i>Rapporteuse</i>
Sylvie Gobert, Professeure – Université de Liège	<i>Examinatrice</i>
Karine Pichavant, Professeure – Université de Bretagne Occidentale	<i>Examinatrice</i>
Vianney Pichereau, Professeur – Université de Bretagne Occidentale	<i>Directeur de thèse</i>
Stéphane Le Floch, Chercheur & Chef du Service Recherche – CEDRE	<i>Co-encadrant de thèse</i>
Jean Laroche, Professeur émérite – Université de Bretagne Occidentale	<i>Co-encadrant de thèse</i>

Financements et contributions

Les contributions financières du CEDRE,
du Groupement d'Intérêt Public Seine-Aval pour le projet HQ FISH,
de l'Office Français pour la Biodiversité pour le projet POPEST
et de l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne pour le projet ECOEST
ont permis la réalisation de ce travail de thèse.



Remerciements

Avant tout, je souhaite remercier mes **directeurs de thèse** :
Jean Laroche, Vianney Pichereau et Stéphane Le Floch.

Jean,

Merci de m'avoir donné une chance de faire mes preuves.
Tout a débuté avec un simple stage volontaire en L3,
mais c'est grâce à ce stage que tout a commencé.
Après mon Master, vous m'avez fait confiance pour travailler avec vous
et vous m'avez proposé mon premier contrat au Lemar.
Puis, vous avez continué de me faire confiance en me proposant de poursuivre en thèse.
Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté.
Merci pour vos connaissances, vos conseils et vos réflexions.
Merci pour votre pédagogie, votre gentillesse et votre bienveillance.
Je vous remercie aussi pour votre soutien et votre disponibilité sans faille.
Enfin, merci d'avoir fait en sorte que je puisse continuer avec vous après la thèse,
pour boucler les projets que nous avons commencés ensemble.
Et même une fois en éméritat, vous avez continué de veiller sur moi.
Vraiment, merci pour tout.

Vianney,

Merci d'avoir pris le relais après Jean,
et de m'avoir permis de continuer en thèse après mon premier contrat au labo.
Je te remercie pour les heures passées sur la protéomique,
à m'expliquer comment traiter et interpréter les données, et à me relire.
A toi aussi, merci pour tes connaissances, tes conseils et ta pédagogie.
Merci aussi pour ta gentillesse et ta bienveillance.
Merci pour ces trois années.

Stéphane,

Merci pour ton accueil au CEDRE,
et d'avoir fait en sorte que mon séjour, même s'il fut de courte durée,
se passe dans les meilleures conditions.
Je voulais aussi te remercier d'être venu me tenir compagnie les week-ends,
quand je devais m'occuper des petits Flets !

Je souhaite remercier et exprimer ma reconnaissance envers les **membres du jury**,
à savoir **Frank Le Foll, Béatrice Gagnaire, Sylvie Gobert et Karine Pichavant.**
Merci pour votre intérêt à l'égard de mon sujet de recherche
et pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.



Ce travail de thèse a été mené à bien grâce à la participation des **collectivités locales** et des **gestionnaires de l'eau**, merci pour votre collaboration, vos connaissances du terrain et votre aide le jour des échantillonnages.

le SAGE Léon -Trégor,

merci à **Jocelyn Hiliou, Guy Pennec et Myriam Launay.**

le SAGE Bas Léon,

merci à **Mélanie Baric, Clément Lejeune, Anaïs Vannieuwenhuysse et Valérie Horyniecki.**

Le Syndicat Mixte de l'Horn,

merci à **Valérie Morvan-Rouxel, Armel Gentien et Youen Olivier.**

L'EPAGA Aulne,

merci à **Xavier Badé, Nora Abote, Lauriane Rioual, Jean-René Tanguy et Sylvestre Boichard.**

le SAGE Sud Cornouaille,

merci à **Mélanie Branellec et Pascal Nicol.**

le SAGE Scorff,

merci à **Anne Claire Lombard et Thomas Guyot.**

le SAGE Pays de Saint Brieuc,

merci à **Franck Jubert.**

les AAPPMA de Morlaix et St Pol de Léon,

merci à **Philippe Bras et Michel Thouvenot.**

la Fédération de Pêche du Finistère,

merci à **Pierre Péron.**

la Réserve Naturelle des Marais de Séné,

merci à **Guillaume Gélinaud.**

la Réserve Naturelle de la Baie de St Brieuc,

merci à **Anthony Sturbois et Alain Ponsoero.**

la Station de contrôle des poissons migrateurs - INRAE - Scorff,

merci à **Nicolas Jeannot et Fabien Quendo.**



Merci à tous les **chercheurs**, les **ingénieurs de recherches**, les **ingénieurs d'études** et les **techniciens** qui m'ont permis de mener à bien mon projet de thèse.

Iwan Le Berre, merci pour votre aide dans le développement des nouvelles métriques géographiques, pour l'encadrement des différents stagiaires et pour votre disponibilité.

Je vous remercie aussi pour tous nos échanges enrichissants, et les pistes de réflexion et de discussion, notamment avec les SAGE. J'ai également apprécié que vous vous soyez adapté à mon niveau de novice concernant les méthodologies de géographes. Merci pour votre pédagogie et votre bienveillance !

Jacques Grall, merci pour vos conseils et vos grandes connaissances sur les systèmes estuariens bretons, qui nous ont permis de sélectionner des estuaires variés et pertinents pour notre étude.

Rachid Amara et son équipe, merci pour l'organisation des campagnes de terrain en Seine et en Canche, pour votre contribution aux dissections, et pour votre accueil chaleureux à Wimereux, dans le cadre des projets HQ FISH et LUBRIZOL.

Simon Devin, merci pour votre aide sur les analyses statistiques du projet HQ FISH. Merci pour votre pédagogie et votre disponibilité. J'ai hâte de travailler à nouveau avec vous sur le projet ECOEST.

Jean Armengaud et son équipe, merci pour toutes les données de protéomique que vous avez analysées et traitées tout au long de cette thèse. Merci pour votre disponibilité et votre extrême efficacité !

Jérôme Couteau et son équipe, merci pour votre aide sur le terrain en Seine, pour votre contribution aux dissections et aux analyses, et pour votre accueil au Havre.

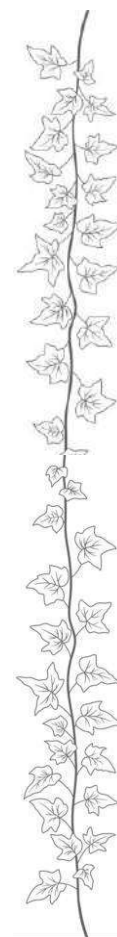
L'équipe de **LipidOcéan**, et plus particulièrement

Fabienne Le Grand, **Antoine Bideau**, **Gwendoline Lefebvre**, **Margaux Mathieu-Resuge**, **Fany Sardenne**, **Philippe Soudant**.

Merci à tous pour votre aide sur les lipides et les acides gras, que ce soit pour les manips, pour l'analyse des résultats et leur interprétation. Je vous remercie pour votre gentillesse, votre patience et votre pédagogie !

Les lipides, c'était tout nouveau pour moi, et comme vous l'avez vu, pas toujours évident !

Matthieu Waeles, merci pour ton aide avec les dosages de métaux. Merci aussi pour le traitement et l'interprétation des données. Je te remercie aussi pour avoir encadré Colleen lors de son stage et pour avoir été de bons conseils pour elle.



Gaël Durand, merci pour votre aide avec les analyses des produits phytosanitaires et pour vos conseils concernant l'expérimentation animale et les cocktails de pesticides.

Karine Salin, Jean-Baptiste Quemeneur & Morgane Danion,
merci à tous les trois pour votre aide pendant l'expérimentation animale.
Merci pour vos idées, vos conseils, vos coups de main et votre temps.

Anthony Starbois, merci pour ton aide sur le terrain
Je te remercie également pour ta participation à nos échanges avec les gestionnaires,
tes idées de réflexion et de discussion.
Merci aussi pour tes conseils en statistiques,
je reviendrai bientôt t'embêter avec de nouvelles questions !

Eric Dabas, merci pour ton aide, ton temps et tes nombreux conseils,
que ce soit pour la sclérochronologie, l'expérimentation animale ou les pêches électriques.
Heureusement que tu étais là !

Edouard Lavergne, à toi aussi, merci d'être venu attraper des poissons avec moi !
Je te remercie aussi pour ton aide et tes connaissances sur le Flet.
Merci pour ton aide sur mon premier article.
Et enfin, merci pour les conseils que tu m'as donné pour préparer mes premiers TP d'écotox.

Jean-Marie Munaron, merci pour l'aide que tu m'as apporté
pour les analyses d'isotopes stables.
Merci pour tes connaissances et tes conseils.

Aurélie Jolivet, merci pour tes connaissances sur les éléments traces dans les otolithes
et pour ton aide sur ce type d'analyses.

Sébastien Artigaud, merci pour ton aide sur la protéomique,
et plus particulièrement pour les extractions des protéines.
Merci d'avoir pris le temps de m'expliquer chaque étape du protocole,
surtout qu'il a fallu que tu te répètes !



Je remercie également tous les stagiaires que j'ai encadrés.

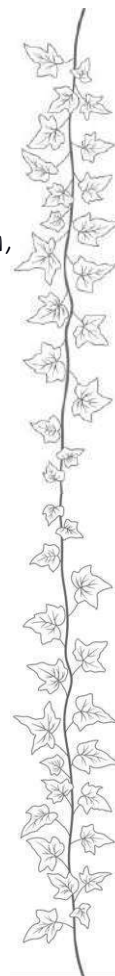
Colleen Guinle, Heliaz Le Bayon,
Manuel Sahuquet, Pénélope Mazari & Nicolas Dauthier,
merci à tous pour votre sérieux, votre implication et pour le travail fourni.
Vous avez tous super bien bossé !
J'espère avoir été une maître de stage correcte, avoir été de bons conseils
et que ce que vous avez pu apprendre vous sera utile pour la suite.

Je remercie aussi tous les membres de l'équipe du Lemar
pour leur accueil depuis mon premier contrat en 2019.

Merci Adeline, Morgan, Nelly et Christophe,
pour votre aide, les conseils, les formations, les commandes...
Merci pour toutes ces petites choses qui font que les manips des thésards se passent bien,
au quotidien !

Je remercie aussi toutes les personnes travaillant au sein des différentes
équipes administratives de l'IUEM, du Lemar et de l'EDSML, et plus particulièrement,

Anne-Sophie, Geneviève, Estelle, Elodie, Elizabeth, Aurélie, Éric, Yannick.
Merci pour votre aide, votre réactivité,
et d'avoir pris le temps de répondre à toutes mes questions.



Je tenais également à remercier toute ma **famille**,
pour leur soutien, leurs conseils et leur patience pendant ces trois ans de thèse,
et encore plus, bien avant la thèse, et encore longtemps après.
Je sais que vous serez toujours là pour moi.

Maman, Papa,

Merci pour tout ce que vous avez fait pour moi (nous 3), depuis toute petite.
Vous m'avez permis de réaliser mon rêve ; travailler en lien avec la mer.
Qui aurait cru qu'une gamine de 7 ans qui veut faire de la biologie marine
en arriverait à soutenir une thèse ?

Vous, apparemment !

(Et encore, à la base je disais vouloir m'arrêter au Master !)

Je n'en serais pas là aujourd'hui sans vous,
si vous ne m'aviez pas poussé à me dépasser et à faire toujours mieux.

Maman, tu as toujours dit qu'en plus d'être une famille, nous sommes une équipe,
une équipe qui se soutient et qui s'entraide,
et tu en es la Capitaine, la meilleure qui soit.

Merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur et mes remises en question,
et d'avoir su me raisonner et me rassurer quand il le fallait.

Papa, Maman, merci pour les allers-retours à la gare, les week-end et les vacances en famille
qui nous réunissent tous malgré la distance (quelle idée de partir à Brest aussi !),
merci pour les semaines de vacances-télétravail à la maison,
d'avoir pris soin de moi et de m'avoir bichonné.

Shirley - aka « She »,

A toi aussi, merci pour ton soutien et ton aide.

Entre sœurs (jumelles de surcroît), ce n'est pas toujours évident (voire explosif),
et pourtant, tu as toujours cru en moi, on a toujours cru l'une en l'autre.

Merci pour tout.

Et plus récemment, merci d'avoir pris le temps de relire et de corriger mon manuscrit,
et je suis VRAIMENT désolée pour les fautes d'orthographe
et les fautes d'accord, décidément les « S » ce n'est pas mon truc !

Peter - aka « Le Gnome »,

Merci de m'avoir coaché lors de la préparation du concours « Ma thèse en 180s ».
J'espère que mon parcours à l'université saura t'orienter dans tes propres études,
que ce soit par mes réussites comme par mes erreurs...

Robin,

Merci pour ton soutien dans ce projet dingue qu'est la thèse !
A toi aussi, merci d'avoir supporté mes sautes d'humeur et mes remises en question,
et merci d'avoir su me rassurer.

Merci de m'avoir permis de décompresser quand j'en avais besoin et
de m'avoir changé les idées quand mon cerveau ne voulait pas décrocher de la thèse.
Merci pour les bons petits plats préparés quand je rentrais après le boulot (danse de la joie),
les soirées restos-ciné et les week-end balade ou à ne rien faire à part regarder des TikTok.

Et même quand tu es loin, tu es toujours là pour moi,
alors merci pour les soirées Visio qui me remontent le moral.
Je t'ai rencontré en route, ma thèse avait déjà bien commencé,
c'était aussi une période professionnellement particulière pour toi,
et pourtant, tu es resté auprès de moi.

Je ne l'oublierai jamais.

Mon équipe s'est agrandie avec toi.



Je voulais aussi remercier tous les **doctorants** qui sont passés par l'IUEM
et le Lemar ces dernières années.

Margot, merci pour ton soutien et ta gentillesse.
Merci d'avoir été à l'écoute pendant ces trois années de thèse.
Je te remercie pour tes conseils,
et pour avoir pris le temps de m'aider à trouver des solutions.
Merci pour tous les bons moments passés avec toi,
pour les pauses café, les pauses Kinder Bueno,
les sorties Burger King, les sorties ciné, ou encore les sorties shopping...
Et pour toutes ces heures passées à papoter !
Heureusement que tu étais là pour moi, une belle amitié est née.

Les Best du Bureau A240,
à savoir **Chirine, Victor & Anthony**.
A vous, mes colocs de bureau,
merci pour les bons moments, les fous rires,
les dégustations de thés, de chocolats et de gâteaux.
Et surtout, merci à tous les trois pour avoir supporté pendant trois ans
toutes mes questions sur R, ce logiciel démoniaque !
Mille merci pour votre aide.

Et tous les autres « **Chameaux** » :

**Amandine, Valentin, Mick, Sauvann, Thomas, Wendy, Sandrine, Rémi, Cambera, Mariana,
Youssef, Adriana, Eline, Anna, Maéva, Mathilde, Mathieu, Ronan, Colin, Guillaume, Flora, Jean,
Justine, Luana, Pierre, Nolwenn, Manon, Laura ...**
Merci pour tous les bons moments passés ensemble,
les pauses café du midi qui s'accompagnaient inévitablement de l'horoscope (#TeamScorpion),
les soirées, les bières au bar, les apéros BLP, les barbecues au Dellec, la bouée,
les Blind tests, les week-end à Crozon ...
Merci à vous tous <3

Merci à tous ceux qui m'ont apporté leur aide tout au long de ma thèse.



*« We need to move beyond guilt or blame,
and get on with the practical tasks at hand »*

de Sir David Attenborough

Liste des figures

Figure 1 : Schéma représentant un hydrosystème, un bassin versant et un estuaire.....	31
Figure 2 : Schéma représentant le fonctionnement écologique d'un estuaire et les principales fonctions qui le composent.....	33
Figure 3 : Illustration des biens et services fournis par l'écosystème estuarien à la société.....	34
Figure 4 : Illustration des impacts anthropiques sur l'écosystème estuarien.....	35
Figure 5 : Schéma représentant la comparaison entre un système sain peu eutrophisé et un système fortement eutrophisé.....	37
Figure 6 : Flet d'Europe ou Flet commun (<i>Platichthys flesus</i>), face dorsale et face ventrale.....	42
Figure 7 : Aire de distribution du Flet européen (<i>P. flesus</i>), du Nord de la Mer Blanche jusqu'au Sud du Portugal, avec quelques populations présentes en Méditerranée.....	43
Figure 8 : Schéma représentant le cycle biologique du Flet européen (<i>P. flesus</i>) le long des côtes Atlantiques françaises ; de la reproduction des adultes en mer au niveau de l'embouchure de l'estuaire, jusqu'à la croissance des juvéniles en partie amont de l'estuaire.....	44
Figure 9 : Schéma présentant les règles d'évaluation de l'état global d'une masse d'eau de transition.....	46
Figure 10 : Schéma représentant le principe de biomarqueur.....	50
Figure 11 : Représentation du processus de synthèse des protéines.....	57
Figure 12 : Représentation de l'approche multi-omique intégrative utilisée chez des animaux modèles aquatiques pour garantir une évaluation fiable des risques environnementaux dans les écosystèmes.....	58
Figure 13 : Localisation des bassins versants des estuaires étudiés ; Canche (Pas-de Calais), Seine (Seine-Maritime), Gouessant (Côtes d'Armor), Penzé, Horn, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine, Aven (Finistère), Scorff, Noyal (Morbihan), et des principales villes (Paris, Le Havre et Brest).....	64
Figure 14 : Carte topographique IGN de l'estuaire de la Canche, des principales villes aux alentours (Etaples et Le Touquet-Paris-Plage) et de la RNN de la Baie de Canche.....	65
Figure 15 : Carte topographique IGN de l'estuaire de la Seine, des principales villes aux alentours (Le Havre et Rouen) et de la RNN de l'Estuaire de Seine.....	66
Figure 16 : Carte topographique IGN de la Baie de Saint-Brieuc, de l'estuaire du Gouessant, des principales villes aux alentours (Saint-Brieuc, Hillion et Morieux) et de la RNN de la Baie de Saint-Brieuc.....	67
Figure 17 : Carte topographique IGN de l'estuaire de la Penzé et des principales villes aux alentours (Saint-Pol-de-Léon et Carantec).....	67
Figure 18 : Carte topographique IGN des estuaires de l'Horn et du Guillec et des principales villes aux alentours (Saint-Pol-de-Léon, Santec, Plougoulm et Cléder).....	68
Figure 19 : Carte topographique IGN des estuaires de la Flèche et du Quillimadec et des principales villes aux alentours (Tréfléz, Kerlouan et Guissény).....	68
Figure 20 : Carte topographique IGN de l'estuaire de l'Aber Wrac'h (et de l'Aber Benoît) et des principales villes aux alentours (Plougerneau, Lannilis, Landéda et St-Pabu).....	69

Figure 21 : Carte topographique IGN de la Douffine, un affluent de l’Aulne, et des principales villes aux alentours (Pont-de-Buis-Lès-Quimerch et Le Faou).....	69
Figure 22 : Carte topographique IGN de l’estuaire de l’Aven (et du Belon) et des principales villes aux alentours (Riec-sur-Belon, Pont-Aven et Tregunc).....	70
Figure 23 : Carte topographique IGN de l’estuaire du Scorff (et la Rade de Lorient) et des principales villes aux alentours (Pont-Scorff, Quéven et Lorient).....	70
Figure 24 : Carte topographique IGN de l’estuaire de Noyal (et le Golfe du Morbihan), des principales villes aux alentours (Theix-Noyal, Séné, Vannes et Aradon) et de la RNN des Marais de Séné.....	71
Figure 25 : Frise chronologique synthétisant l’ensemble des projets, des échantillonnages et des analyses menées au cours de cette étude.....	74
Figure 26 : Résumé graphique de l’article “Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France)”	102
Figure 27 : Résumé graphique de l’article “Relevance of flounder caging and proteomics to explore the impact of an industrial accident caused by fire on the Seine estuarine water quality: the case of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities”	138
Figure 28 : Résumé graphique de l’article “Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France”	190
Figure 29 : Résumé graphique de l’article “Environmental signatures and fish proteomics: a multidisciplinary integration to assess the ecological quality of estuaries in French agricultural watersheds”	208
Figure 30 : Schéma représentant l’agencement des lipides en milieux aqueux	249
Figure 31 : Schéma représentant les acides gras comme des traceurs trophiques ou des "biomarqueurs".....	251
Figure 32 : Schéma représentant les conséquences des perturbations du métabolisme des lipides dans différents organes et tissus	252
Figure 33 : Résumé graphique de l’article “Fatty acids in European flounder muscle: promising tools to assess the impact of eutrophication on estuarine health”	258
Figure 34 : Schéma représentant l’identification de peptides biomarqueurs par protéomique MRM.....	297
Figure 35 : Présentation du Réseau CORPEP en Bretagne et les dosages de pesticides dans l’eau à Station CORPEP de l’Horn à Saint Pol en 2019	301
Figure 36 : Schéma représentant le design de l’expérimentation animale menée en 2022 au CEDRE et le plan de prélèvement des échantillons	302

Liste des acronymes

AChE	Acétylcholinestérase	NQE	Normes de Qualité Environnementale
AG	Acides Gras	OCDD	Octachlorodibenzodioxine
AGS	Acides Gras Saturé	OCP	Pesticides Organochlorés
AGMI	Acides Gras Monoinsaturé	PA	Polyamide
AGPI	Acides Gras Polyinsaturé	PBDE	Poly-Bromo-Diphényl-Ether
AHCY	S-Adénosyl-Homocystéinase	PCB	Polychlorobiphényle
AMPA	Acide Aminométhylphosphonique	PCP	Pentachlorophénol
ARNm	Acide Ribonucléique Messenger	PE	Polyéthylène
BaP	Benzo[a]Pyrène	PeCDF	Pentachlorodibenzofurane
BHMT	Betaine-Homocysteine Methyl-Transferase	PET	Polyester
BV	Bassin versant	PL	Phospholipides
CAT	Catalase	POP	Polluant Organique Persistant
CCO	Cytochrome C Oxydase	PP	Polypropylène
CS	Citrate Synthase	PPAR	Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
CT	Cholestérol	PS	Polystyrène
DCE	Directive Cadre sur l'Eau	PS	Phosphatidylsérine
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane	PU	Polyuréthane
E2	17 β -estradiol	PVC	Polychlorure de Vinyle
EIP	Echantillonneurs intégratifs passifs	RGS	Rapport Gonado Somatique
FBA	Fructose Bisphosphate Aldolase	RHS	Rapport Hépatosomatique
FBPase	Fructose-1,6-Biphosphatase	ROS	Espèces Réactives de l'Oxygène (Reactive Oxygen Species)
FCA	Foyers d'Altération Cellulaire	RNN	Réserve Naturelle Nationale
FNR	Foyers de Nécrose ou de Régénération	SAGE	Syndicats d'Aménagement et de Gestion des Eaux
FS	Stérols Libres (Free Sterols)	SBR	Caoutchouc Styrène Butadiène
G6PDH	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase	SOD	Superoxyde Dismutase
GNMT	Glycine N-Méthyl Transférase	SPG	Sphingomyéline
GPX	Glutathion Peroxydase	STEP	Station d'épuration
GSH	Glutathion	TAC	Capacité antioxydante totale
GST	Glutathion S-Transférase	TAG	Triglycérides
HAP	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques	TBT	Tributylétain
HCB	Hexachlorobenzène	TCDF	Tétrachlorodibenzofurane
HCH	Hexachlorocyclohexane	TG	Triglycérides
HPCDD	Heptachlorodibenzo-P-Dioxine	UDPGT	UDP-glucuronyl-transférase
HXCDF	Hexachlorodibenzofurane	VMO-I	Vitelline Membrane Outer Layer Protein 1 Homolog
INRAe	Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement	VTG	Vitellogénine
K	Indice de Condition		
LDH	Lactate Déshydrogénase		
MDA	Malondialdéhyde		
MDH	Malate Déshydrogénase		
MES	Matière en suspension		
MFO	Mixte Function Oxydase ou Oxydase à Fonction Mixte		
MRM	Multiple Reaction Monitoring		
MT	Métallothionéine		

Publications scientifiques

Articles publiés

Laurent, J., Lavergne, E., Couteau, J., le Floch, S., Ouddane, B., Cachot, J., Davail, B., Clérandeau, C., Devin, S., Fisson, C., Devaux, A., Amara, R., Diop, M., Pichereau, V., & Laroche, J. (2022). Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(39), 59751–59769. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20000-y>

Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Kailasam, S., Couteau, J., Waeles, M., Le Floch, S., Laroche, J., & Pichereau, V. (2023). Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France. *Science of The Total Environment*, 878, 163195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163195>

Article soumis

Laurent, J., Diop, M., Amara, R., Fisson, C., Armengaud, J., Labadie, P., Budzinski, H., Couteau, J., Maillet, G., Le Floch, S., Laroche, J., & Pichereau, V. (2024a). Relevance of flounder caging and proteomics to explore the impact of an industrial accident caused by fire on the Seine estuarine water quality: the case of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities. *Marine Pollution Bulletin*

Articles en préparation

Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Waeles, M., S., Le Floch, S., Laroche, J. & Pichereau, V. (2024b). Environmental signatures and fish proteomics: a multidisciplinary integration to assess the ecological quality of estuaries in French agricultural watersheds. (En préparation – Environmental Pollution)

Laurent, J., Le Grand, F., Bideau, A., Le Berre, I., Le Floch, S., Pichereau, V., Laroche, J. (2024c). Fatty acids in European flounder muscle: promising tools to assess the impact of eutrophication on estuarine health. (En préparation – Ecological Indicators)

Communications scientifiques

Laurent J., Pichereau V., Laroche J. Étude de l'impact d'un accident industriel sur la qualité des eaux estuariennes de la Seine : pertinence de l'encagement des Flets et de la protéomique suite à l'incendie des installations de Lubrizol et NORMANDIE-Logistique. Journées plénières du GDR en Ecotoxicologie Aquatique, 5-7 Décembre 2023. Metz.

Laurent J., Pichereau V., Laroche J. Ecologie du stress en milieu estuarien : Intérêt du couplage : géographie des bassins versants - chimie des polluants - biologie du flet. Journées plénières du GDR EA, 15-17 novembre 2022. Nantes.

Laurent J., Le Berre I., Armengaud J., Le Floch S., Laroche J., Pichereau V. "A multidisciplinary approach to assess the ecological quality of estuaries, coupling geography of river basins, hydrobiology, chemistry of pollutants, and European flounder biology". Symposium of the Estuarine and Coastal Science Association, ECSA 59: Using the best scientific knowledge for the sustainable management of estuaries and coastal seas. September, 5-8, 2022. San Sebastian.

Laurent J., Pichereau V., Laroche J. Approche multidisciplinaire pour évaluer la qualité écologique des estuaires (usage des sols, hydrobiologie, chimie des polluants, protéo-génomique du flet). Journées plénières du GDR en Ecotoxicologie Aquatique, 23-24 Novembre 2021, Rennes.

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

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

Table des matières

Financements et contributions.....	5
Remerciements.....	7
Liste des figures	17
Liste des acronymes.....	19
Publications scientifiques.....	21
Communications scientifiques	22
Table des matières.....	23
INTRODUCTION.....	29
1. Diversité dans les hydrosystèmes (du bassin versant à l'estuaire) et facteurs de forçage.....	31
1.1. Hydrosystème, bassin versant et estuaire.....	31
1.2. Pressions anthropiques directes sur les hydrosystèmes (stresseurs endogènes)	34
1.3. Pressions climatiques sur les hydrosystèmes (stresseurs exogènes)	36
1.4. Hétérogénéité des estuaires et diversité des altérations liées à la taille des systèmes estuariens.....	38
1.5. Stresseurs multiples (ou Multistress) à l'exutoire du bassin versant : impact sur les espèces estuariennes	39
2. Une espèce modèle de poisson plat : le Flet Européen (<i>Platichthys flesus</i>).....	42
2.1. Présentation de l'espèce modèle <i>P. flesus</i>	42
2.2. Aire de distribution et cycle biologique de <i>P. flesus</i>	43
2.3. <i>P. flesus</i> , une espèce sentinelle estuarienne d'intérêt majeur	45
3. Signatures environnementales mesurées dans les estuaires et sur <i>P. flesus</i>.....	47
3.1. Indicateurs de l'état environnemental des estuaires (état de l'art).....	47
3.2. Traits d'histoire de vie chez <i>P. flesus</i> en réponse au multistress dans les estuaires (état de l'art)	48
3.3. Biomarqueurs chez <i>P. flesus</i> en réponse au multistress dans les estuaires (état de l'art)	49
3.4. Autres signatures chez <i>P. flesus</i> en réponse au multistress dans les estuaires (état de l'art)	54
4. Approches moléculaires basées sur les analyses -omiques sur <i>P. flesus</i>.....	57
4.1. Approches moléculaires basées sur la transcriptomique et la protéomique	57
4.2. Réponses moléculaires de <i>P. flesus</i> aux multistress dans les estuaires européens (état de l'art).....	59
5. Ecologie du stress et diagnostic écologique des systèmes estuariens.....	62
5.1. Bon état écologique des écosystèmes, écotoxicologie, écologie du stress et biosurveillance	62
5.2. Diagnostic de l'état écologique et paradoxe de la qualité écologique des systèmes estuariens	63
5.3. Systèmes estuariens retenus dans cette étude	64
6. Organisation et objectifs de l'étude.....	72
7. Références.....	75

CHAPITRE I : Évaluation de la qualité écologique d'un grand estuaire Européen : la Seine	93
1. Introduction	95
2. Résultats & Discussion	98
3. Conclusion	101
4. Article	102
5. Références	122
CHAPITRE II : Impact d'une pollution accidentelle sur la qualité de l'eau d'un grand estuaire Européen : la Seine	129
1. Introduction	131
2. Résultats & Discussion	134
3. Conclusion	137
4. Article	138
5. Références	171
CHAPITRE III : Évaluation de la qualité écologique des petits estuaires bretons	175
1. Introduction	177
1.1. Les petits systèmes estuariens	177
1.2. Présentation du projet OFB - POPEST	178
1.3. Présentation du projet AELB - ECOEST	179
2. Résultats & Discussion	180
2.1. Première approche afin d'évaluer la qualité écologique des petits estuaires bretons : couplage des signatures environnementales et des réponses moléculaires chez le Flet	180
2.2. Optimisation des méthodes développées pour évaluer la qualité écologique des petits estuaires bretons : couplage des signatures environnementales et des réponses moléculaires chez le Flet.....	184
3. Conclusion	189
4. Articles	190
4.1. Intégration des signatures environnementales et des approches omiques sur le Flet pour aider à l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes estuariens en Bretagne.....	190
4.2. Signatures environnementales et protéomiques chez les poissons : intégration multidisciplinaire pour évaluer la qualité écologique des estuaires à l'embouchure de bassins versants agricoles.....	208
5. Références	241

CHAPITRE IV : Évaluation de la qualité de l'eau dans les petits systèmes estuariens : la composition en acides gras du poisson, un outil prometteur.....	247
1. Introduction	249
1.1. Lipides et acides gras : caractéristiques principales	249
1.2. Lipides et acides gras : biomarqueurs trophiques et physiologiques (état de l'art)	250
2. Résultats & Discussion	254
3. Conclusion	257
4. Article	258
5. Références.....	283
DISCUSSION GENERALE & PERSPECTIVES	289
1. Discussion générale	291
1.1. Pertinence et limites de l'approche multi-biomarqueurs sur le Flet adulte en Seine	291
1.2. Apports des outils moléculaires –omiques sur le Flet pour la biosurveillance en Seine et dans les petits estuaires bretons.....	292
<i>Protéomique et caging : biosurveillance active en Seine lors d'une pollution accidentelle</i>	<i>292</i>
<i>Protéomique et transcriptomique : biosurveillance passive dans les petits estuaires bretons.....</i>	<i>293</i>
1.3. Intérêt de l'approche multi-estuaires et multidisciplinaire pour le diagnostic écologique des petits estuaires bretons	294
2. Perspectives	295
2.1. Perspectives pour la biosurveillance passive et active en Seine	295
<i>Développement de biomarqueurs d'exposition à des contaminants émergents chez le Flet</i>	<i>295</i>
<i>Méthodologie pour évaluer la capacité de résistance des flets juvéniles face au changement climatique en estuaire de Seine</i>	<i>296</i>
<i>Amélioration du protocole de caging en cas de pollution accidentelle</i>	<i>296</i>
2.2. Perspectives pour la biosurveillance passive sur les petits estuaires	297
2.3. Approfondissement de l'approche multidisciplinaire intégrative dans les petits estuaires	298
<i>Propositions pour améliorer l'identification des stressors dans les petits hydrosystèmes</i>	<i>298</i>
<i>Propositions pour la mise en place d'une étude bi-taxa dans les fleuves côtiers bretons</i>	<i>299</i>
<i>Proposition pour étendre l'approche intégrée à des hydrosystèmes de tailles intermédiaires</i>	<i>300</i>
2.4. Développement d'une analyse statistique multivariée sur l'ensemble du jeu de données	300
2.5. Développement de l'approche protéomique dans le cadre d'une contamination expérimentale du Flet par un cocktail de pesticides	301
3. Conclusion	303
4. Références.....	304
RESUME	312

INTRODUCTION

Cette première partie du manuscrit constitue un **état de l'art** permettant d'introduire les notions principales de ce travail de thèse, à savoir ; les hydrosystèmes, le modèle biologique, les marqueurs étudiés à différentes échelles (transcriptomique, protéomique, biochimique et traits d'histoire de vie) et enfin, le diagnostic de l'état de santé des estuaires.

1. Diversité dans les hydrosystèmes (du bassin versant à l'estuaire) et facteurs de forçage

1.1. Hydrosystème, bassin versant et estuaire

Un **hydrosystème** est un écosystème formé par le réseau hydrographique d'un cours d'eau ; il intègre donc l'ensemble des eaux superficielles et souterraines, et leurs interactions.

Dans le cadre de cette étude, nous nous sommes concentrés sur les bassins versants et les estuaires.

Un **bassin versant** (Figure 1) définit la zone de collecte des eaux de surface par un cours d'eau et ses affluents. En amont, le bassin versant est délimité par une ligne de partage des eaux où les eaux de pluies s'écoulent en emportant avec elles les éléments dissous ou en suspension (sédiments et polluants). En aval, le bassin versant est limité par l'exutoire, dans le cas présent l'estuaire.

Un **estuaire** correspond donc à l'embouchure d'un cours d'eau se jetant dans la mer, où les eaux douces se mélangent avec les eaux marines, formant les eaux de transition. L'estuaire constitue ainsi un *continuum* aquatique dynamique reliant l'environnement terrestre au plateau continental et à l'océan (Elliott *et al.*, 2015).

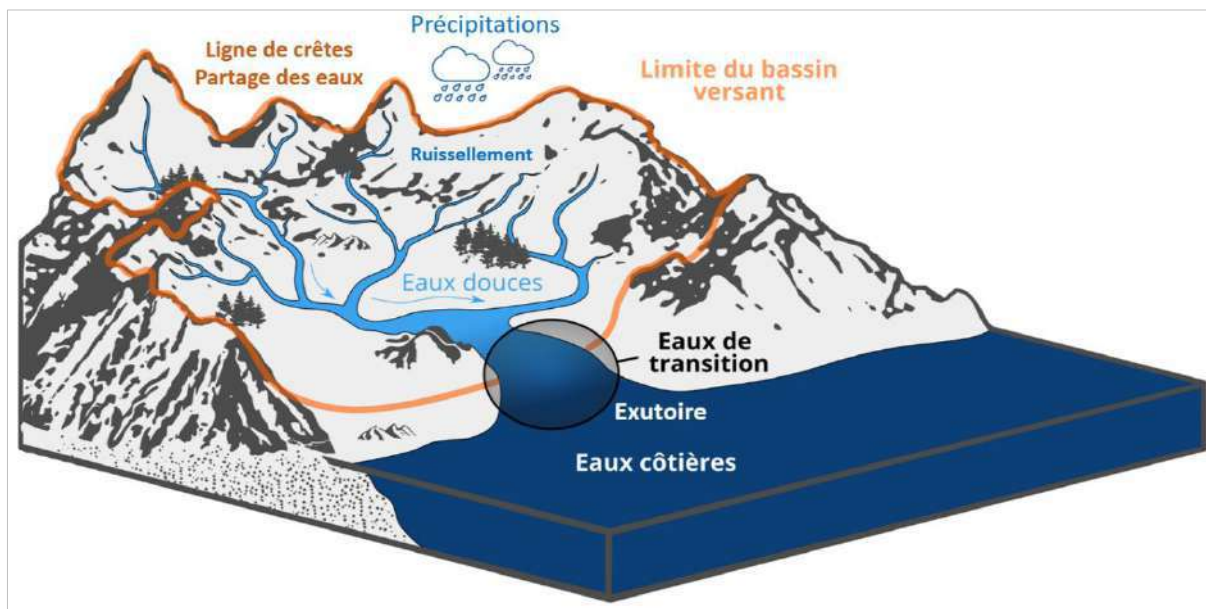


Figure 1. Schéma représentant un hydrosystème, un bassin versant et un estuaire.
© Office International de l'Eau (OIEau), 2017 (Attribution 3.0 France (CC BY 3.0 FR)).

Les eaux estuariennes subissent quotidiennement de fortes variations de température, de salinité, de turbidité, de gaz dissous ou de nutriments (Seitzinger *et al.*, 2010 ; McLusky & Elliott, 2004). A l'intérieur des écosystèmes estuariens circulent l'énergie, la matière et les organismes (Hyndes *et al.*, 2014). Les estuaires ont une **fonction biogéochimique** majeure (Figure 2). Les concentrations

élevées de particules en suspension dans les eaux de transition induisent des interactions avec d'autres solutés, tels que les métaux (Zhang *et al.*, 2008 ; Hatje *et al.*, 2003 ; Turner & Millward, 2000) ou les polluants organiques (Shang *et al.*, 2015 ; Darwano *et al.*, 2014). Les particules en suspension peuvent aussi interagir avec les nutriments (différentes formes d'azote et de phosphore) présents dans l'eau (Fitzsimons *et al.*, 2011). La richesse en nutriments au sein des estuaires est à la base d'une forte productivité primaire sous la forme de phytoplancton, de microphytobenthos et de macroalgues. Les variations saisonnières et interannuelles de la productivité primaire impactent la productivité secondaire, générée par les herbivores, les détritivores et les carnivores (Livingstone *et al.*, 2007). Les concentrations en plancton en suspension ont un impact direct sur la forme et les teneurs en éléments nutritifs dans les estuaires (Paerl, 2012 ; Eyre, 2000). Les particules en suspension peuvent également atténuer la lumière entrante (Fall, 2020), modifiant, voire inhibant la productivité primaire.

Ces processus biogéochimiques peuvent être influencés par le **fonctionnement hydro-morpho-sédimentaire** (Figure 2) de l'estuaire (Dyer, 1995).

L'**hydrodynamisme** en zone estuarienne englobe les apports d'eau douce (débit fluvial), les apports d'eau salée (courants de marée) et la circulation entre ces masses d'eau. Les conditions hydrodynamiques agissent sur le temps de résidence des particules et les échanges à l'interface entre les fonds, la colonne d'eau et les organismes (Statham *et al.*, 2012).

La **morphologie** du système peut également impacter l'hydrodynamisme. La taille, la profondeur et la géométrie de l'embouchure de l'estuaire modifient les niveaux d'eau, les courants de marée, l'action des vagues et le transport sédimentaire (Pye & Blott, 2014). La morphologie de la zone estuarienne, combinée à l'hydrodynamisme, peut aussi conduire à une stratification verticale plus ou moins marquée. Les particules sédimentaires, transportées depuis la rivière ou la mer, forment des flux de sédiments en suspension qui vont par la suite engendrer des dépôts sédimentaires. Ces dépôts sont contrôlés par la vitesse des courants et la granulométrie des sédiments.

La vitesse de **sédimentation** peut également être influencée par l'agrégation et la floculation des particules. Les éléments en suspension ont tendance à s'agréger en présence de sels marins, de microalgues et de débris organiques. Les eaux estuariennes ont donc tendance à être très turbides (McLusky & Elliott, 2004).

Les **flux** et le **stockage** du carbone, du silicium, du phosphore, de l'azote et des contaminants sont donc modulés par les caractéristiques hydro-morpho-sédimentaires de l'estuaire (Hyndes *et al.*, 2014 ; Statham *et al.*, 2012). L'association unique de ces facteurs physiques, chimiques et biologiques va fortement structurer les habitats estuariens (McLusky & Elliott, 2004).

Enfin, les écosystèmes estuariens sont des **zones de soutien aux cycles de vie** de nombreuses espèces animales (Figure 2). En effet, les estuaires sont des zones de migration, de reproduction, de croissance et de survie d'espèces marines ou amphihalines. Les estuaires sont donc des zones qualifiées de **nourriceries** pour de nombreuses espèces animales (Beck *et al.*, 2001). La fonction de nourricerie est déterminée par la variabilité environnementale, l'hydrodynamisme, le couplage trophique, les mouvements ontogénétiques et les corridors d'habitats (Litvin *et al.*, 2018). Les estuaires sont ainsi essentiels aux cycles de vie d'espèces de plancton, d'invertébrés (annélides, crustacés, crevettes), de téléostéens, de chondrichthyens, de mammifères ou d'oiseaux.

Chez les **poissons anadromes** (Saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*), Grande alose (*Alosa alosa*), Lamproie fluviatile (*Lampetra fluviatilis*), etc.), les individus sexuellement matures migrent du milieu marin vers les eaux de transition, puis vers les eaux douces, pour se reproduire (Lochet *et al.*, 2008 ; Kelly & King, 2001 ; Hansen & Quinn, 1998).

A l'inverse, les **poissons catadromes** (Flet européen (*Platichthys flesus*), Anguille d'Europe (*Anguilla anguilla*) et Mulet-porc (*Chelon ramada*)) fréquentent les estuaires aux stades juvéniles, car les estuaires présentent des conditions particulièrement propices pour assurer leur croissance (refuges et nourriture). Les poissons catadromes se reproduiront ensuite à l'embouchure des estuaires ou en mer à l'état adulte (Van Ginneken & Maes, 2005 ; Summers, 1979).

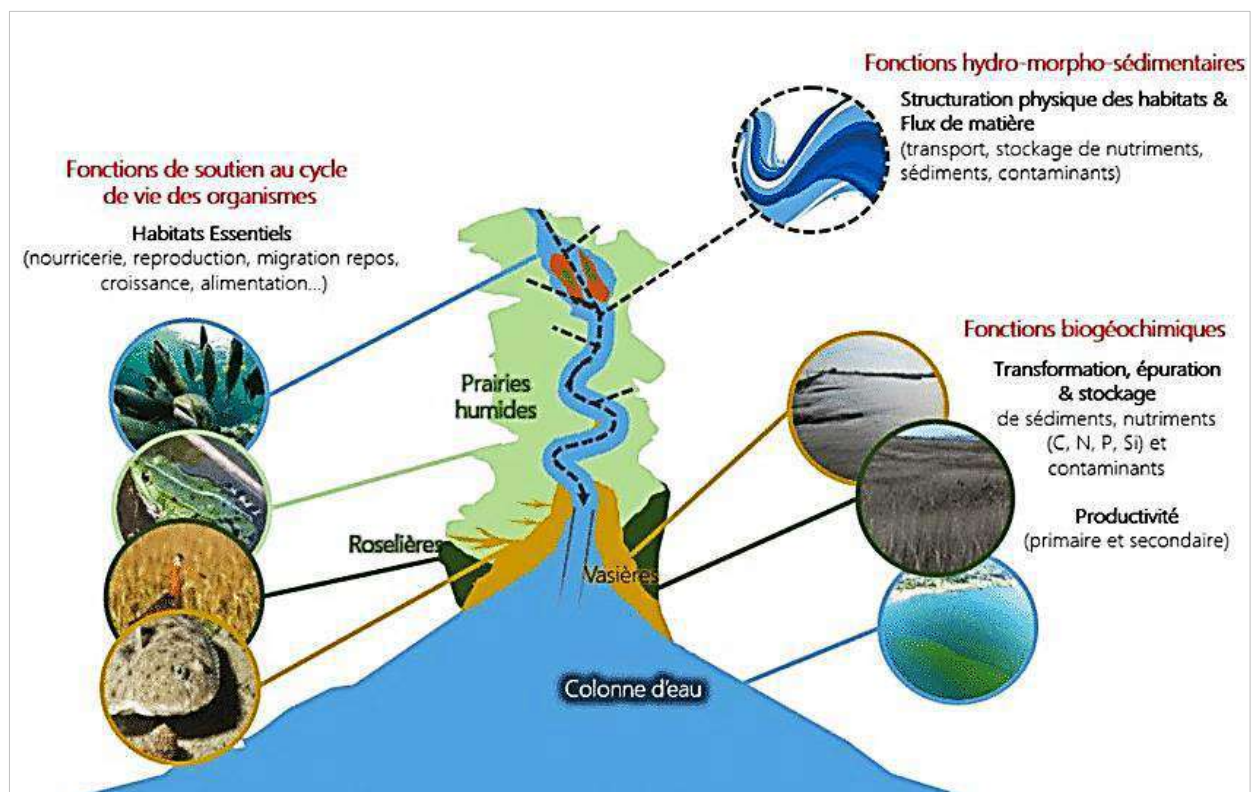


Figure 2. Schéma représentant le fonctionnement écologique d'un estuaire et les principales fonctions qui le composent. © Figure extraite de Muntoni (2020)

Notons de plus, que des espèces marines d'**intérêt halieutique** majeur (Bar commun (*Dicentrarchus labrax*), Sole commune (*Solea solea*), Plie commune (*Pleuronectes platessa*), Turbot commun (*Scophthalmus maximus*) etc.) peuvent aussi trouver, dans les panaches estuariens, des conditions très propices au développement de leurs stades juvéniles (Nagelkerken *et al.*, 2015). Les habitats estuariens participent donc très activement au **recrutement** et à l'exportation des poissons juvéniles d'origine marine (Ramos *et al.*, 2010 ; Martinho *et al.*, 2007).

Les estuaires sont considérés comme l'un des habitats naturels les plus productifs et sont donc d'un **intérêt écologique majeur**. Les écosystèmes estuariens assurent une multitude de **services écosystémiques** (Figure 3), mais ils sont aussi le siège de nombreuses activités anthropiques qui génèrent diverses **pressions directes** (endogènes) et **indirectes** (exogènes), pouvant lourdement impacter ces écosystèmes (Raimonet & Cloern, 2017 ; Elliott, 2011).

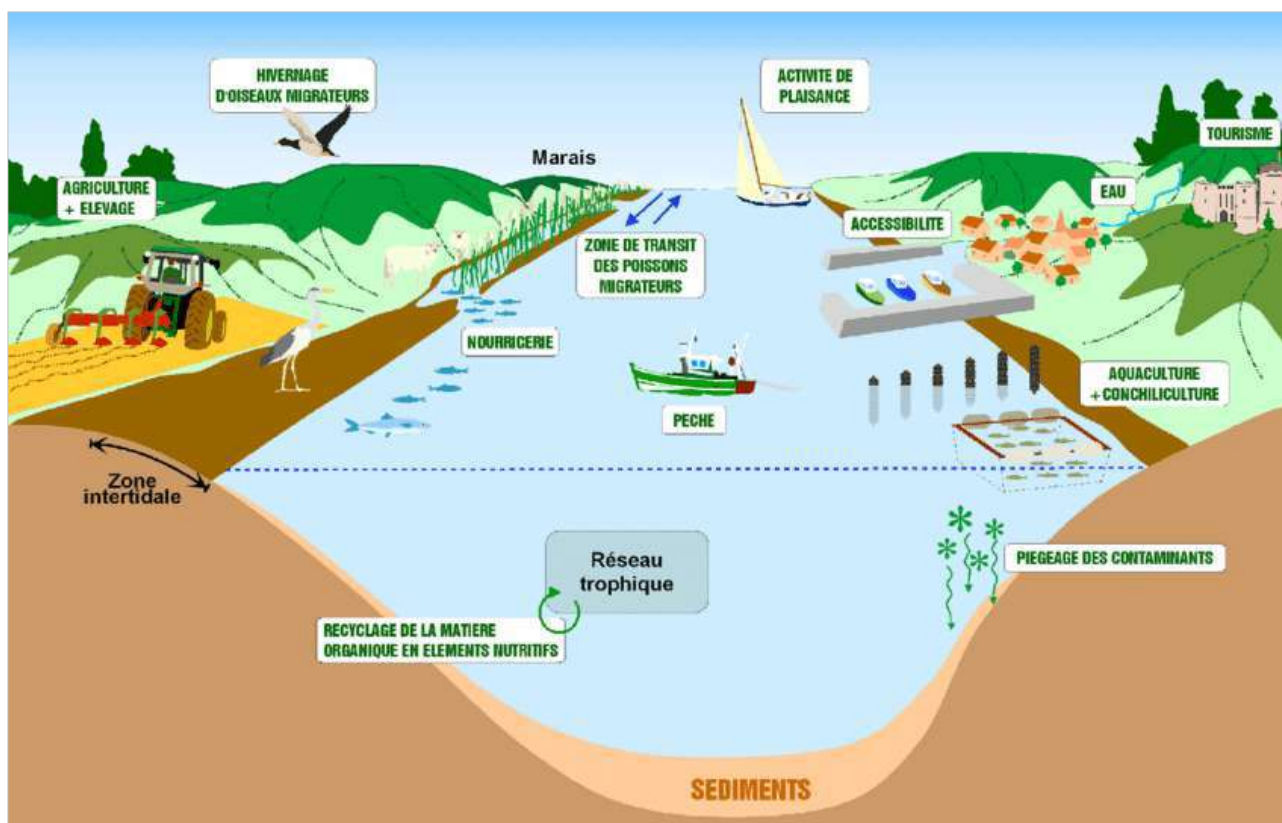


Figure 3. Illustration des biens et services fournis par l'écosystème estuarien à la société.

© Figure extraite de Nicolas (2010), réalisée par Philippe Camoin

1.2. Pressions anthropiques directes sur les hydrosystèmes (stresseurs endogènes)

Nous allons tout d'abord rappeler ici la notion de **stresseur** en écologie aquatique, qui correspond à tout facteur environnemental (dégradation de l'habitat physique, polluants, élévation anormale de la température de l'eau, eutrophisation, hypoxie...) qui conduit chez les organismes exposés à une altération possible de leur physiologie et à une baisse de leur fitness.

Les estuaires sont des écosystèmes particulièrement vulnérables de par la multiplicité des pressions anthropiques directes qui peuvent y interagir. Les écosystèmes estuariens sont ainsi exposés à des **stresseurs endogènes locaux** qui peuvent être plus ou moins contrôlés (Elliott, 2011). Ces stresseurs sont liés à la démographie, à l'urbanisation, à l'industrie ou à l'agriculture. Les stresseurs endogènes peuvent être divisés en deux sous-catégories ; les éléments introduits dans le système (polluants, infrastructures telles que les ports, bâtiments et ponts...) et les éléments retirés du système tels les ressources physiques (agrégats) et biologiques (pêcheries) (Elliott, 2011).

Les estuaires, où prennent place de nombreux enjeux socio-économiques, sont particulièrement impactés par les **pressions anthropiques** (Figure 4) et sont donc fréquemment soumis à des **stresseurs multiples** (Ellis *et al.*, 2015). En effet, l'ensemble des activités humaines réalisées à proximité ou dans les estuaires entraînent des altérations anthropiques directes sur les habitats estuariens, ainsi que de nombreux rejets de contaminants chimiques, aux origines diverses.

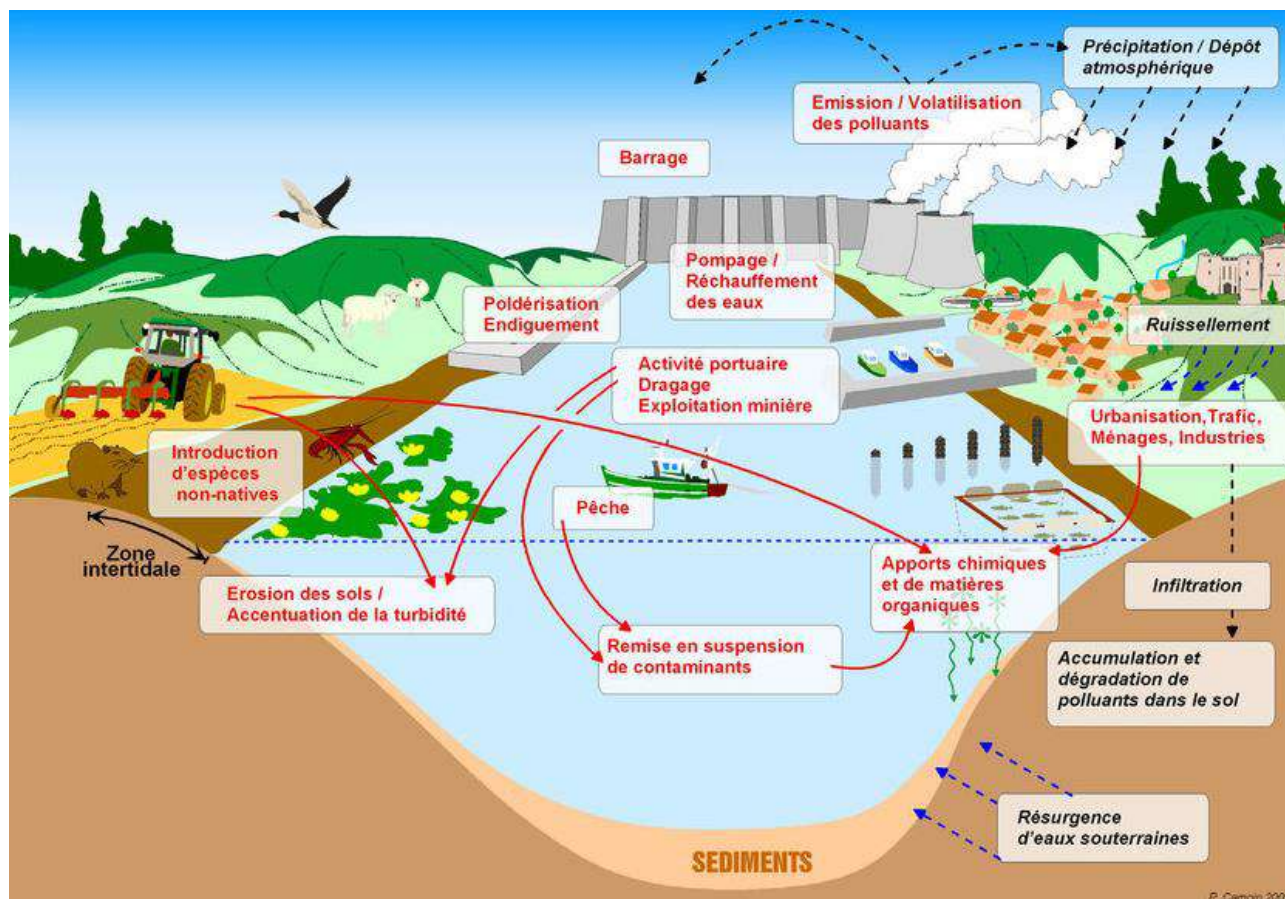


Figure 4. Illustration des impacts anthropiques sur l'écosystème estuarien.

© Figure extraite de Nicolas (2010), réalisée par Philippe Camoin

L'installation de ces nombreuses activités humaines en zone estuarienne se traduit souvent par une forte **artificialisation** des écosystèmes côtiers (Figure 4) (remodelage des côtes, dragages, digues, pertes d'habitats intertidaux, modifications hydrauliques). Les estuaires constituent des voies de transition majeures pour de nombreuses marchandises à l'échelle planétaire. Le transport de marchandises a conduit à la création d'importantes voies de navigation avec une chenalisation très forte des grands estuaires, accompagnée par la construction d'épis pour empêcher la sédimentation (Reise, 2005).

Les **rejets domestiques** (Figure 4) et les effluents urbains représentent une source de contamination considérable des hydrosystèmes. En effet, les effluents des stations d'épuration (STEP) peuvent contenir différents polluants organiques et inorganiques, peu éliminables par le traitement des eaux. Parmi ces polluants, différentes études ont mis en évidence la présence de produits pharmaceutiques (Lajeunesse *et al.*, 2012 ; Vieno *et al.*, 2005), de perturbateurs endocriniens (Chen *et al.*, 2006), de métaux (Birch *et al.*, 2015), d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) (Pérez *et al.*, 2011), de poly-bromo-diphényl-éther (PBDE) et autres retardateurs de flammes (Deng *et al.*, 2015).

Les **rejets industriels** (Figure 4) constituent également une source importante de pollution par divers métaux (Mokarram *et al.*, 2020). Les analyses sur ces rejets industriels ont aussi mis en évidence la présence de colorants, de pigments, de produits liés à la pétrochimie (Dwivedi *et al.*, 2017), et d'autres familles de polluants organiques (Line *et al.*, 1997). L'ensemble des contaminants métalliques et organiques évoqués sont ainsi fréquemment retrouvés dans les tissus des poissons (Defo *et al.*, 2021).

Les **rejets agricoles** (Figure 4) forment une autre source de contamination, non négligeable, pour la qualité de l'eau (Blanco-Canqui, 2018). Les effluents agricoles sont constitués de nombreux **pesticides**, massivement utilisés dans l'agriculture pour maintenir de hauts rendements dans les cultures (Oerke, 2006). Les **produits phytosanitaires** sont définis comme des substances actives destinées à protéger les végétaux contre tous les organismes nuisibles, à assurer leur conservation, ou encore à détruire les végétaux indésirables (Directive 91/414/CEE, abrogée par le règlement n°1107/2009 du 21/10/09). Les pesticides constituent une menace pour les écosystèmes aquatiques (Anderson *et al.*, 2013).

Les rejets agricoles sont également composés de déchets liés à l'**élevage** (Hooda *et al.*, 2000). Les fortes concentrations en élevage au sein des bassins versants se traduisent par des épandages intensifs des produits de l'excrétion animale générant une eutrophisation des eaux liée à une **surcharge en azote** (Jones *et al.*, 2019). Les élevages induisent également la présence non négligeable de **produits pharmaceutiques** particulièrement utilisés en production animale hors sol (Daughton, 2004).

Les effluents agricoles comportent également du **phosphore**, utilisé comme engrais, lequel contribue à l'eutrophisation des masses d'eau. L'intensification des pratiques agricoles conduit à des ruissellements diffus de phosphore qui participent à la dégradation générale de la qualité de l'eau (Hart *et al.*, 2004).

L'ensemble des polluants liés aux **effluents agricoles** peuvent pénétrer dans les masses d'eau par des sources diffuses et ponctuelles. Les sources de pollution diffuse regroupent le **ruissellement** et l'érosion de surface, la dérive de pulvérisation, la lixiviation, les flux de drainage et le transport atmosphérique (Reichenberger *et al.*, 2007).

1.3. Pressions climatiques sur les hydrosystèmes (stresseurs exogènes)

Les estuaires sont également exposés à des **stresseurs exogènes non gérés** qui émanent de l'extérieur du système. Les pressions exogènes dépendent donc de facteurs externes qui ne peuvent être contrôlés, mais qui doivent être pris en compte pour estimer la qualité écologique d'un système estuarien. Ces pressions se traduisent notamment par des altérations des régimes thermiques, de salinité ou de débit des hydrosystèmes (Elliott, 2011).

Ces pressions exogènes sont principalement liées au **changement climatique global** (Figure 5). Le réchauffement atmosphérique entraîne de fortes variations hydroclimatiques, comme une augmentation significative de la température des eaux côtières, de la concentration en gaz carbonique dissous ou encore une diminution du pH.

De par leur **faible profondeur**, les **estuaires** sont particulièrement soumis aux effets du changement climatique. L'élévation du niveau des océans, associée au changement climatique et à la fonte des glaces, est un phénomène dont il va être très difficile de gérer les causes. Néanmoins, il est possible d'intervenir sur les conséquences de ce phénomène en érigeant des digues, pour limiter l'élévation du niveau de l'eau (Elliott, 2011).

Le changement climatique impacte également la **zone littorale** *via* des modifications de la pluviométrie, des apports en nutriments, de la productivité et du fonctionnement des communautés (Gunderson *et al.*, 2016 ; 2017).

Les effets cumulés du changement climatique et des rejets domestiques, industriels et agricoles ont intensifié l'**eutrophisation** (Figure 5) des eaux estuariennes et côtières. L'eutrophisation, au sein d'un écosystème, peut être défini comme un excès de nutriments dans les eaux qui peut aboutir à une **surproduction primaire** et à de possibles dérèglements tels que la prolifération de macroalgues et de microalgues toxiques. L'eutrophisation peut également aboutir à un **risque hypoxique** dans les estuaires eutrophisés, particulièrement en saison estivale (Rabalais *et al.*, 2010). Un déficit en oxygène dans l'eau à long terme dans les écosystèmes estuariens et côtiers peut conduire à l'apparition de zones mortes (Altieri & Gedan, 2014).

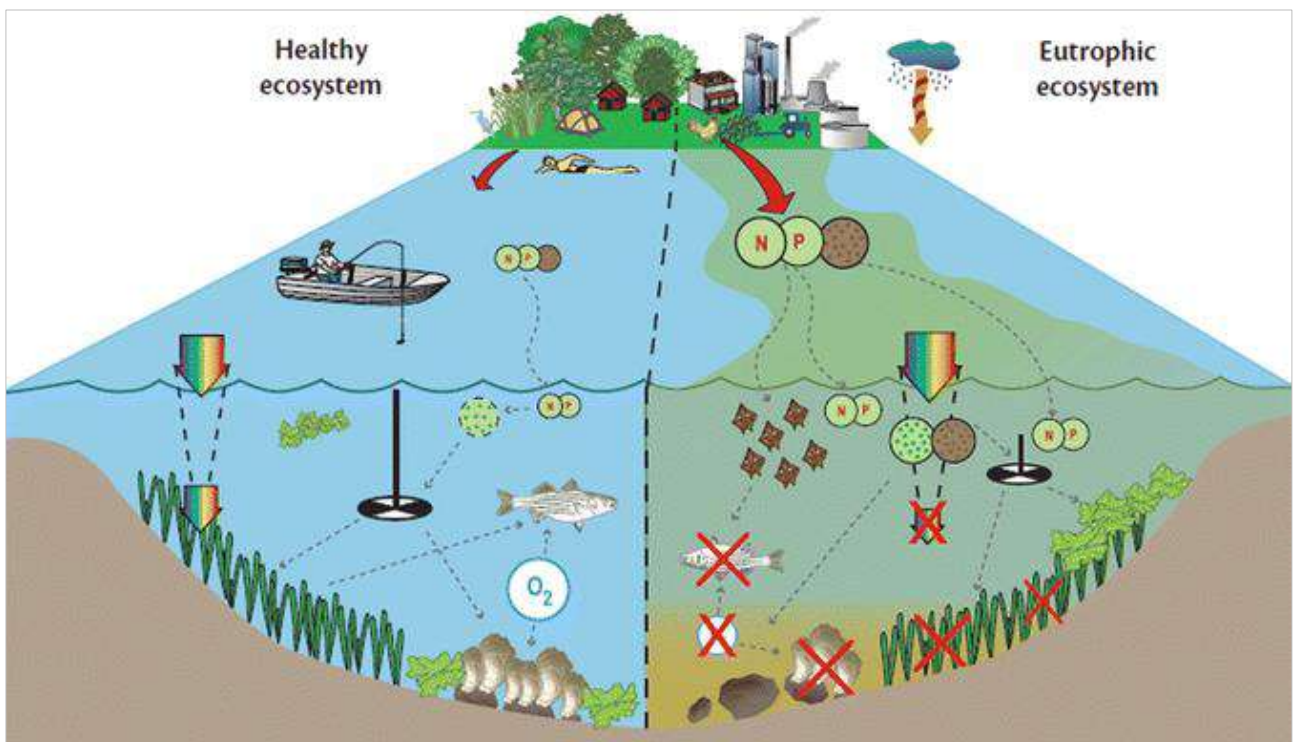


Figure 5. Schéma représentant la comparaison entre un système sain peu eutrophisé et un système fortement eutrophisé. © Figure extraite de Kennicutt (2017), modifié d'après Bricker *et al.* (2007)

Au final, les estuaires sont particulièrement **vulnérables** aux pressions exogènes et endogènes, en tant qu'écosystèmes "ouverts", dont les limites sont mal définies et changeantes (Elliott *et al.*, 2015).

1.4. Hétérogénéité des estuaires et diversité des altérations liées à la taille des systèmes estuariens

Les écosystèmes **hétérogènes** sont composés d'éléments de nature différente, présentant des disparités de structure, de fonction et de répartition, ce qui peut entraîner un manque d'unité.

L'**hétérogénéité spatiale** est définie comme la variation dans l'espace de la distribution d'un motif ou la variation qualitative ou quantitative d'un motif. L'hétérogénéité spatiale peut être liée à l'habitat, aux paramètres physico-chimiques et aux organismes présents. L'hétérogénéité spatiale est d'un intérêt majeur dans l'étude des écosystèmes et des populations (Shaver, 2005).

L'**hétérogénéité temporelle** est définie comme les variations au cours du temps d'un motif. Les variations temporelles comprennent les changements saisonniers, les fluctuations quotidiennes ainsi que les perturbations imprévisibles, plus intermittentes (Lear *et al.*, 2008). L'hétérogénéité temporelle renforce donc l'hétérogénéité spatiale.

Au sein des **bassins versants**, l'hétérogénéité est très prononcée. En effet, ces systèmes montrent une hétérogénéité du réseau hydrographique, de l'hydrologie, de la morphologie et du relief (Troch *et al.*, 2009). Les bassins versants présentent aussi une hétérogénéité au niveau de l'occupation du sol, notamment par rapport aux cultures, aux haies, aux forêts, aux plans d'eau ou encore à l'urbanisation (Teichert *et al.*, 2017). Les activités humaines sont aussi très hétérogènes à l'échelle du bassin versant. Chaque bassin versant est également unique de par sa forme, son orientation et sa taille.

L'hétérogénéité est également marquée au sein des **estuaires**. Les estuaires sont soumis aux effets de la marée, pouvant engendrer une stratification des eaux estuariennes. La rencontre des eaux fluviales et marines peut donc induire des gradients de salinité plus ou moins prononcés tout au long du système (Troch *et al.*, 2009). La turbidité, l'oxygène dissous ou encore les nutriments sont d'autres paramètres qui caractérisent les milieux estuariens (Lear *et al.*, 2008). Ces variables, qui fluctuent dans le temps et l'espace, participent à l'hétérogénéité des estuaires.

Les **estuaires de grande taille** présentent une hétérogénéité environnementale naturelle élevée. En effet, de par leur taille, ils sont soumis à de forts gradients amont-aval abiotiques et biotiques. De plus, dans ces grands systèmes, les dégradations anthropiques directes sur les habitats estuariens liés à l'artificialisation sont bien marquées. Elles peuvent se traduire par des altérations des paramètres hydro-morpho-sédimentaires fortes et très contrastées d'un système à un autre.

Les **estuaires de petite taille** présentent une hétérogénéité environnementale naturelle plus faible car les gradients environnementaux (salinité, bathymétrie et courant) y sont limités, relativement aux grands systèmes (Vasconcelos *et al.*, 2015 ; Elliott, 2011). De la même manière, ils concentrent généralement un nombre de stressseurs réduits par rapport aux grands estuaires. Les altérations anthropiques directes sur les habitats estuariens y étant généralement très limitées.

L'évaluation de la **qualité écologique** des estuaires est donc rendue difficile par l'hétérogénéité intrinsèque des estuaires et par les multiples pressions auxquelles ces écosystèmes doivent faire face.

1.5. Stresseurs multiples (ou Multistress) à l'exutoire du bassin versant : impact sur les espèces estuariennes

Dans la suite de ce manuscrit de thèse nous utiliserons l'abréviation de “**multistress**” pour parler des “**stresseurs multiples**” qui interagissent communément au sein des estuaires.

Les **pressions endogènes et exogènes**, leurs interactions, leurs intensités et leurs fluctuations dans l'espace et dans le temps se concentrent à l'exutoire du bassin versant. Les écosystèmes estuariens sont donc soumis aux effets du changement climatique et aux pressions liées aux activités anthropiques pouvant conduire au **multistress** (Robins *et al.*, 2016).

Le **multistress** au niveau des estuaires s'est intensifié au cours des derniers siècles (Lotze *et al.*, 2006). L'ensemble des facteurs forçage peut entraîner une dégradation de l'habitat physique et une pollution des eaux estuariennes. La qualité écologique des eaux de transition est alors affectée, conduisant à une perte de biodiversité (Elliott, 2011) et impactant les communautés de poissons (Elliott *et al.*, 2015 ; Teichert *et al.*, 2017).

Les populations de poissons exposées au multistress peuvent être **impactées directement**, par une mortalité plus ou moins importante. Le multistress induit également des altérations dans la physiologie, le comportement et la reproduction des individus (Jackson *et al.*, 2016), pouvant modifier la distribution et de la dynamique des populations. Les populations de poissons peuvent aussi être **impactées indirectement** par le multistress, suite à une modification de la disponibilité en habitats ou une altération de la qualité trophique de l'estuaire.

Les effets de ces différents facteurs de forçage en conditions de multistress sont interdépendants et peuvent avoir des **effets additifs, antagonistes ou synergiques** (Harley *et al.*, 2006 ; Todgham & Stillman, 2013). Les effets additifs correspondent à la somme des effets de chacun des stresseurs présents dans le milieu. Les effets synergiques conduisent à un impact supérieur à la somme des effets de chaque facteur de forçage. *A contrario*, les effets antagonistes se traduisent par un impact plus limité lors d'une interaction entre stresseurs (Gunderson *et al.*, 2016).

Les **effets du multistress** sur les espèces estuariennes ont été explorés à différents niveaux d'organisation biologique. Les réponses des individus ont été analysées au niveau des traits d'histoire de vie, de la physiologie ou encore des réponses moléculaires. L'étude des différents niveaux d'organisation permet d'intégrer l'ensemble des réponses face aux forçages environnementaux.

Parmi les stresseurs associés au changement climatique, le **stress thermique** induit, pour de nombreuses espèces estuariennes, une diminution de la survie (Harley *et al.*, 2006) et des altérations de la physiologie (Somero, 2010). Chez les poissons, ces altérations de la physiologie comprennent, par exemple, une réduction de l'indice hépato-somatique, une augmentation de la teneur en lipides du foie et une augmentation des triglycérides dans le plasma. Des températures plus élevées provoquent aussi des changements dans les enzymes antioxydantes (Rossi *et al.*, 2017). Le stress thermique provoque également la sécrétion de catécholamines, de cortisol (Cockrem *et al.*, 2019), de glucose et de lactate (Bard & Kieffer, 2019). L'osmolarité sanguine et les réponses

immunitaires des poissons peuvent être aussi impactées par la hausse de la température des eaux (Balta *et al.*, 2017).

L'**eutrophisation**, parfois courante en zone estuarienne, peut induire une surproduction primaire (Morand & Briand, 2009). La production d'une biomasse algale importante peut conduire à une chute générale de la biomasse des communautés benthiques d'invertébrés et de poissons (Diaz *et al.*, 2008).

Les observations et les modèles climatiques ont également mis en évidence une augmentation de la fréquence et de l'intensité des **événements hypoxiques** en zones côtières, affectant la biodiversité marine et le fonctionnement de certains écosystèmes (nourriceries) (Hughes *et al.*, 2015). L'**hypoxie** peut induire, chez les poissons, des changements dans la prise alimentaire (Powers *et al.*, 2005) et un ralentissement du taux de croissance (He *et al.*, 2022). La baisse d'oxygène dissous dans l'eau entraîne également des changements dans le comportement anti-prédateur, avec notamment une augmentation du temps de fuite. Un accroissement de la ventilation et une baisse du taux d'activité métabolique ont également été observés (Mattiasen *et al.*, 2020). De plus, en condition d'hypoxie sévère, plusieurs activités enzymatiques sont dérégulées dans le sérum et dans le muscle, telles que la SOD, la CAT et la GPX (He *et al.*, 2022). Des événements hypoxiques prolongés peuvent avoir des effets létaux et sublétaux, même sur les organismes tolérant au stress hypoxique, tels que les huîtres ou certaines espèces de poissons (Jeppesen *et al.*, 2018).

Les **pollutions d'origine anthropique** provoquent également des perturbations physiologiques et une réduction de la fitness (Amoatey & Baawain, 2019 ; Teichert *et al.*, 2017 ; Moore & Olden, 2017).

En raison de leur production et de leur utilisation intensive, les **polluants organiques persistants** (POPs), tels que les polychlorobiphényles (PCBs), les polybromodiphényléthers (PBDE) et les pesticides organochlorés (OCP), sont très présents dans les écosystèmes et les organismes (Van Ael *et al.*, 2012). Les dioxines, les furannes, les produits perfluorés et les composés organobromés s'accumulent également dans les tissus des poissons. Les différents POPs présentent une toxicité sublétale, un potentiel cancérogène et peuvent aussi entraîner des perturbations endocriniennes. De plus, ces composés, de par leur persistance dans l'environnement, peuvent se **bioaccumuler** et se **biomagnifier** au sein de la chaîne trophique aquatique (Harmon, 2015).

Les **eaux usées** résultant d'un traitement incomplet par les **stations d'épuration** (STEP) et rejetées dans les systèmes côtiers et estuariens sont souvent caractérisées par un déficit en oxygène et une multi-contamination chimique (Matthiessen & Law, 2002). Les espèces estuariennes exposées à ces rejets ont montré des altérations du métabolome au niveau du foie. Ainsi, chez la Perche jaune (*Perca flavescens*), plusieurs métabolites hépatiques (glucose, malate, fumarate, glutamate, créatinine, histamine et oxypurinol) apparaissent comme plus abondants (Defo *et al.*, 2021). Les produits pharmaceutiques contenus dans les eaux usées impactent également les invertébrés, les amphibiens et les poissons. Les antidépresseurs, par exemple, vont modifier le comportement, la reproduction et le développement des invertébrés et des vertébrés. Les antidépresseurs peuvent même affecter la survie et entraîner un retard de développement et des anomalies morphologiques (Sehonova *et al.*, 2018).

Les **activités agricoles** ont également un impact sur la qualité de l'eau. L'utilisation excessive d'engrais et de produits phytosanitaires sur les cultures contribue à la formation de dépôts chimiques. Ces dépôts vont être entraînés par le lessivage des sols et le ruissellement jusqu'aux rivières et aux estuaires (Zia *et al.*, 2013). Les espèces estuariennes peuvent ainsi être exposées à des niveaux élevés d'engrais et de pesticides.

Une multitude de **produits phytosanitaires** sont utilisés en agriculture. Le glyphosate (N-(phosphonométhyl)glycine) est le pesticide le plus utilisé dans le monde. Introduit sur le marché et utilisé depuis 1974, cet herbicide permet d'éliminer les dicotylédones et les graminées. En effet, le glyphosate, inhibe l'enzyme 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) impliquée dans la voie de synthèse du shikimate chez les plantes (Duke & Powles, 2008). De ce fait, il peut être utilisé à large spectre. En plus de son impact direct, le glyphosate est également toxique de par sa dégradation et les métabolites qui en résultent. L'acide aminométhylphosphonique (AMPA), est le principal sous-produit issu de la dégradation du glyphosate et de l' amino-polyphosphonate. L'AMPA est donc omniprésent dans les environnements estuariens, engendrant un risque pour les espèces qui y vivent. Particulièrement impactés par les effets toxiques du glyphosate et de l'AMPA, les organismes aquatiques qui y sont exposés présentent un développement précoce. Ces espèces montrent aussi des changements dans les biomarqueurs associés au stress oxydatif, les enzymes antioxydantes et les indices plasmatiques hématologiques (Tresnakova *et al.*, 2021).

De la même manière, les organochlorés, les pyréthriinoïdes et les organophosphorés, largement utilisés dans l'agriculture maraîchère, ont un impact non négligeable sur la faune aquatique. Des analyses, menées sur des Crevettes grises (*Crangon crangon*) exposées *in natura* à ces pesticides, ont révélé une augmentation de l'expression de la P-gp impliquant des perturbations de leur reproduction (Fulton *et al.*, 1999). De plus, des poissons, également exposés à des pesticides, ont montré des perturbations endocriniennes (Martyniuk *et al.*, 2020).

L'exposition à tous ces xénobiotiques entraîne l'activation de **mécanismes de détoxification** chez les organismes aquatiques. La **biotransformation** des polluants organiques commence par l'introduction d'un groupe fonctionnel (phase I), puis la fixation d'un groupement polaire (phase II). Le métabolisme d'élimination continue ensuite par la prise en charge des composés chimiques par des enzymes pour être dégradés. La détoxification des polluants est différente selon les espèces. Les crustacés, par exemple, métabolisent certains xénobiotiques plus rapidement que les mollusques (Walker & Livingstone, 2013). De la même manière, les poissons métabolisent le pentachlorophénol (PCP) et le benzo[a]pyrène (BaP) plus rapidement que certains invertébrés aquatiques. Une biotransformation rapide du BaP par les poissons s'explique par des niveaux plus élevés d'activité du cytochrome P450, et plus particulièrement cytochrome P4501A (CYP1A) (Livingstone, 1998).

Les réponses des organismes estuariens face au **multistress environnemental** ont été largement étudiées ces vingt dernières années. Ces recherches englobent un grand nombre d'espèces très diverses, vertébrés comme invertébrés. Certaines de ces études portent sur un poisson estuarien, considéré comme une espèce sentinelle particulièrement pertinente des estuaires européens : le **Flet européen** (*Platichthys flesus*).

2. Une espèce modèle de poisson plat : le Flet Européen (*Platichthys flesus*)

2.1. Présentation de l'espèce modèle *P. flesus*

Le **Flet européen**, *Platichthys flesus* (L.), appartient à la famille des Pleuronectidés, de l'ordre des Pleuronectiformes. Les Pleuronectidés regroupent 60 espèces de poissons osseux plats, pour plus de 20 genres. *P. flesus* est l'une des espèces de poissons plats les plus répandues dans les eaux estuariennes européennes (Skerritt, 2010).

P. flesus est une **espèce benthique euryhaline** principalement présente dans les eaux côtières et saumâtres, avec une préférence pour les fonds meubles des estuaires (Déniel, 1981) et les substrats sablo-vaseux. Cette espèce estuarienne réside la majeure partie de l'année dans les estuaires. A partir de l'âge de 2 ans, le Flet migre vers des eaux plus profondes pour se reproduire en hiver à l'embouchure des estuaires (Hylland *et al.*, 1996).

Le Flet est une espèce qui présente très **peu d'intérêt commercial** (Skerritt, 2010). En effet, le Flet a une faible valeur marchande par rapport à d'autres espèces de poissons plats, telles que la Plie commune (*Pleuronectes platessa*) ou la Sole commune (*Solea solea*). Des pêches de flets sont enregistrées dans quelques régions d'Europe (Danemark, Royaume-Uni, Portugal, *etc.*), mais elles constituent des captures accidentelles lors de la pêche d'autres espèces démersales. Suite à cette pêche accessoire, les flets sont généralement utilisés comme appâts.

Le **tégument dorsal** de *P. flesus* (Figure 6) est brun tacheté avec des nuances variables, influencées par la nature du substrat sur lequel il vit. La **face aveugle** (ventrale) du poisson n'est pas pigmentée. Le Flet se distingue des autres espèces de poissons plats par la présence de tubercules dentelés entre les rayons de la nageoire dorsale (Wheeler 1969 ; Summers 1979 ; Cooper & Chapleau 1998).

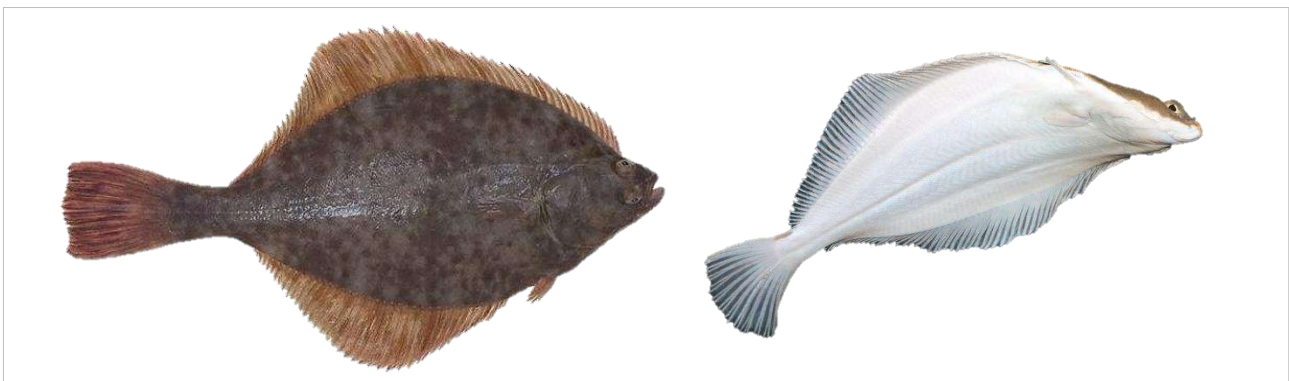


Figure 6. Flet d'Europe ou Flet commun (*Platichthys flesus*), face dorsale et face ventrale.

© <https://peche.ifremer.fr/en/Le-monde-de-la-peche/Les-ressources/Lesquelles/Poissons/Osseux/Flet>

P. flesus est une **espèce opportuniste**. A l'âge adulte, le Flet se nourrit principalement de macrofaune, essentiellement de bivalves (coques et moules), de polychètes et de crustacés (crabes et crevettes) (Summers 1979 ; Pihl 1982). Le Flet s'alimente sur le fond (Ansell, 1995) en suivant la marée dans la zone intertidale. Les juvéniles de *P. flesus* se nourrissent principalement de méiofaune, essentiellement de copépodes, d'ostracodes, de petites larves (Aarnio *et al.*, 1996), d'amphipodes et de siphons de bivalves (Ansell & Trevallion 1967 ; de Vlas 1979).

2.2. Aire de distribution et cycle biologique de *P. flesus*

Le Flet européen est une espèce à affinité boréale, essentiellement présente dans les eaux tempérées à froides de l'Europe. L'**aire de distribution** (Figure 7) de *P. flesus* s'étend de la Mer Blanche au Nord, jusqu'à l'estuaire du Mondego (Portugal) au Sud (Cabral *et al.*, 2007). Le Flet est donc une espèce capable de supporter une grande amplitude de température ; allant de 0,5°C en Mer Blanche en hiver à 22°C au Sud du Portugal en été. Cependant, il faut préciser que le Flet est moins abondant dans la partie Sud de son aire de distribution. En effet, des études ont révélé que les populations de Flet sont peu nombreuses dans le Golfe de Gascogne (Hermant *et al.*, 2010), dans l'estuaire de Gironde (Chaalali *et al.*, 2013) et au Sud du Portugal (Martinho *et al.*, 2013). Cependant, *P. flesus* reste relativement abondant au Nord du Portugal grâce à l'hydro-climat de cette zone (Ramos *et al.*, 2010 ; Morais *et al.*, 2011). Les estuaires de Minho et de Lima présentent ainsi une population importante de Flets grâce à upwelling situé au Nord-Ouest de la péninsule ibérique pendant la saison estivale (Lima *et al.*, 2007).

Plusieurs espèces à **affinité boréale**, comme le Flet, ont vu la limite Sud de leur aire de distribution remonter vers le Nord ces trois dernières décennies, suite à l'augmentation des températures de surface de la mer (Cabral *et al.*, 2007). De la même manière, les stocks de Morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), de Plie commune ou encore de Limande-sole (*Microstomus kitt*) en Atlantique ont chuté au Sud, mais ont augmenté au Nord de leur aire de répartition (Rijnsdorp *et al.*, 2009).

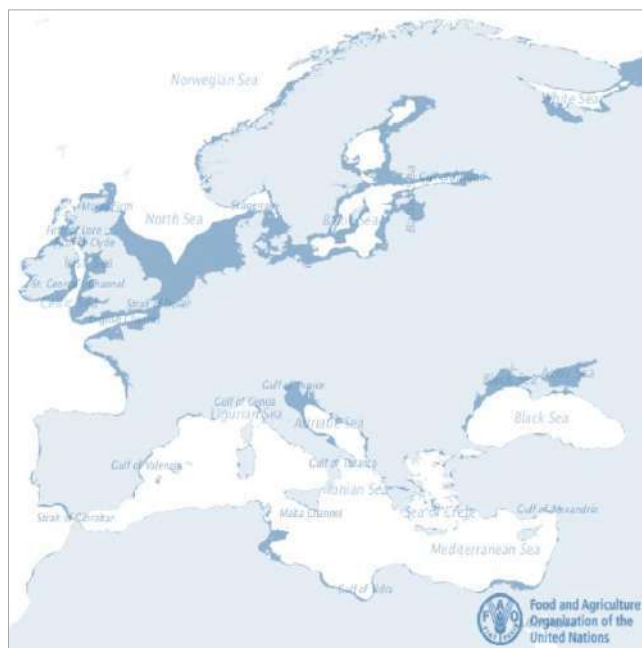


Figure 7. Aire de distribution du Flet européen (*P. flesus*), du Nord de la Mer Blanche jusqu'au Sud du Portugal, avec quelques populations présentes en Méditerranée. ©FAO (Source 05/04/2018)

P. flesus est un **poisson plat catadrome**. Cette espèce réalise une bonne partie de son cycle en estuaire et migre à l'embouchure des estuaires, voire en zone côtière pour assurer sa reproduction (Figure 8). Le long des côtes Atlantiques françaises, la ponte a lieu de février à mars, à une profondeur modérée (10 à 30 mètres). La période de fraie peut parfois s'étendre jusqu'à juin. Les œufs, pondus et fertilisés au niveau de la surface, vont mettre une semaine à se développer (à 12°C) et vont couler au fur et à mesure de leur développement.

Cependant, un **décalage de la période de ponte** des Flets a été observé ces dernières années, lié au changement climatique. En effet, le suivi de la maturation ovocytaire sur les individus femelles de l'estuaire de la Seine ont mis en évidence un décalage de la période de ponte vers les mois de mars, avril, voire mai (Couteau, 2020). Un tel retard dans la ponte des individus matures explique la petite taille de certains juvéniles de l'année (G0) échantillonnés en septembre.

Avant le **recrutement** au sein de l'estuaire, essentiellement en mai-juin, (Figure 8), les larves de Flet se métamorphosent complètement pour prendre une forme aplatie et asymétrique (Russell, 1976). Les juvéniles 0+ de *P. flesus* résident principalement dans la partie haute de l'estuaire à faible salinité (zone oligohaline). La vie juvénile du Flet, essentiellement estuarienne, dure en moyenne deux ans et demi (Dando, 2011).

Tout au long de leur croissance, les **juvéniles de Flet** vont exploiter de nouveaux compartiments vers l'aval de l'estuaire, de la partie mésohaline vers la partie polyhaline. La partie mésohaline de l'estuaire sera occupée par les juvéniles âgés de 7-8 mois (septembre-octobre) (Dupuy *et al.*, 2015). En Europe, le Flet est donc la seule espèce de poisson plat capable de vivre dans les secteurs les plus en amont des estuaires (Summers, 1979), avec l'Anguille d'Europe (*Anguilla anguilla*).

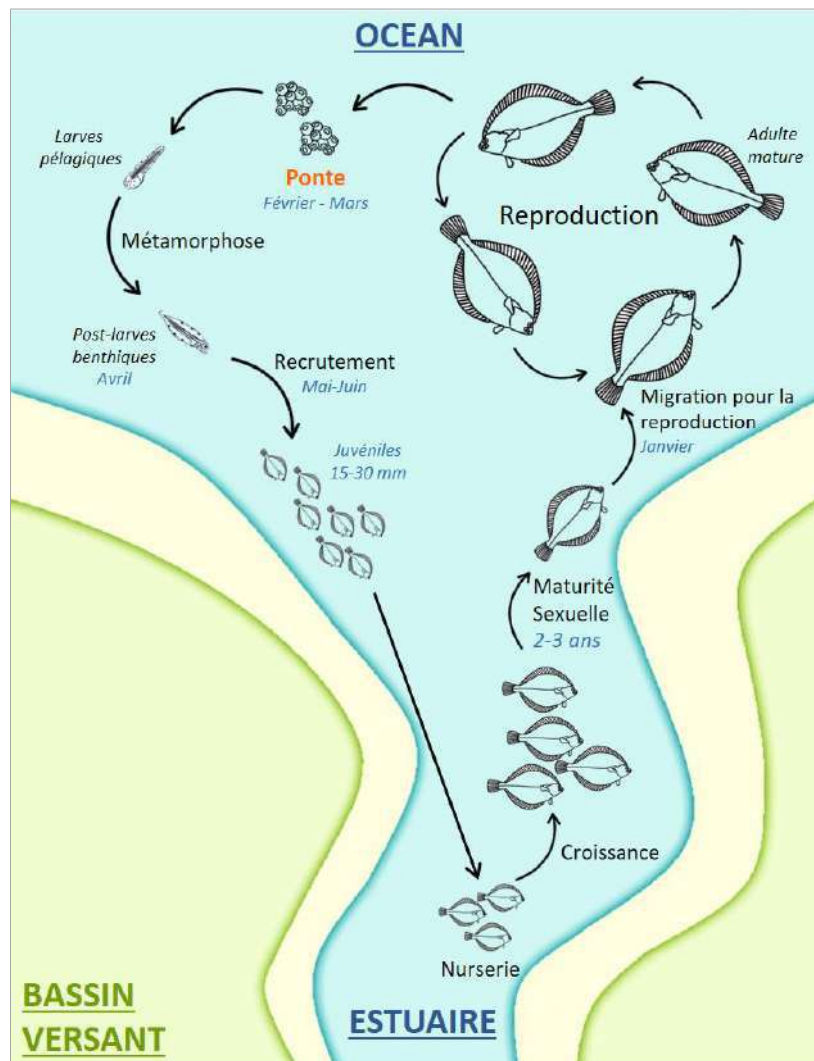


Figure 8. Schéma représentant le cycle biologique du Flet européen (*P. flesus*) le long des côtes atlantiques françaises ; de la reproduction des adultes en mer au niveau de l'embouchure de l'estuaire, jusqu'à la croissance des juvéniles en partie amont de l'estuaire. © Jennifer LAURENT

2.3. *P. flesus*, une espèce sentinelle estuarienne d'intérêt majeur

Une **espèce sentinelle** doit être un **bon enregistreur** de la qualité écologique de son écosystème. Il s'agit d'une espèce capable, par la dynamique de ses populations (augmentation ou variation de densité), de rendre compte de l'évolution générale d'un milieu (Rivière, 1993). Une espèce sentinelle accumule les polluants dans ses tissus, sans présenter de pertes massives de fitness (Beeby, 2001). Une espèce sentinelle sert également d'indicateur précoce des changements de l'environnement d'un écosystème donné. La dégradation environnementale d'un écosystème peut ainsi se traduire par une altération de la physiologie et/ou du comportement de l'espèce sentinelle (Ferreira *et al.*, 2004 ; Cooke *et al.*, 2022). De ce fait, une espèce sentinelle permet de mesurer la biodisponibilité des xénobiotiques et de mieux comprendre les mécanismes de la contamination chimique du vivant et la réponse des organismes face aux différents stressseurs.

Une **espèce sentinelle** pertinente est une espèce dont l'**aire de distribution** est parfaitement connue et dont la densité de population est suffisante, pour que les échantillonnages n'impactent pas la population concernée. De plus, il faut que la capture soit relativement facile, permettant d'obtenir des échantillons rapidement et en quantité suffisante, ceci sur l'ensemble de l'aire de distribution de l'espèce. Les voies d'exposition doivent également être connues. Généralement, elles sont déterminées par l'habitat et les préférences nutritionnelles de l'espèce (Rivière, 1993).

Le couplage des données biologiques mesurées sur une espèce sentinelle estuarienne avec les caractéristiques de son environnement (habitat physique, qualité trophique, régime de salinité, régime thermique, identification des principaux stressseurs) doit permettre d'explorer l'**état écologique** de l'hydrosystème. De plus, les études *in natura* des populations permettent de concrètement comprendre la réponse du biote face au multistress. En effet, il est illusoire de tenter de recréer en laboratoire des cocktails de polluants aussi complexes que dans la nature. *In natura*, il existe ainsi une multitude de mélanges, de pics de concentrations variables selon la saison et les évènements pluvieux, et donc une répétition des expositions du biote à des doses variées au cours du temps.

Dans le contexte de la **Directive Cadre sur l'Eau** (DCE), l'évaluation de la **qualité écologique** des estuaires est considérée comme un sujet d'importance majeure (Directive 2000/60/CE du 23/10/2000). La qualité écologique des estuaires est explorée en utilisant des indicateurs et des espèces sentinelles des eaux de transition. De ce fait, divers indicateurs pour évaluer la **qualité biologique** ont été développés, tels que des indicateurs "invertébrés benthiques" et des indicateurs "microphytobenthos". Des indicateurs de la **qualité physico-chimique** et **hydro-morphologique** des eaux de transition sont également opérationnels, tels que l'indicateur "oxygène" et l'indicateur Hydro-Morpho-Sédimentaires (HMS). Ainsi, l'état global d'une masse d'eau de transition est défini par l'état le plus déclassant des états écologique et chimique (Figure 9).

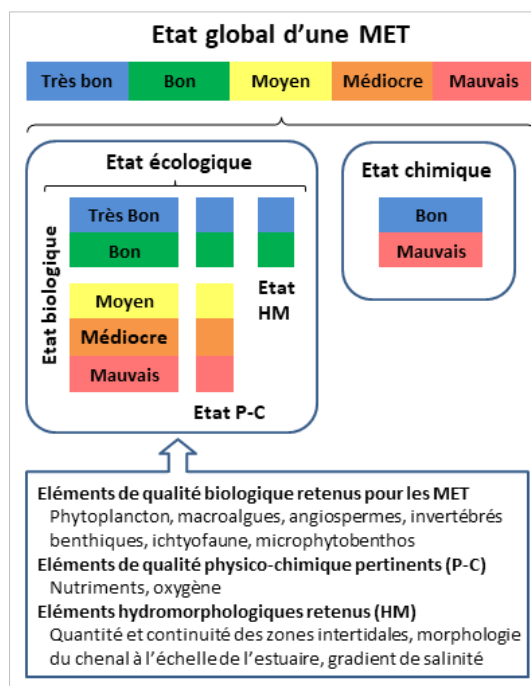


Figure 9. Schéma présentant les règles d'évaluation de l'état global d'une masse d'eau de transition (MET) (Annexe V.1.2 de la Directive 2000/60/CE) (<https://professionnels.ofb.fr/fr/node/277>).

Cependant, déterminer la **qualité écologique** d'un **système estuarien** demeure encore un exercice particulièrement **difficile**.

Le **Flet Européen** (*P. flesus*), de par son cycle de vie résolument estuarien, sa très forte tolérance aux variations de salinité, et sa faible mobilité dans le système estuarien à l'état juvénile (Teichert *et al.*, 2022) est une **espèce sentinelle d'intérêt majeur** pour évaluer le statut écologique des milieux de transition. De plus, le Flet est une espèce benthique en contact direct avec le fond considéré comme un bon enregistreur des polluants adsorbés sur les sédiments estuariens (Ferreira *et al.*, 2004).

Des recherches ont été menées depuis les années 2000 au sein notre équipe du LEMAR sur le modèle estuarien *P. flesus*. Ces études ont eu pour objectifs d'explorer les **réponses moléculaires** et populationnelles de cette espèce face au multistress environnemental dans des **milieux estuariens** caractérisés par des niveaux **contrastés** de stress chimique et/ou thermique et/ou hypoxique, sur la façade Atlantique européenne (Borcier *et al.*, 2020, 2019, 2016 ; Pédrón *et al.*, 2017a, 2017b ; Laroche *et al.*, 2013 ; Dupuy *et al.*, 2015 ; Galland *et al.*, 2015 ; Marchand *et al.*, 2004). Ainsi, les réponses de différentes populations de Flets ont été étudiées, notamment dans de grands systèmes estuariens lourdement contaminés par des xénobiotiques (Tamar - Grande-Bretagne, Seine, Loire, Gironde), dans des estuaires plus petits considérés comme des systèmes de "référence" relativement peu stressés (Canche et Ster de Lesconil), et enfin dans des estuaires de tailles intermédiaires caractérisés par une eutrophisation et un risque hypoxique estival (Vilaine), voire par un stress thermique (Lima & Mondego - Portugal).

A l'origine, les études réalisées étaient très orientées vers l'**écotoxicologie**, mais elles se sont progressivement élargies vers l'**écologie du stress**.

3. Signatures environnementales mesurées dans les estuaires et sur *P. flesus*

3.1. Indicateurs de l'état environnemental des estuaires (état de l'art)

Un **indicateur environnemental** est un descripteur quantitatif des pressions anthropiques et de l'état environnemental du système. Les **indicateurs de pression environnementale** mettent en évidence les changements dans les niveaux de pollution et les modifications des habitats et des écosystèmes. Les **indicateurs d'effets environnementaux** expriment les conséquences des changements de la qualité de l'environnement en termes d'effets sur les organismes, les populations et les écosystèmes (Opschoor & Reijnders, 1991).

Les indicateurs de pression environnementale regroupent des **mesures physiques et chimiques**, capables de détecter l'état de l'écosystème, en plus d'affecter les diverses réactions et processus qui s'y déroulent.

La pollution au sein des estuaires peut être déterminée par la **qualité de l'eau**, *via* des tests physiques, tels que la température, la dureté, le pH ou encore la turbidité. Des dosages chimiques d'oxygène dissous, d'éléments métalliques et de polluants organiques (pesticides) permettent de compléter l'évaluation de la qualité de l'eau (Patil *et al.*, 2012).

La pollution dans les estuaires peut également être déterminée par l'état de la **contamination des sédiments** (Cesar *et al.*, 2006). Les sédiments peuvent accumuler différents contaminants minéraux (métaux) et organiques (hydrocarbures), plus ou moins persistants, à une concentration supérieure à la colonne d'eau. En outre, les concentrations en polluants dans les sédiments reflètent les impacts des activités anthropiques sur les systèmes estuariens, l'état géochimique du bassin versant et le risque écologique (Roig *et al.*, 2015 ; Buruaem *et al.*, 2013 ; Höss *et al.*, 2010). L'évaluation de l'état chimique des sédiments permet d'identifier le type, la concentration et la source des substances chimiques, mais cela ne renseigne pas sur leur biodisponibilité et ni de leur effet sur les organismes. Il est donc nécessaire de mettre en relation les polluants des sédiments et les réponses biologiques des organismes (Tarnawski, & Baran, 2018 ; Kuzmanović *et al.*, 2016).

Les indicateurs d'effets environnementaux, aussi appelés **bio-indicateurs**, sont des organismes vivants faisant l'objet de mesures permettant d'indiquer la présence ou les effets de polluants. Les bio-indicateurs permettent de déterminer les impacts biologiques et de surveiller les effets synergiques et antagonistes de divers contaminants. Les espèces bio-indicatrices permettent de surveiller efficacement l'état de l'environnement en raison de leurs capacités différentielles à résister face à certains stressés environnementaux (Parmar *et al.*, 2016). Différents organismes sont utilisés comme bio-indicateurs pour révéler les changements environnementaux et écologiques, tels que les micro-organismes, le plancton, les plantes, les oiseaux, les macro-invertébrés (Dauvin *et al.*, 2007) et les poissons.

Les **poissons** présentent de nombreux avantages en tant qu'organismes indicateurs pour les programmes de surveillance des écosystèmes estuariens (Authman *et al.*, 2015). Les poissons sont faciles à identifier, peuvent appartenir à différents niveaux trophiques, et présentent un cycle biologique généralement bien connu. De plus, les poissons ont une durée de vie relativement longue au sein d'une multitude d'écosystèmes affectés par les perturbations anthropiques, fournissant ainsi un enregistrement à long terme du stress environnemental. Les réponses des poissons peuvent être détectées à l'échelle cellulaire, individuelle et populationnelle. Le suivi des communautés de poissons permet également d'identifier des altérations environnementales (Whitfield & Elliott, 2002).

Le **Flet**, de par son statut d'espèce sentinelle estuarienne, est une espèce bio-indicatrice toute indiquée pour mettre en évidence les stressseurs au sein des estuaires.

3.2. Traits d'histoire de vie chez *P. flesus* en réponse au multistress dans les estuaires (état de l'art)

En écologie, les **traits d'histoire de vie** d'une espèce sont des **descripteurs** écologiques, biologiques, morphologiques, physiologiques et comportementaux mesurables des adaptations des espèces à leur environnement (Frimpong & Angermeier, 2009). Les traits de vie d'un individu regroupent entre autres la croissance, le rythme et la stratégie de reproduction, l'alimentation, les préférences de température et de pH...

L'étude des **traits d'histoire de vie** analyse la distribution, l'abondance et les réponses des organismes aux impacts anthropiques en caractérisant la qualité de leur environnement (Blanck *et al.*, 2007 ; Winemiller, 2005 ; Goldstein & Meador, 2004 ; Lamouroux *et al.*, 2002).

Les **réponses du Flet Européen** (*Platichthys flesus*) au multistress dans les estuaires ont été largement étudiées ces vingt dernières années. Des recherches *in natura* mesurant les traits d'histoire de vie sur le Flet ont ainsi permis de caractériser différents niveaux de stress dans les milieux estuariens (Hylland *et al.*, 1996).

Des études menées sur *P. flesus* ont démontré une **perte de fitness** au niveau individuel en milieux stressés. Cette perte de fitness peut s'illustrer par une réduction du taux de croissance, une diminution de l'indice de condition et une baisse de la fécondité.

La **croissance** journalière chez les poissons peut être estimée à partir de l'analyse de pièces calcifiées ; les otolithes. L'**otolithe** est une concrétion minérale située dans l'oreille interne des poissons osseux et se forme par déposition des couches concentriques successives de carbonate de calcium. L'otolithe a une croissance continue tout au long de la vie l'individu et le dénombrement des couches concentriques successives de l'otolithe permet d'estimer l'âge et la croissance somatique du poisson (Stevenson & Campana, 1992). L'estimation de la croissance des poissons permet de déterminer la qualité des habitats (Tarpgaard *et al.*, 2005 ; Meng *et al.*, 2000). En effet, la croissance moyenne journalière du Flet est plus lente en Seine que dans la Canche, indiquant que le rythme de croissance des poissons pourrait être affecté par la pollution (Amara *et al.*, 2009). Le

stress thermique et la disponibilité en nourriture peuvent également avoir un impact sur la croissance des individus (Dupuy *et al.*, 2015 ; Marchand *et al.*, 2004 ; 2003 ; Laroche *et al.*, 2002).

L'**indice de condition**, ou indice de Fulton, permet de connaître l'état d'embonpoint des poissons et révèle l'état physiologique des individus. L'indice de condition (K) se calcule en divisant la masse (M) du poisson par sa longueur (L) au cube, multiplié par 100 ($K = (M/L^3) \times 100$). L'indice de condition peut fournir des informations sur les effets induits par une exposition à des contaminants (Venancio & Domingos, 2014). L'indice de condition est plus faible chez les flets issus de grands estuaires pollués (Seine et Gironde) (Kerambrun *et al.*, 2013 ; Amara *et al.*, 2009 ; Marchand *et al.*, 2003).

La **fécondité** exprime la capacité des individus, et plus particulièrement les femelles, à se reproduire et à assurer la perpétuation de l'espèce. La fécondité (F) est calculée en divisant la fécondité absolue (Fa) par la masse (M) du poisson ($F = Fa/M$), avec la fécondité absolue qui correspond au nombre d'ovocytes matures dans les ovaires d'une femelle, au début de la période de reproduction. Une baisse de la fécondité a été observée chez des flets échantillonnés dans des systèmes contaminés (Marchand *et al.*, 2013 ; 2004).

Le Rapport Gonado Somatique (RGS) est un indicateur du développement reproducteur chez les poissons. Le RGS est le rapport entre le poids des gonades et le poids du poisson éviscéré, en pourcentage [$RGS = (\text{poids des gonades}/\text{poids corporel}) \times 100$]. Le RGS est un biomarqueur pertinent pour estimer une contamination aux œstrogènes environnementaux (Hassanin *et al.*, 2002). Le RGS est également considéré comme un bon indicateur de l'atrophie des gonades (Hassanzadeh, 2017). Une exposition à des xénoestrogènes peut en effet affecter la biologie de la reproduction des organismes aquatiques. Une telle exposition peut conduire à une diminution du RGS, à une altération de la spermatogenèse (Wang *et al.*, 2019 ; Liu *et al.*, 2018a), voire à des changements du comportement reproducteur (Coe *et al.*, 2010). Le RGS mesuré chez des flets a révélé un faible développement des gonades dans les zones estuariennes impactées par des activités anthropiques. De plus, le RGS est inversement proportionnel aux concentrations en contaminants (Dabrowska *et al.*, 2014). Les flets présentant des RGS réduits sont caractérisés par un accroissement des dommages à l'ADN et par une induction de l'activité EROD (Dabrowska *et al.*, 2014 ; Sol *et al.*, 2008).

Les traits d'histoire de vie du Flet ne sont pas les seuls indicateurs pertinents pour étudier la réponse de cette espèce sentinelle aux différents facteurs de stress dans le milieu naturel ; différents **biomarqueurs** ont été aussi développés chez cette espèce.

3.3. Biomarqueurs chez *P. flesus* en réponse au multistress dans les estuaires (état de l'art)

Un **biomarqueur** (Figure 10) désigne un indicateur, précis et reproductible, permettant de déterminer l'état de santé d'un organisme (Strimbu & Tavel, 2010). Les biomarqueurs sont des paramètres biochimiques ou physiologiques mesurés chez des individus afin de mettre en évidence une exposition à des produits chimiques ayant de potentiels effets toxiques (Lagadic, 2002). Les biomarqueurs permettent également de mettre en évidence d'autres stressseurs, tels que l'hypoxie, l'eutrophisation ou encore le stress thermique.

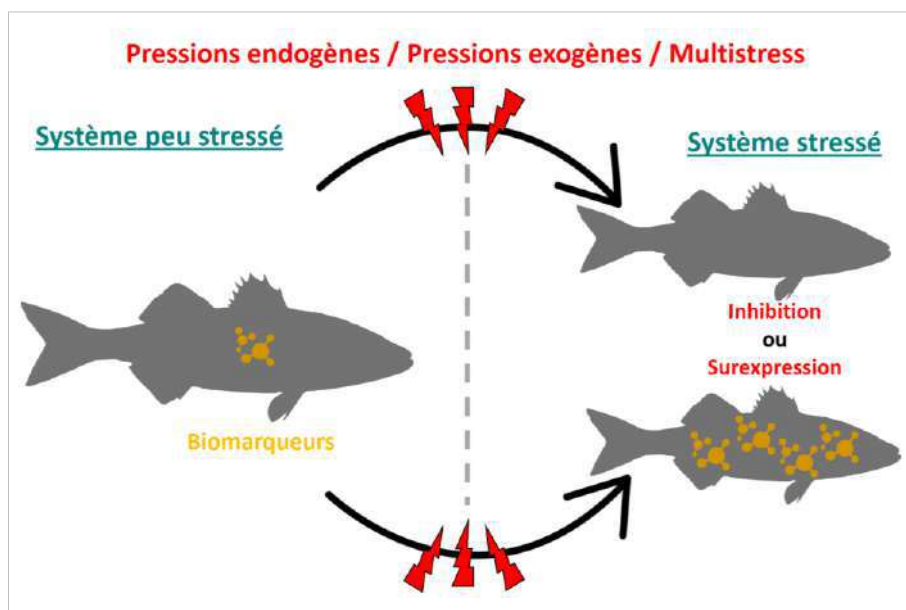


Figure 10. Schéma représentant le principe de biomarqueur. © Jennifer LAURENT

Les biomarqueurs sont des **outils intégratifs** qui contribuent à la détection des **effets biologiques** observés à l'échelle d'un organisme et/ou d'une population, impactés par des stressés (Sanchez & Porcher, 2009). Les biomarqueurs sont donc essentiels pour évaluer l'étendue des dommages écologiques d'un système. Ainsi, les biomarqueurs peuvent être utilisés comme des outils de diagnostic (Lagadic, 2002).

De ce fait, les **biomarqueurs** permettent de répondre à certains **enjeux de la DCE** (Sanchez & Porcher, 2009), tels que la non-dégradation des ressources et des milieux, le bon état des masses d'eau, la réduction des pollutions liées aux substances et le respect de normes dans les zones protégées. Le programme de surveillance est assuré par différents types de contrôle répartis sur l'ensemble du territoire français pour suivre les milieux aquatiques sur le long terme.

In natura, les **réponses du Flet** (*P. flesus*) face au multistress en zone estuarienne sont bien connues grâce aux biomarqueurs mesurés sur cette espèce, permettant de caractériser les différents niveaux de stress dans ces milieux (Hylland *et al.*, 1996).

Des effets génotoxiques ont ainsi été détectés chez des flets issus d'estuaires stressés. La **génotoxicité** implique une augmentation des dommages cellulaires et plus particulièrement des dommages primaires à l'ADN.

Les dommages à l'ADN peuvent être mesurés par le **test des comètes**, aussi appelé Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE). Cette méthode permet de détecter les cassures simples et doubles brins de l'ADN et les sites alcali-labiles (Singh *et al.*, 1988). Il s'agit d'une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose permettant de mesurer les cassures induites directement par un agent génotoxique. Cette méthode permet également de mesurer les dommages induits indirectement lors des processus enzymatiques de réparation ou lors de processus secondaires de fragmentation (apoptose). Des mesures menées sur le Flet ont révélé que la génotoxicité peut être induite par une augmentation de la température de l'eau (Evrard *et al.*, 2013 ; de Campos Ventura *et al.*, 2008 ; de

Andrade *et al.*, 2004) et par des phénomènes hypoxiques (Evrard *et al.*, 2013 ; Livingstone, 2003) en période estivale. La génotoxicité peut également être provoquée par une exposition à des pesticides (diuron, isoproturon, atrazine, *etc.*), des HAPS, et des PCBs (Evrard *et al.*, 2013 ; Laroche *et al.*, 2013 ; Marchand *et al.*, 2006 ; Laroche *et al.*, 2002). L'augmentation des niveaux de dommages à l'ADN peut parfois être directement liée à une hausse de la demande énergétique et du taux de détoxification suite à un accroissement du temps d'exposition au stresser (Evrard *et al.*, 2013).

La formation d'**adduits à l'ADN** chez les espèces aquatiques a également été largement utilisée comme biomarqueur de la génotoxicité (Akcha *et al.*, 2003 ; Lyons *et al.*, 1999). Les adduits à l'ADN sont des modifications chimiques du brin d'ADN qui peuvent entraver la réplication de l'ADN. Ces anomalies peuvent entraîner une réplication anormale et des mutations de l'ADN. De nombreuses recherches ont mis en évidence la formation d'adduits à l'ADN chez des poissons issus de zones contaminées par les HAPs (Pampanin *et al.*, 2017). De plus, les adduits à l'ADN peuvent persister plusieurs mois une fois formés, permettant un suivi des expositions chroniques aux contaminants génotoxiques (Amat *et al.*, 2006 ; Rose *et al.*, 2001). Notons également que les niveaux d'adduits à l'ADN, mesurés au niveau du foie de flets, sont corrélés aux niveaux de contamination en HAPs des sédiments (Aas *et al.*, 2000 ; Lyons *et al.*, 1999).

Les **analyses histologiques hépatiques** sont considérées comme un outil pertinent pour détecter une exposition à des substances toxiques et cancérigènes (Salamat *et al.*, 2012). Des analyses histologiques de foie de flets provenant de sites multi-contaminés (HAPs, PCBs, HCH, HCB, DDT, PBDE) ont mis en évidence des lésions hépatiques (Lang *et al.*, 2006) telles que des foyers d'altération cellulaire (FCA), des foyers de nécrose ou de régénération (FNR), des inclusions fibrillaires hépatocellulaires, des pléomorphismes nucléaires, mais aussi des agrégats de mélanomacrophages et des inflammations (Cachot *et al.*, 2013 ; Lyons *et al.*, 2004). Les FCA hépatiques constituent le stade précoce dans la formation de néoplasies chez les poissons, c'est donc un puissant biomarqueur histopathologique de l'exposition aux cancérigènes (Lyons *et al.*, 2004). Généralement, les femelles flets présentent une prévalence plus élevée de tumeurs et de FCA que les mâles (Cachot *et al.*, 2013). Enfin, des corrélations ont été établies entre la présence de HAPs dans les sédiments, la formation d'adduits à l'ADN et lésions hépatiques pré-néoplasiques chez les poissons (Pampanin *et al.*, 2017).

Le **Rapport Hépatosomatique (RHS)** est un indicateur de l'état de santé et de condition physiologique du poisson. Le RHS est un biomarqueur communément utilisé pour évaluer les effets liés à des facteurs de stress environnementaux (Facey *et al.*, 2005). Le RHS est le rapport entre la masse du foie et la masse du poisson éviscéré, en pourcentage [$\text{RHS} = (\text{poids du foie} / \text{poids corporel}) \times 100$]. Un accroissement du RHS a été observé chez des flets exposés à des polluants organiques (Ferreira *et al.*, 2004) et des effluents de station d'épuration (Porter & Janz, 2003). Par ailleurs, l'augmentation du RHS se produit naturellement chez les femelles pendant la synthèse de la vitellogénine (VTG). Chez les individus mâles, l'augmentation du RHS peut être attribuée à un changement du métabolisme vers la production de VTG, en réponse à une exposition à des œstrogènes exogènes. Chez *P. flesus*, une hépatomégalie peut également apparaître suite à des activités de détoxification accrues en réponse à la présence de composés toxiques (Kleinkauf *et al.*, 2004a).

La mesure de l'activité enzymatique de l'**Ethoxy-Resorufine-O-Deethylase (EROD)** est l'un des biomarqueurs les plus pertinents pour mettre en évidence une exposition à des contaminants tels que les polluants organiques et les organochlorés (Whyte *et al.*, 2000). L'activité EROD permet la mesure catalytique de l'induction d'une cytochrome P450 (CYP450), la CYP1A1. Les cytochromes P450 sont des enzymes de biotransformation qui augmentent la solubilité des polluants pour qu'ils soient excrétés dans l'urine et la bile. Cette mesure biochimique peut être effectuée sur des échantillons de foie, de branchies, de rein ou encore de cerveau (Ortiz-Delgado *et al.*, 2008). Chez le Flet, l'activité EROD hépatique a permis de déterminer une exposition à des contaminants dans les estuaires, et plus particulièrement les HAPs et les PCBs. Ainsi, l'activité EROD est significativement supérieure chez les flets capturés dans des estuaires industrialisés (Kirby *et al.*, 2007 ; Richardson *et al.*, 2001 ; Vigano *et al.*, 2001 ; Minier *et al.*, 2000). L'activité EROD hépatique est également associée à une induction des oxydases à fonction mixte (MFO), aussi appelées mono-oxygénases (Kirby *et al.*, 2007).

Les **activités enzymatiques** liées au **métabolisme énergétique** sont également communément étudiées chez les organismes afin de mettre en avant les limites de leur bioénergétique face au multistress (Sokolova, 2013). Les activités enzymatiques mesurées sur le Flet font partie des biomarqueurs utilisés pour évaluer la qualité des masses d'eau des estuaires (Capela *et al.*, 2016).

Plusieurs enzymes mitochondriales peuvent être mesurées, telles que la **citrate synthase (CS)**, la **cytochrome c oxydase (CCO)** et la **superoxyde dismutase (SOD)**. La CS est une enzyme clé du cycle de Krebs et la CCO est l'accepteur terminal d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons. La CS et la CCO sont toutes les deux considérées comme des indicateurs de l'aérobiose. Des mesures de la CS et de la CCO chez différentes populations de flets ont montré une réduction générale du métabolisme de l'aérobiose chez les populations en limite Sud de répartition par rapport à celles de la limite Nord. Cette baisse des activités de la CS et de la CCO dans le muscle serait un compromis physiologique permettant au poisson de mieux tolérer une température chroniquement élevée (Pédron *et al.*, 2017b). La superoxyde dismutase (SOD) est une métalloprotéine qui intervient dans les mécanismes d'élimination des radicaux libres. En effet, le suivi de la SOD permet de déterminer le niveau de stress oxydatif. L'activité de la SOD est aussi influencée par la présence de métaux (Cd, V, Co, Se, *etc.*) dans le milieu (Capela *et al.*, 2016). Les métaux étant connus pour être des inducteurs de stress oxydatif (Ferreira *et al.*, 2005). Les métabolites produits au cours de la phase I de détoxification peuvent également modifier l'activité de la SOD.

La **glucose-6-phosphate deshydrogénase (G6PDH)**, liée au cycle des pentoses phosphates, est considérée comme un marqueur pertinent de l'anabolisme (Gauthier *et al.*, 2011) et des dommages oxydatifs (Effert *et al.*, 2006) chez les poissons. Une baisse de l'activité de la G6PDH dans les populations nordiques de flets a été observée lorsque la température augmente. Cela pourrait refléter une altération de l'anabolisme et conduire à une réduction de la protection contre les dommages oxydatifs (Pédron *et al.*, 2017b).

La **lactate déshydrogénase (LDH)** fait également partie des activités enzymatiques mesurées pour suivre le métabolisme énergétique, et plus particulièrement le métabolisme anaérobie. L'augmentation de l'activité LDH en condition hypoxique et de hausse de la température suggère

que les flets sont capables de compenser les faibles apports en ATP aérobie par une augmentation de la production d'ATP anaérobie (Pédron *et al.*, 2017b ; Sokolova, 2013).

La **glutathion S-transférase** (GST) et l'**UDP-glucuronyl-transférase** (UDPGT), des enzymes de détoxification de phase II, sont également mesurées. La GST se conjugue à des xénobiotiques électrophiles afin de faciliter leur excrétion et l'UDPGT, une enzyme réticulaire, catalyse les réactions de glucurono-conjugaison. Les activités de la GST et de l'UDPGT ont été induites chez plusieurs espèces de poissons plats, tels que le Flet, lorsqu'ils sont exposés à des sédiments contaminés aux PCBs et HAPs (Ribalta *et al.*, 2015 ; Viganò *et al.*, 2001).

Enfin, parmi les enzymes généralement étudiées, on retrouve la **catalase** (CAT) et la **glutathion peroxydase** (GPx). Ces deux hémoprotéines sont des enzymes antioxydantes qui luttent contre les radicaux libres. Plus spécifiquement, la CAT et la GPx permettent de catalyser la dismutation du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. La CAT joue un rôle important dans la protection des organismes aquatiques contre la toxicité chimique. Des différences dans l'activité de la CAT ont été observées chez des flets exposés aux HAPs (Van der Oost *et al.*, 2003), aux métaux ou aux pesticides (Benedetti *et al.*, 2015).

Les **métallothionéines** (MTs) sont aussi classiquement étudiées en écotoxicologie aquatique. Les MTs sont des protéines de faible poids moléculaire, riches en cystéine, et avec une grande affinité pour les ions métalliques. Les différentes isoformes des MTs sont très abondantes dans le foie et les reins. Les MTs contribuent à la détoxification des métaux et des métalloïdes hautement toxiques et/ou non essentiels. Ces protéines ont un rôle majeur dans le transport et le stockage des métaux. Les MTs ont également un rôle protecteur contre les effets toxiques de ces métaux en les séquestrant, ce qui réduit la quantité d'ions métalliques libres (Mourgaud *et al.*, 2002). Les MTs peuvent également inhiber l'action de certains médicaments (anticancéreux alkylants).

La synthèse de MTs est induite chez les poissons lors d'une exposition, chronique ou aiguë, aux métaux (Hemmadi, 2016). De nombreuses études menées sur le Flet ont démontré une induction des MTs hépatiques lors d'une exposition au Cd (Sheader *et al.*, 2006), au Cu et au Zn (Rotchell *et al.*, 2001). Les différences de niveau des MTs peuvent également être associées au stade de reproduction, à la disponibilité en nourriture, à la température ou encore à la concentration en oxygène (Baršienė *et al.*, 2006).

Les **effets neurotoxiques** des contaminants sont également étudiés chez le Flet (Capela *et al.*, 2016 ; Baršienė *et al.*, 2006). L'activité de l'**acétylcholinestérase** (AChE), mesurée en réponse à une exposition des organismes marins à des neurotoxiques (Matozzo *et al.*, 2005 ; Forget *et al.*, 2003), est une hydrolase qui assure le clivage de l'acétylcholine (neurotransmetteur) en choline et en acétate. L'AChE intervient essentiellement au niveau du cerveau (synapses), mais également dans certaines cellules comme les globules rouges.

L'activité de l'AChE est particulièrement impactée par les insecticides organophosphorés et les carbamates, de puissantes neurotoxines qui bloquent la dégradation de l'acétylcholine par l'AChE (Kopecka & Pempkowiak, 2008 ; Kirby *et al.*, 2000). Une corrélation négative a également été observée entre l'activité de l'AChE et les niveaux de HAPs présents dans le milieu (Baršienė *et al.*,

2006 ; Bocquené *et al.*, 2004). Les différences d'activité de l'AcHé peuvent aussi être attribuées à des changements de température (Kopecka & Pempkowiak, 2008).

Certains contaminants (polluants ou médicaments) ont le potentiel de modifier les voies hormonales qui régulent les processus de reproduction, ces molécules sont des perturbateurs endocriniens. La **vitellogénine** (VTG) est un biomarqueur classiquement mis en œuvre pour évaluer une exposition à ces perturbateurs endocriniens.

Chez les poissons, la VTG est une phospholipoglycoprotéine de grande taille utilisée comme précurseur de la protéine vitelline dans le foie. Au cours de la maturation sexuelle, la femelle synthétise une hormone, le **17 β -estradiol** (E2), dans les gonades. L'E2 se fixe ensuite aux récepteurs de l'estradiol dans les hépatocytes, conduisant à la transcription du gène de la VTG. Après la traduction, la VTG est modifiée puis sécrétée par les cellules pour être absorbée (endocytose) par l'ovocyte en croissance (Mommsen & Walsh, 1988).

Chez les individus **mâles et immatures**, les concentrations en E2 sont normalement trop faibles pour déclencher une expression significative des gènes de la VTG. De plus, la VTG n'est pas connue pour avoir de fonction chez les mâles, constituant ainsi un déchet énergivore. La présence de VTG dans le plasma des mâles correspond donc à une exposition à des perturbateurs endocriniens, tels que des xénoestrogènes (Giesy *et al.*, 2000). De plus, cette synthèse anormale de VTG détourne les ressources métaboliques allouées à la croissance et à la spermatogenèse (Vos *et al.*, 2000).

Des études menées sur *P. flesus* dans des estuaires multi-contaminés ont révélé une forte induction de VTG. La présence de VTG dans le plasma des poissons mâles indique la présence d'œstrogènes et/ou de xénoestrogènes naturels et/ou synthétiques (Kleinkauf *et al.*, 2004a ; 2004b). Les concentrations en VTG mesurées chez ces individus mâles ont également mis en évidence un cycle saisonnier marqué. Les mâles exposés à des xénoestrogènes peuvent aussi présenter des ovotestis (condition intersexuée) (Kleinkauf *et al.*, 2004c). Enfin, l'E2 et la VTG ont la capacité d'inhiber l'activité EROD de la même manière que certains PCBs ou HAPs, qui peuvent également avoir des effets œstrogéniques, anti-œstrogéniques ou anti-androgènes (Kirby *et al.*, 2007).

Une fois combinés, les **traits de vie** et les **biomarqueurs** permettent de mieux comprendre les réponses du Flet au multistress, mais pour compléter cette vision il est nécessaire d'enrichir ces analyses avec d'autres signatures environnementales, et notamment les isotopes stables et les éléments traces.

3.4. Autres signatures chez *P. flesus* en réponse au multistress dans les estuaires (état de l'art)

Les **signatures environnementales** permettent de reconstituer l'histoire environnementale des poissons à partir, notamment, de la microchimie des otolithes.

La **formation** de l'**otolithe** est un processus complexe et l'incorporation des éléments environnementaux dépend des caractéristiques abiotiques de l'environnement, lesquelles influencent la concentration en ions libres assimilables. La **composition** des **otolithes** change donc de manière prévisible avec des variables environnementales, il est donc possible de déterminer les régimes de température, de salinité, d'oxygène dissous dans l'otolithe du poisson vs dans les eaux (Elsdon & Gillanders, 2004). Les éléments présents dans l'otolithe peuvent également fournir la

preuve d'une pollution du milieu, et sa durée (Daros *et al.*, 2022 ; Spilsbury *et al.*, 2022). De plus, une partie des carbonates de l'otolithe provient du carbone métabolisé et dépend donc du métabolisme du poisson plutôt que des conditions environnementales (De Pontual & Geffen, 2002).

Les **signatures microchimiques**, et plus particulièrement les analyses d'**éléments traces**, sont utilisés en écologie comme un outil pour suivre la migration des poissons (Elsdon *et al.*, 2008 ; Campana, 1999). La microchimie sur otolithes permet également d'évaluer et de retracer les pollutions métalliques à long terme dans les systèmes estuariens (Halden & Friedrich, 2008).

Le **strontium** et le **baryum** sont communément utilisés pour retracer les patterns de migrations, et plus particulièrement les déplacements entre la pleine mer et les rivières (Secor *et al.*, 2001 ; Secor *et al.*, 1995a). Les ratio Sr:Ca et le Na:Ca sont plus élevés dans les otolithes de poissons océaniques et peuvent être utilisés comme proxy de la salinité. *A contrario*, le Ba:Ca est plus élevé dans les otolithes des poissons vivant en eau douce (Secor & Rooker, 2000 ; Secor *et al.*, 1995b).

Le **manganèse** au sein des estuaires est contrôlé par les propriétés physico-chimiques de l'eau (pH, salinité, température et concentration en oxygène), par la désorption des matières en suspension et par l'oxydoréduction (Millward & Turner, 1995). Le rapport Mn:Ca est généralement utilisé comme proxy de la concentration en oxygène dissous. Ce ratio permet donc de mettre en évidence les phénomènes hypoxiques dans les milieux aquatiques (Altenritter *et al.*, 2018 ; Limburg *et al.*, 2015 ; Thorrold & Shuttleworth, 2000).

Les **éléments métalliques**, tels que le Cd, le Co, le Cr, le Cu, le Fe, le Ni, le Pb et le Zn, présents dans les otolithes, permettent de discriminer les estuaires. Ces métaux, dépendant de processus complexes et sous l'influence de facteurs biologiques et physiologiques, sont plus ou moins spécifiques à chaque estuaire (Arslan & Secor, 2005). Le Pb, le Cu, le Cd et le Zn sont des métaux couramment associés à des pollutions.

La **microchimie** sur les **otolithes** de Flet, et surtout les ratios de Sr:Ca et Ba:Ca, ont permis de retracer les déplacements des spatio-temporels dans le système estuarien et leurs modes d'utilisation de l'habitat (Teichert *et al.*, 2022). Des analyses d'éléments traces menées sur des juvéniles de Flet *in natura* ont permis de retracer l'historique de contamination à plusieurs métaux dans de grands estuaires, comme la Gironde. Les concentrations en métaux dans l'otolithe étant parfois proportionnelles aux concentrations environnementales (Selleslagh *et al.*, 2016 ; Daverat *et al.*, 2011).

Les analyses d'**isotopes stables** sont des outils puissants massivement utilisés en écologie pour caractériser le régime alimentaire et le niveau trophique de nombreuses espèces aquatiques (Post *et al.*, 2007), ainsi que différents aspects de leurs environnements (Blazer *et al.*, 2014). Les isotopes stables peuvent être mesurés dans différents tissus du poisson, classiquement dans l'otolithe et le muscle.

Les mesures d'isotopes stables effectuées sur otolithe permettent de déterminer les rapports de l'**oxygène** ($\delta^{18}\text{O}$) et du **carbone** ($\delta^{13}\text{C}$). Le $\delta^{18}\text{O}$ est considéré comme un bon proxy de la salinité de l'eau, et permet ainsi d'identifier les déplacements et les possibles migrations des poissons (Elsdon

& Gillanders, 2011 ; Kerr *et al.*, 2007). Le $\delta^{13}\text{C}$ sur otolithe est un proxy pertinent du taux d'activité métabolique d'un organisme (Chung *et al.*, 2019). Les niveaux de $\delta^{13}\text{C}$ renseignent sur l'incorporation du carbone lors de la respiration. Ainsi, des valeurs négatives en $\delta^{13}\text{C}$ reflètent un métabolisme élevé, associé à une respiration élevée (Martino *et al.*, 2019). Un fort taux d'activité métabolique peut refléter une réponse de l'organisme à des stressseurs, souvent caractérisée par une augmentation de la production d'énergie par la respiration pour maintenir l'homéostasie du milieu intérieur et pour réparer les dommages cellulaires induits par les stressseurs (Sokolova, 2013).

Les mesures d'isotopes stables effectuées sur les tissus mous permettent de déterminer les rapports de l'**azote** ($\delta^{15}\text{N}$) et du **carbone** ($\delta^{13}\text{C}$). Le $\delta^{15}\text{N}$ augmente avec les niveaux trophiques, des proies aux prédateurs (Peterson et Fry, 1987), ce qui permet de déterminer les niveaux trophiques des organismes (Owens, 1987). Le $\delta^{15}\text{N}$ reflète également les activités d'origines anthropiques qui entraînent des rejets de nutriments azotés issus de l'agriculture ou des eaux usées (Connolly *et al.*, 2013 ; Riera *et al.*, 2000). Le $\delta^{13}\text{C}$ reflète plutôt les variations dans les sources de carbone d'origine marine ou terrestre, les signatures les plus négatives étant d'origine terrestre (Liu *et al.*, 2018b).

Le **rapport élémentaire C/N** est également un bon indicateur de l'état physiologique puisqu'il reflète la **teneur en lipides** des tissus mous. De plus, les lipides dans les tissus mous, riches en carbone et dépourvus d'azote, présentent un $\delta^{13}\text{C}$ plus négatif que les autres biomolécules (Post *et al.*, 2007). Ainsi, un fort rapport C/N associé à de faibles valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ reflètent une importante quantité de lipides au sein de l'organisme et un bon état de santé. Au contraire, un faible rapport C/N associé à de fortes valeurs de $\delta^{13}\text{C}$ attestent de faibles quantités de lipides, traduisant d'un manque de réserve énergétique et un état de santé altéré.

Les mesures d'**isotopes stables** menées sur le Flet ont donc permis de caractériser les schémas de dispersion des juvéniles de Flet le long de l'estuaire (Teichert *et al.*, 2022). Ce type d'analyses a également permis d'identifier les sources de matière organique à la base de l'alimentation du Flet. L'origine de ces proies, également identifiée grâce aux isotopes, a permis de déterminer la connectivité et la fidélité à l'habitat (Selleslagh *et al.*, 2015). Les rapports isotopiques stables ($\delta^{13}\text{C}$ et $\delta^{15}\text{N}$) dans les muscles des juvéniles de Flet, ont aussi permis d'évaluer les **niches isotopiques** de ce poisson dans différents micro-environnements (Teichert *et al.*, 2022).

Les différentes analyses que nous venons d'évoquer sur notre modèle biologique estuarien, le Flet (traits d'histoire de vie, biomarqueurs, signatures environnementales), sont considérées comme des **approches ciblées**, fondées sur des hypothèses préexistantes sur l'impact possible des stressseurs sur ce poisson. *A contrario*, les analyses moléculaires de types "-omiques" que nous allons présenter dans le chapitre suivant sont des **approches non ciblées**, fondées sur la découverte sans *a priori* de possibles réponses du poisson aux stressseurs. Ces dernières approches non ciblées pourraient donc nous conduire à identifier de nouveaux marqueurs d'intérêt au niveau moléculaire.

4. Approches moléculaires basées sur les analyses -omiques sur *P. flesus*

4.1. Approches moléculaires basées sur la transcriptomique et la protéomique

Les **approches moléculaires** permettent de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans les grandes fonctions cellulaires, la physiologie des organismes et plus particulièrement l'analyse du **génom**e, du **transcriptome**, ou encore du **protéome**.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes concentrés sur le transcriptome et le protéome exprimés dans le foie du Flet.

Le **transcriptome** (Figure 11) correspond à l'ensemble des ARN (ARNm, ARNr, ARNt ...) présents dans une cellule à un instant donné. La composition du transcriptome diffère selon le type cellulaire, l'état biologique et l'environnement de la cellule au moment de la mesure.

Le **protéome** (Figure 11) correspond à l'ensemble des protéines d'un organisme à un moment donné et sous des conditions données. Les protéines sont des macromolécules formées d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques composées d'acides aminés maintenus par des liaisons peptidiques. Les protéines, codées par les gènes, sont synthétisées par le ribosome pendant la traduction de l'ARN. Les protéines, impliquées dans de nombreux et divers processus métaboliques cellulaires, ont une conformation spécifique qui leur confère leur fonctionnalité.

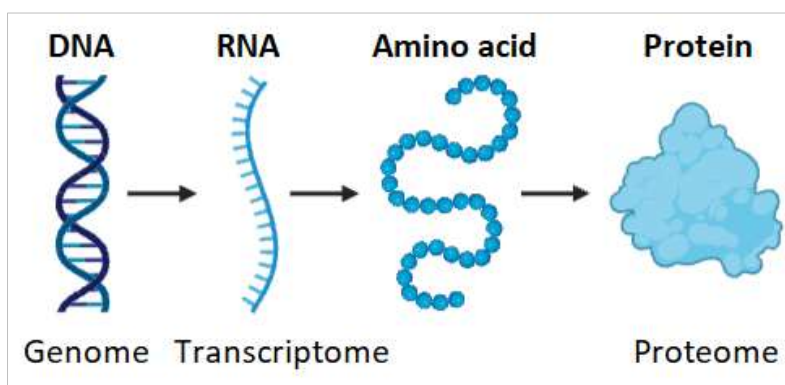


Figure 11. Représentation du processus de synthèse des protéines.

La **transcriptomique** (Figure 12) est l'étude sans *a priori* du transcriptome d'un organisme. Dans un tissu donné, la transcriptomique, permet de caractériser les niveaux de transcription et d'expression des ARN. La transcriptomique permet donc d'identifier et de quantifier les gènes impliqués dans des conditions données. Cette approche globale permet également de déterminer les mécanismes et les réseaux de régulation de l'expression des gènes. L'étude des transcrits d'ARN produits par le génotype permet de faire le lien avec le génome, le phénotype cellulaire et surtout le protéome (Lowe *et al.*, 2017 ; Dong & Chen, 2013).

La **protéomique** (Figure 12) est l'étude sans *a priori* du protéome d'un organisme. La protéomique permet d'identifier et de quantifier précisément l'ensemble des protéines présentes dans une cellule ou un tissu. Cette approche globale permet également de mettre en évidence les modifications post-traductionnelles (acétylation, phosphorylations, ponts disulfures...) apportées aux protéines produites (Pandey & Mann, 2000).

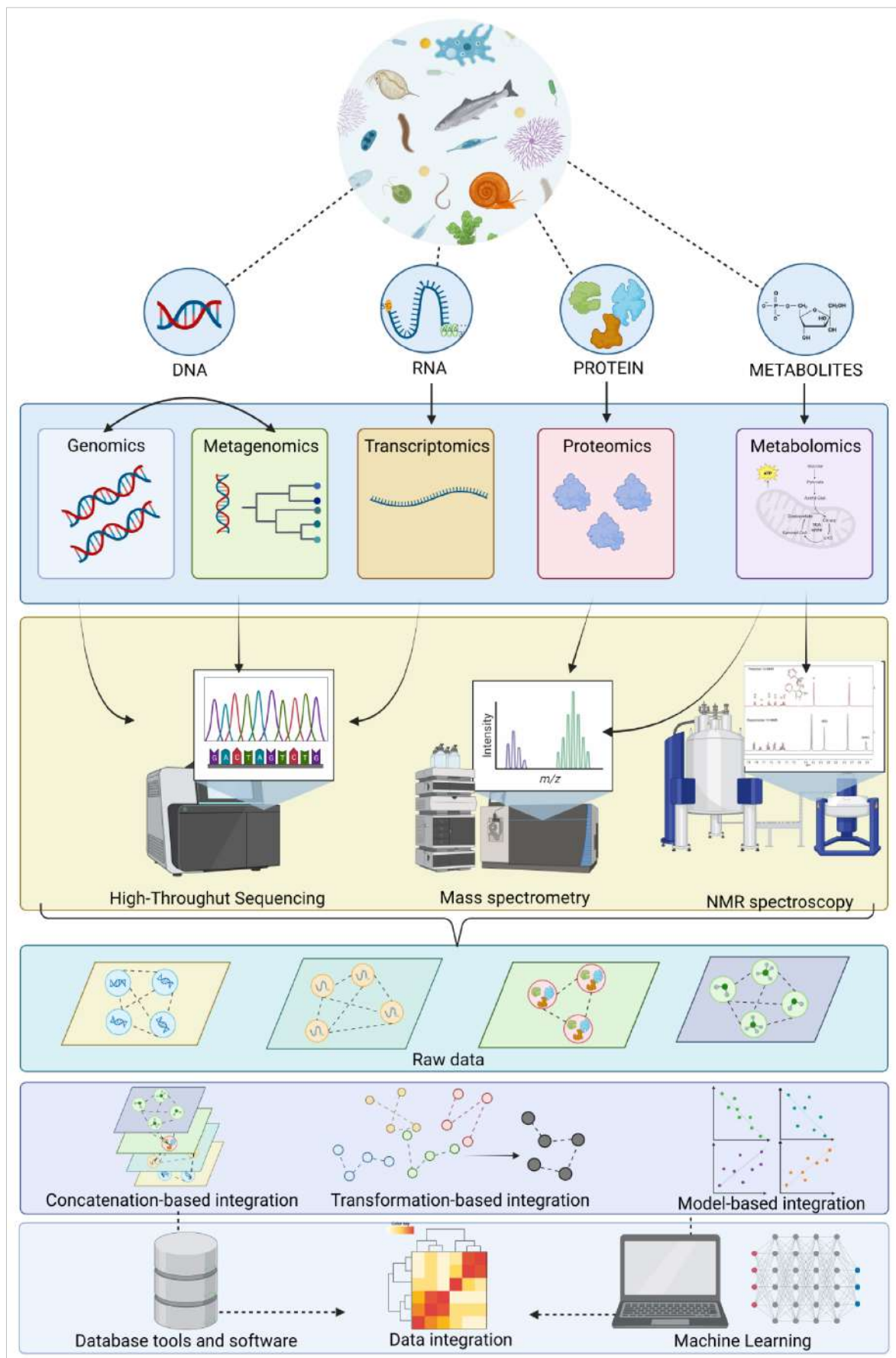


Figure 12. Représentation de l'approche multi-omique intégrative utilisée chez des animaux modèles aquatiques pour garantir une évaluation fiable des risques environnementaux dans les écosystèmes.

© Figure extraite de Machuca-Sepúlveda *et al.* (2023)

Les **approches moléculaires** (Figure 12) utilisent des méthodes à haut débit (“shotgun”), basées sur la spectrométrie de masse, pour analyser l'expression des transcrits et des protéines. L'étude et la comparaison du transcriptome et du protéome d'un organisme permet de repérer la présence, l'absence ou l'altération de certains transcrits et/ou protéines.

Le génome et l'environnement sont les deux facteurs qui déterminent les changements dans le transcriptome et protéome d'un organisme.

Lorsque l'individu est exposé à un **facteur de stress**, le **transcriptome** et le **protéome** vont varier (Gajahin Gamage *et al.*, 2022). Cela permet de connaître l'état physiologique de l'individu et d'identifier les réponses face aux différents forçages environnementaux. Les changements moléculaires chez les organismes peuvent être très subtiles, mais les outils moléculaires sont très sensibles et permettent d'étudier et de détecter la moindre modification du transcriptome et du protéome (Vailati-Riboni *et al.*, 2017).

Les outils moléculaires de type -omiques ont été largement utilisés en **écotoxicologie aquatique** pour identifier les pressions d'origine anthropique grâce aux réponses des organismes exposés (Gajahin Gamage *et al.*, 2022 ; Gouveia *et al.*, 2019 ; Zhang *et al.*, 2018 ; Tomanek, 2014, 2011). De nombreuses approches multi-omiques menées sur différentes espèces marines et estuariennes ont permis de caractériser les réponses structurelles et fonctionnelles face aux facteurs de stress complexes (Hillyer *et al.*, 2023 ; Li & Wang, 2021 ; Kim *et al.*, 2016 ; Dineshram *et al.*, 2015).

4.2. Réponses moléculaires de *P. flesus* aux multistress dans les estuaires européens (état de l'art)

Les **réponses moléculaires du Flet Européen** (*Platichthys flesus*) au multistress dans les estuaires ont été largement étudiées, grâce notamment à la transcriptomique et la protéomique.

Les **recherches** menées *in natura* sur le Flet ont mis en évidence des signatures moléculaires d'altération de certains métabolismes et de grandes fonctions biologiques pour les individus issus des estuaires les plus pollués, comparativement aux systèmes peu contaminés.

Les approches de **transcriptomique** et **protéomique globales** développées sur des foies de *P. flesus* dans des estuaires avec des niveaux de stress contrastés ont démontré une accumulation différentielle de plusieurs transcrits et protéines.

La transcriptomique hépatique chez des flets capturés dans des systèmes contaminés a mis en évidence des processus de **détoxification des xénobiotiques** (CYP450) (Borcier *et al.*, 2016).

Au même titre, un grand nombre de protéines associées à des **réactions de phase I** sont dérégulées chez des individus issus d'estuaires pollués (CYP450 et isoformes, thromboxane A synthase, diméthylaniline monooxygénase, époxyde hydrolase, oxydase) (Borcier *et al.*, 2019). Des protéines liées aux réactions de **phase II** sont aussi induites chez ces poissons (GST, UDP-glucuronosyl transférase), en présence de HAPs et PCBs (Borcier *et al.*, 2019).

Les protéomes hépatiques de *P. flesus* en condition de multistress ont également révélé une dérégulation des enzymes du **cycle de la méthionine** (AHCY, BHMT, GNMT) (Borcier *et al.*, 2019).

Cette accumulation d'enzymes pourrait refléter des processus de méthylation dans la réponse des poissons aux xénobiotiques ou une réponse face au stress oxydatif. La BHMT pourrait être un lien entre les réponses classiques à l'exposition aux xénobiotiques telles que la détoxification ou les défenses antioxydantes et les dérégulations de la méthylation telle que la méthylation épigénétique de l'ADN (Galland *et al.*, 2015). La BHMT est aussi dérégulée en réponse à l'hypoxie (Pédrón *et al.*, 2017a) et aux variations de température (Nuez-Ortín *et al.*, 2018).

Les transcriptomes hépatiques ont révélé que les individus collectés dans des zones polluées augmentent leur **métabolisme énergétique** (phosphorylation oxydative, densité mitochondriale, biosynthèse des protéines) (Borcier *et al.*, 2016). De la même manière, les protéomes hépatiques des poissons ont montré une surexpression de protéines associées au métabolisme énergétique (GST, MDH, FBA, α -énolase) (Galland *et al.*, 2015) pour contrer les effets délétères de la pollution aux HAPs, aux PCBs et aux métaux (Kerambrun *et al.*, 2011).

Les résultats de transcriptomique ont également permis de souligner les **mécanismes d'acclimatation** et/ou d'**adaptation** afin de minimiser la densité mitochondriale dans le foie et maximiser l'activité par mitochondrie dans la région la plus méridionale de son aire de répartition (Borcier *et al.*, 2016).

La protéomique a aussi montré une augmentation globale des protéines liées au **métabolisme énergétique** en condition de stress thermique et hypoxique. Ces protéines sont, entre autres, des enzymes associées à la production de glucose (FBPase) et à la voie des pentoses phosphates (Transcétolase) (Pédrón *et al.*, 2017a).

L'augmentation du **métabolisme aérobie** s'accompagne généralement d'une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). En réponse, il a été observé une surexpression d'enzymes antioxydantes (CAT, GPX, GSH, GST, SOD) (Pédrón *et al.*, 2017a).

Les transcriptomes hépatiques de flets issus de milieux estuariens contaminés ont révélé une importante dérégulation des transcrits associés à la **réponse immunitaire** (apoptose, DIABLO) (Williams *et al.*, 2014). La protéomique a également révélé une dérégulation des mécanismes de défense des poissons exposés à des polluants. Des changements d'expression de plusieurs protéines du complément (1Q, C3, C5) et de protéines liées à l'agrégation plaquettaire (facteur de coagulation X, fibrinogène, fibronectine, antithrombine) ont été observés (Borcier *et al.*, 2019).

La protéomique hépatique chez le Flet a également permis de souligner l'impact des polluants estuariens sur la **reproduction** de cette espèce. En effet, dans les systèmes les plus pollués, une forte accumulation de protéines appartenant à la superfamille VMO-I a été mise en évidence (Galland *et al.*, 2015). Cette dérégulation protéique révèle la présence de perturbateurs endocriniens dans de grands systèmes estuariens très anthropisés, tels que la Seine.

Les protéomes de *P. flesus* ont également permis d'identifier des changements d'abondance d'**autres protéines**, généralement **non ciblées**, suite à une exposition à des contaminants. Ces protéines peuvent avoir une fonction de structure (chaîne alpha-5 de la tubuline - cytosquelette),

de signalisation (ligands), de transport des acides gras, *etc.* (Borcier *et al.*, 2019 ; Pédrón *et al.*, 2017a).

Les **approches –omiques** sans *a priori* présentent un avantage non négligeable en alertant précocement d'un effet toxique, avant qu'il ne devienne détectable à des niveaux physiologiques plus élevés chez le poisson.

Les **analyses à haut débit** ont permis d'**intégrer les réponses** de plusieurs biomarqueurs et de corréler les données phénotypiques et moléculaires, afin de documenter les mécanismes de toxicité des contaminants. Cela a également permis de révéler les **cascades d'événements biochimiques** associés à la régulation du protéome et d'identifier de nouveaux biomarqueurs spécifiques aux polluants et aux espèces.

Les approches moléculaires sont donc devenues un outil pertinent et précis de **diagnostic** en **écotoxicologie**. Les données moléculaires sont aussi utiles pour évaluer et surveiller les risques environnementaux, en plus des risques toxiques, deux objectifs d'intérêt majeur en **écologie du stress** (Ebner *et al.*, 2021 ; Gouveia *et al.*, 2019).

5. Ecologie du stress et diagnostic écologique des systèmes estuariens

5.1. Bon état écologique des écosystèmes, écotoxicologie, écologie du stress et biosurveillance

La DCE définit l'**état écologique** comme l'expression de la qualité de la structure et du fonctionnement des écosystèmes (Circulaire DCE 2005/12 n°14 du 28/07/2005).

La notion de **bon état écologique** est définie comme étant un état proche d'un **état de référence**, peu ou pas perturbé par des activités d'origine anthropique. Le bon état correspond donc au bon fonctionnement des écosystèmes au niveau biologique, physique, chimique et sanitaire. La structure des communautés biologiques (densité, nombre d'espèces...) et les aspects fonctionnels (production, consommation, épuration...) permettent de caractériser cet état.

Notons que la DCE incite les États membres de l'Union Européenne à améliorer la **qualité écologique** des milieux aquatiques, et plus particulièrement celle des **systèmes estuariens**, en leur imposant des objectifs de bons résultats.

Le **bon état écologique** est également associé au suivi de certaines substances chimiques, appelées polluants spécifiques de l'état écologique. Ces substances sont considérées comme dangereuses si elles sont déversées en quantité significative dans les masses d'eau.

Le suivi de l'**état chimique** des masses d'eau permet de vérifier le respect des concentrations fixées par les directives européennes sur les substances toxiques. La concentration de ces polluants ne doit pas dépasser les **normes de qualité environnementale** (NQE), et concernent pas moins de 41 substances (Directive EU 2008/105/CE du Parlement Européen).

Afin de définir l'**état écologique** et l'**état chimique** d'un système, de nouvelles disciplines ont été développées : l'écotoxicologie et l'écologie du stress.

L'**écotoxicologie**, à l'interface entre écologie et toxicologie, est l'étude des conséquences écologiques d'une pollution environnementale. L'écotoxicologie analyse les effets toxiques des xénobiotiques sur les organismes ainsi que leurs voies de transfert et leurs interactions au sein de l'environnement. Or, les substances toxiques interagissent souvent avec des stressseurs naturels (température, salinité, pH, oxygène...).

L'**écologie du stress** a donc pour objectif de comprendre et de prédire les effets des stressseurs environnementaux (chimiques et non chimiques) sur les écosystèmes (Walker *et al.*, 2012 ; Van Straalen, 2003). Les réponses des organismes reflètent la nature des facteurs de stress, leur intensité, la durée d'exposition et la capacité du système à réagir. Les études en écologie du stress, abordées au moyen d'une **approche multidisciplinaire** et de manière analytique et quantitative, permettent d'obtenir des résultats intégratifs. Le cadre **multidimensionnel** de l'écologie du stress permet de distinguer les effets liés aux pollutions d'origine anthropique des facteurs naturellement variables (Van Straalen & Van Gestel, 2008).

La **biosurveillance** (ou **biomonitoring**) est un outil puissant en écotoxicologie aquatique et en écologie du stress pour poser un diagnostic d'exposition et en mesurer les effets sur le terrain. Le biomonitoring implique l'utilisation d'organismes vivants (flore et/ou faune) en tant qu'espèces sentinelles dans la surveillance de la qualité de l'eau afin d'évaluer les changements (temporels ou spatiaux) dans une masse d'eau et les risques pour le biote (Wepener, 2013). Cette biosurveillance peut être **passive** ou **active**.

Le **biomonitoring passif** consiste à échantillonner des **espèces indigènes** (ou **résidentes**) afin d'étudier les effets de leur environnement sur leur physiologie et leur biochimie (Besse *et al.*, 2012). Au cours de leur croissance, les organismes vont intégrer différents éléments, qu'il nous est possible de mesurer, nous renseignant sur leur environnement. La biosurveillance passive bénéficie également de la capacité des organismes à accumuler divers contaminants. Cependant, le biomonitoring passif présente plusieurs limites, telles que la disponibilité des **espèces d'intérêt** (ou **bio-indicatrices**), l'impact lié à l'effort de prélèvement sur les populations et l'hétérogénéité inter-individuelle ou inter-populationnelle.

Le **biomonitoring actif** consiste à déplacer des organismes d'un endroit considéré comme de "référence" (*i.e.* non stressé) vers des sites plus ou moins stressés, afin de quantifier les réponses biochimiques et physiologiques pour surveiller la qualité de l'eau. Les conséquences de cette **translocation** sont alors suivies, dans le temps et l'espace, grâce à différents paramètres pour déterminer l'effet des conditions environnementales sur les individus. Les organismes de surveillance biologique peuvent provenir de laboratoire, d'écloserie ou de sites de référence (Wepener, 2013). Les individus sont ensuite engagés sur le lieu de l'étude, afin d'étudier précisément ce site, on parle d'expérience d'**encagement** ou de "**caging**".

5.2. Diagnostic de l'état écologique et paradoxe de la qualité écologique des systèmes estuariens

Etablir le diagnostic de l'**état écologique** des **estuaires** est un exercice difficile de par le caractère changeant des milieux de transition (hydro-morphologie, physico-chimie, biologie) et la diversité des pressions anthropiques, il s'agit du paradoxe de la qualité estuarienne (Dauvin & Ruelllet, 2009 ; Elliott & Quintino, 2007).

Le **paradoxe de la qualité des estuaires** signifie qu'il est parfois difficile de distinguer les effets sur le biote de la forte **variabilité environnementale naturelle** vs des **stresseurs anthropiques**. De ce fait, les organismes les plus tolérants face à la variabilité seraient aussi les plus résistants vis-à-vis des stresseurs. En effet, la faune et la flore estuariennes sont naturellement adaptées à ces écosystèmes variables dans l'espace et le temps. De plus, les communautés faunistiques et florales peuvent être relativement proches dans les milieux stressés vs non stressés. Les méthodes d'évaluation de l'impact du multistress sur le biote doivent donc être analysées avec précaution dans les milieux estuariens (Elliott & Quintino, 2018).

Il est donc essentiel de développer des **méthodes** efficaces pour distinguer les différents stressés et ainsi déterminer la **qualité écologique** des estuaires. Ces méthodes englobent divers indicateurs et des espèces sentinelles de ces milieux. Le **Flet** apparaît comme adapté et pertinent pour répondre à cet objectif.

Dans le but de mettre en place, de développer et d'appliquer des **outils en écologie du stress**, pertinents et efficaces, pour le **diagnostic** de l'état écologique des estuaires, nous avons réalisé plusieurs études sur différents hydrosystèmes, caractérisés dans le chapitre suivant.

5.3. Systèmes estuariens retenus dans cette étude

Dans le cadre de cette thèse, nous avons sélectionné 13 estuaires situés dans le quart Nord-Ouest de la France, afin de mettre en place un **monitoring** passif et actif. Cette étude porte, d'une part sur un **grand estuaire** et un estuaire de **taille moyenne**, et d'autre part sur de **petits estuaires** (Figure 13). Nous avons choisi différents systèmes présentant des environnements et des niveaux d'anthropisation contrastés.

Notre choix s'est orienté en Manche Est sur les estuaires de **Canche** et de **Seine**, et sur 11 estuaires en Région Bretagne ; le **Gouessant**, la **Penzé**, l'**Horn**, le **Guillec**, la **Flèche**, le **Quillimadec**, l'**Aber Wrac'h**, la **Douffine**, l'**Aven**, le **Scorff** et le **Noyal**.

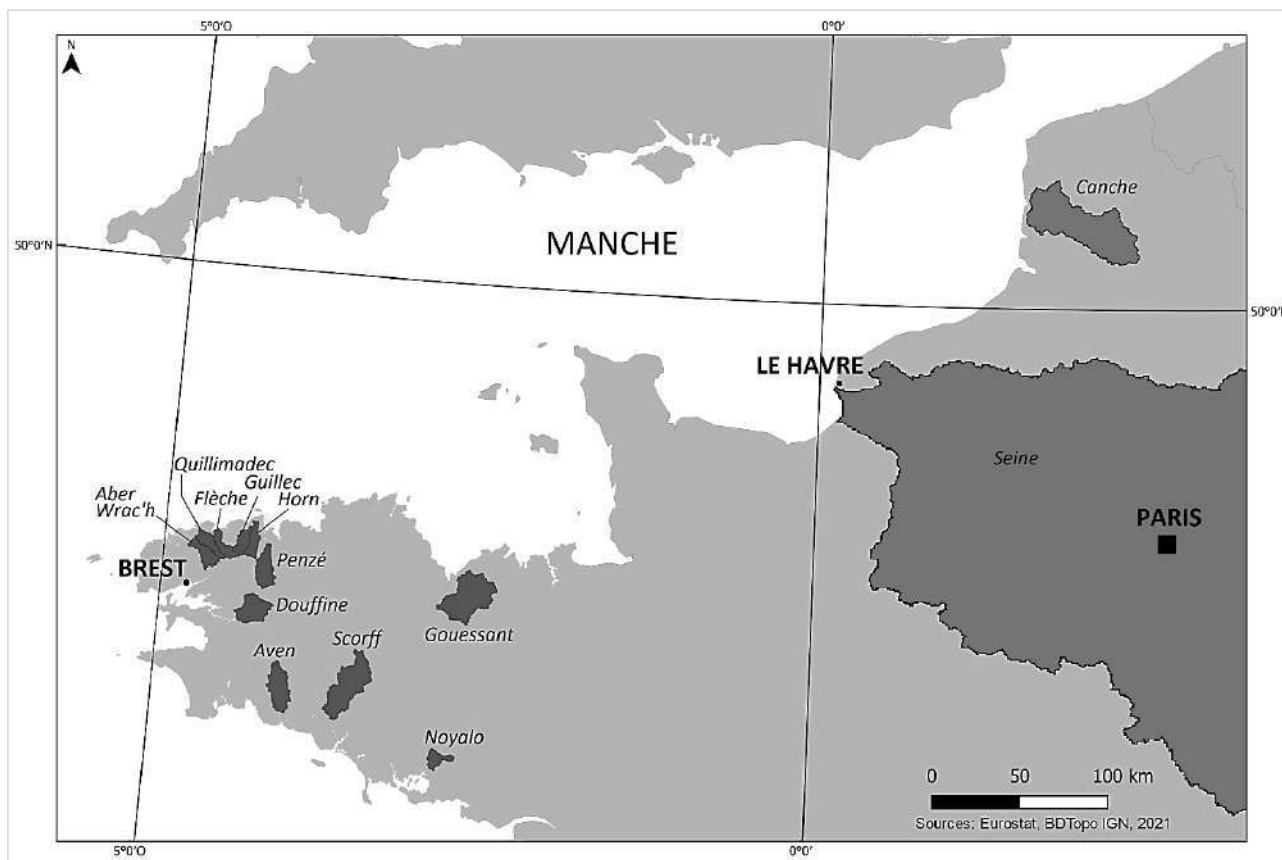


Figure 13. Localisation des bassins versants des estuaires étudiés ; Canche (Pas-de Calais), Seine (Seine-Maritime), Gouessant (Côtes d'Armor), Penzé, Horn, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine, Aven (Finistère), Scorff, Noyal (Morbihan), et des principales villes (Paris, Le Havre et Brest).

L'estuaire de la **Canche** (Figure 14), situé dans le Pas-de-Calais, est un système de taille moyenne, avec un bassin versant de 1 399 km². L'estuaire de la Canche est un système *a priori* considéré comme peu stressé. Cependant, le bassin de la Canche comporte de grandes parcelles de type polyculture, et plus particulièrement des cultures céréalières. L'activité agricole entraîne une contamination diffuse liée aux rejets de produits phytosanitaires et de nitrates. Des activités portuaires et une marina à Etaples sont également présentes au sein de ce système, en aval de l'estuaire. La Canche est par ailleurs caractérisée par un faible développement urbain et l'absence d'industrialisation (Amara *et al.*, 2007). De plus, l'estuaire de la Canche a une fonction écologique clé en tant que zone de nurserie pour différentes espèces de poissons, dont le Flet (Selleslagh & Amara, 2015 ; Selleslagh & Amara, 2008).

L'estuaire de la Canche abrite aussi une Réserve Naturelle Nationale (RNN) de 505 ha. Créée en 1987, la Réserve de la Baie de Canche (Décret n° 87-534, du 09/07/1987) concentre des habitats littoraux halophiles. Ces milieux sont d'un grand intérêt pour de nombreuses espèces végétales, de mammifères, d'amphibiens et d'oiseaux.



Figure 14. Carte topographique IGN de l'estuaire de la Canche, des principales villes aux alentours (Etaples et Le Touquet-Paris-Plage) et de la RNN de la Baie de Canche.

© IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

L'estuaire de la **Seine** (Figure 15), situé en Seine-Maritime, est un système de grande taille, avec un bassin versant de 76 238 km². La partie estuarienne correspond aux 170 derniers kilomètres de la Seine. L'estuaire est délimité par le barrage de Poses en amont et par la Baie de Seine en aval. Le bassin versant de la Seine, fortement peuplé, concentre 8 138 communes (dont Paris) pour plus de 18 millions d'habitants. La densité de population du bassin de la Seine est donc de 225 habitants par km², soit le double de la moyenne nationale (PIREN-Seine, 2018). Le bassin versant de la Seine est également très industrialisé, avec de nombreuses industries pétrochimiques et des activités portuaires soutenues (Le Havre et Rouen). La forte démographie et les nombreuses activités industrielles engendrent de multiples rejets de contaminants chimiques d'origine domestique, industrielle et agricole. Cette multi-contamination (métaux, HAPs, PCBs, médicaments, *etc.*) fait de la Seine un des estuaires les plus pollués d'Europe (Labadie *et al.*, 2020 ; Fisson *et al.*, 2014a : 2014b ; Le Pape *et al.*, 2007). De plus, la Seine joue un rôle écologique majeur en Manche. En effet, l'estuaire de la Seine est une zone de nurserie pour plusieurs espèces marines d'intérêt halieutique, telles

que la Sole commune, la Limande-sole ou encore le Bar commun.

L'estuaire de la Seine abrite également une RNN d'une superficie de 8 528 ha. La Réserve de l'Estuaire de la Seine (*Décret n°97-1329, du 30/12/1997*), créée en 1997, comporte des vasières, des prés salés, des roselières et des prairies humides. Ces habitats, fortement productifs, concentrent une grande richesse avec 385 espèces de papillons, 325 espèces d'oiseaux, 70 espèces de poissons, 48 espèces de mammifères et 13 espèces d'amphibiens.

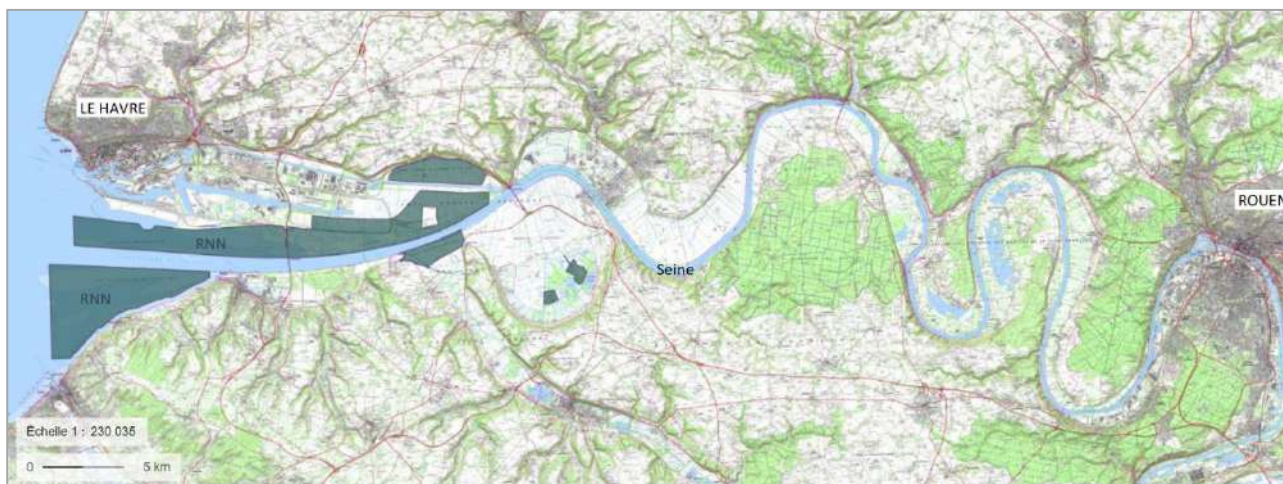


Figure 15. Carte topographique IGN de l'estuaire de la Seine, des principales villes aux alentours (Le Havre et Rouen) et de la RNN de l'Estuaire de Seine.

© IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

Les **petits hydrosystèmes** situés en Bretagne, sélectionnés pour cette étude, présentent peu d'intérêt économique ou commercial. Ces systèmes ont, par conséquent, été très peu étudiés dans le passé.

Notre faible connaissance historique sur ces milieux sera compensée par le grand nombre de systèmes étudiés, d'où le choix de mener une comparaison de l'état écologique de **onze fleuves côtiers** en région Bretagne.

L'estuaire du **Gouessant** (Figure 16), situé dans les Côtes d'Armor, se jette dans la Manche au niveau de la baie de Morieux et de Saint-Brieuc. Le fleuve côtier du Gouessant fait partie d'un petit bassin versant de 420 km², fortement agricole. Le bassin du Gouessant comporte ainsi un grand nombre d'élevages (porcins) et de parcelles de monocultures (principalement de maïs). En outre, le cours d'eau du Gouessant est fragmenté par deux barrages. Le plus grand de ces édifices est le barrage de la centrale hydroélectrique de Pont-Rolland, près de Hillion, à 2 km de l'embouchure de l'estuaire. Le Gouessant présente également des enjeux de marées vertes, dans sa partie avale qui communique avec la Baie de Saint-Brieuc ; c'est donc un système clairement stressé. Enfin, cet estuaire fait partie d'une RNN de 1 140 ha. Créée en 1998, la Réserve de la Baie de Saint-Brieuc (*Décret n°98-324, du 28/04/1998*) regroupe des roselières, des vasières, des prés salés et des dunes. Ces milieux sont foisonnants, et concentrent 350 espèces végétales, des amphibiens et des invertébrés. Cette richesse attire un grand nombre d'oiseaux et de mammifères (phoques et loutres).



Figure 16. Carte topographique IGN de la Baie de Saint-Brieuc, de l'estuaire du Gouessant, des principales villes aux alentours (Saint-Brieuc, Hillion et Morieux) et de la RNN de la Baie de Saint-Brieuc.

© IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

L'estuaire de la **Penzé** (Figure 17), situé dans le Finistère, se jette dans la Manche à proximité de la Baie de Morlaix. Ce système estuarien appartient à un bassin versant d'une faible superficie de 146 km². Le bassin de la Penzé est très agricole, avec de nombreuses cultures et des élevages. Le système de la Penzé est donc exposé à des pesticides et à des intrants agricoles azotés. L'estuaire de la Penzé fait ainsi partie des milieux stressés de l'étude.



Figure 17. Carte topographique IGN de l'estuaire de la Penzé et des principales villes aux alentours (Saint-Pol-de-Léon et Carantec). © IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

Les estuaires de l'**Horn** et du **Guillec** (Figure 18), situés dans le Finistère, se jettent dans la Manche à proximité de l'île de Sieck. Ces systèmes estuariens appartiennent à des bassins versants de très faible superficie, 76 et 72 km² respectivement. Situés dans le Pays de Léon, ces deux fleuves côtiers s'écoulent en pleine zone de production légumière intensive. Ces systèmes sont donc exposés à de nombreux pesticides et à des apports en intrants agricoles azotés. L'Horn et le Guillec peuvent à première vue être considérés comme des systèmes stressés.



Figure 18. Carte topographique IGN des estuaires de l'Horn et du Guillec et des principales villes aux alentours (Saint-Pol-de-Léon, Santec, Plougoulm et Cléder).

© IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

Les estuaires de la **Flèche** et du **Quillimadec** (Figure 19), également situés dans le Finistère, se jettent dans la Manche, respectivement dans la Baie de Goulven et dans l'Anse de Tresseny. Ces deux fleuves côtiers font partie de très petits bassins versants, de 73 et 79 km² respectivement, présentant une agriculture légumière intensive, et une pression de l'élevage importante notamment pour la Flèche. La Flèche et le Quillimadec sont des systèmes eutrophisés, avec une problématique de marées vertes en aval, particulièrement pour le Quillimadec. Ces deux hydrosystèmes sont donc considérés, *a priori*, comme stressés.



Figure 19. Carte topographique IGN des estuaires de la Flèche et du Quillimadec et des principales villes aux alentours (Tréfléz, Kerlouan et Guissény).

© IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

L'estuaire de l'**Aber Wrac'h** (Figure 20), situé dans le Finistère, se jette en Mer Celtique. Le bassin versant de l'Aber Wrac'h, de 95 km², est à la fois urbanisé et agricole. Ce système apparaît, de prime abord, comme modérément eutrophisé. En outre, l'Aber Wrac'h présente des enjeux socio-économiques et plus particulièrement une activité conchylicole importante dans sa partie avale et dans la baie qui suit.



Figure 20. Carte topographique IGN de l'estuaire de l'Aber Wrac'h (et de l'Aber Benoît) et des principales villes aux alentours (Plougerneau, Lannilis, Landéda et St-Pabu).

© IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

Le cours d'eau de la **Douffine** (Figure 21), situé dans le Finistère, est un affluent de l'Aulne qui se jette dans la rade de Brest. Le bassin versant de la Douffine, d'une superficie de 173 km², est un système dégradé et relativement atypique. Il présente une pression agricole moindre relativement aux bassins versants précédents, mais est impacté par une activité piscicole très soutenue, ainsi que par des effluents d'origine industrielle en aval. Notons que d'anciennes activités minières sur le bassin de l'Aulne contribuent à une contamination métallique soutenue des eaux de la Douffine.



Figure 21. Carte topographique IGN de la Douffine, un affluent de l'Aulne, et des principales villes aux alentours (Pont-de-Buis-Lès-Quimerch et Le Faou). © IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

L'estuaire de l'**Aven** (Figure 22), situé dans le Finistère, se jette dans l'océan Atlantique au niveau de Port Manec'h. Le fleuve côtier de l'Aven appartient également à un bassin versant de petite taille, de 193 km². L'Aven est alimenté par de nombreux affluents, tels que le Ster Goz et le Pénanros. Le cours de l'Aven est également barré par une digue à la hauteur de Rosporden, donnant naissance à un étang d'une superficie de 45 hectares. De plus, le bassin de l'Aven est considéré comme modérément anthropisé, avec une agriculture orientée principalement sur les petits légumes. Ce système pourrait être, *a priori*, considéré comme peu stressé.



Figure 22. Carte topographique IGN de l'estuaire de l'Aven (et de Belon) et des principales villes alentours (Riec-sur-Belon, Pont-Aven et Tregunc). © IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

L'estuaire du **Scorff** (Figure 23), situé dans le Morbihan, se jette dans la rade de Lorient. Le Scorff est historiquement considéré comme une rivière à Saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) emblématique de la Bretagne (Caudal & Prévost, 2003 ; Baglinière & Arribe-Moutounet, 1985). Une station de contrôle des migrateurs de l'INRAe, installée près de Pont-Scorff (Pont-Croix), réalise régulièrement des suivis de la migration des saumons. Le bassin versant du Scorff, d'une superficie de 378 km², est relativement peu anthropisé. La forte proportion de milieux naturels au sein du bassin du Scorff laisse à penser que l'estuaire est *a priori* peu stressé.

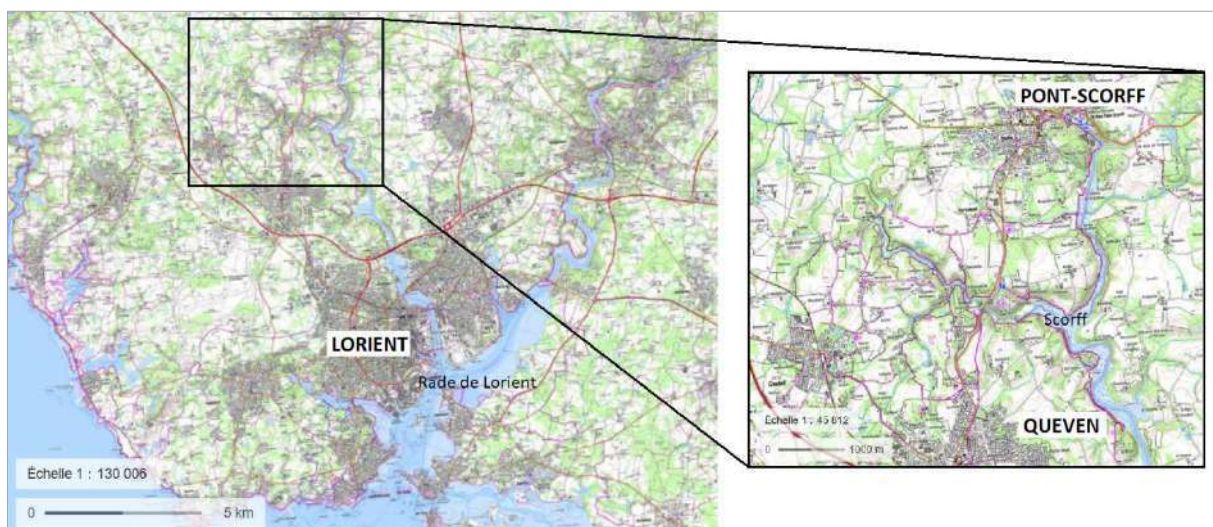


Figure 23. Carte topographique IGN de l'estuaire du Scorff (et la Rade de Lorient) et des principales villes alentours (Pont-Scorff, Quéven et Lorient). © IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

L'estuaire de **Noyalo** (Figure 24) est situé dans le Morbihan. La rivière, et plus particulièrement l'estuaire de Noyalo, se forme lorsque le Liziec rejoint le chenal de Saint-Léonard. Le cours d'eau de Noyalo se jette dans le Golfe du Morbihan au niveau de la Réserve Naturelle des Marais de Séné. Une grande partie du bassin versant du Liziec (qui alimente la rivière de Noyalo), d'une superficie totale de 69 km², comporte la zone artisanale de Vannes. Le bassin est donc probablement soumis à une pollution chimique aux métaux, aux HAPs et à d'autres polluants organiques persistants. De plus, la région de Vannes est très touristique en période estivale, ce qui peut entraîner un dysfonctionnement des stations d'épuration qui atteignent alors leur limite de capacité, conduisant à une eutrophisation du système. Noyalo est donc clairement identifié comme un système stressé. De plus, la partie aval de l'estuaire de Noyalo est située à proximité d'une RNN d'une superficie de 410 ha. La Réserve des Marais de Séné (Décret n° 96-746, du 21/08/1996), créée en 1996, est principalement composée de vasières, de prés-salés, d'anciens marais salants et de prairies. La réserve constitue ainsi un pôle de biodiversité pour la flore, les invertébrés, les amphibiens, les reptiles et de multiples oiseaux.



Figure 24. Carte topographique IGN de l'estuaire de Noyalo (et le Golfe du Morbihan), des principales villes aux alentours (Theix-Noyalo, Séné, Vannes et Aradon) et de la RNN des Marais de Séné.

© IGN, Planet Observer (Source Géoportail).

6. Organisation et objectifs de l'étude

Cette thèse vise à développer des méthodes et des outils afin d'évaluer la **qualité de l'eau** et la **qualité écologique** en estuaires de Seine et de Canche et de divers fleuves côtiers bretons.

Ce travail s'inscrit pleinement dans la thématique de l'**écologie du stress**, et analyse de façon approfondie les **signatures environnementales** et **moléculaires** chez une espèce sentinelle, le Flet Européen (*Platichthys flesus*), dans ces différents écosystèmes estuariens.

Au cours de cette thèse, **différentes techniques** ont été employées, certaines couramment utilisées en écotoxicologie et en écologie du stress (biomarqueurs, isotopes stables, éléments traces...), et d'autres plus novatrices, comme les approches omiques (transcriptomique, protéomique) et les analyses d'acides gras.

En outre, le comparatif des petits fleuves côtiers bretons se distingue par le **couplage** de la **géographie** des bassins versants, de l'**hydrobiologie** des cours d'eau, de la **chimie** des polluants et de la **biologie** du Flet.

Afin de répondre à l'ensemble des problématiques soulevées au cours de nos travaux, ce manuscrit de thèse se découpe en **quatre grandes parties**.

Le **chapitre I** se concentre sur les méthodes visant à **évaluer la qualité de l'eau et la qualité écologique d'un grand système estuarien**, et plus particulièrement celui de la Seine, dans le cadre du projet HQ Fish. Dans cette première partie, les objectifs sont les suivants :

- (1) améliorer nos connaissances sur les réponses des populations de poissons aux multistress, en considérant le cycle biologique du Flet,
- (2) explorer la résilience de ces populations face à un environnement en évolution rapide.

Dans le **chapitre II**, nous explorons une méthodologie dans le cadre du **suivi de l'impact d'une pollution accidentelle sur la Seine** (Incendie LUBRIZOL-NORMANDIE Logistique). Les objectifs de ce chapitre sont les suivants :

- (1) mettre en place une expérience de caging sur des flets juvéniles, en situation de post-accident,
- (2) explorer la pertinence du couplage caging sur le Flet - protéomique hépatique pour évaluer l'impact de la pollution accidentelle sur le biote.

Le **chapitre III**, se focalise sur la **qualité de l'eau et la qualité écologique de petits estuaires bretons**, dans le cadre des projets POPEST et ECOEST. Dans cette troisième partie, les objectifs sont :

- (1) catégoriser les petits estuaires à travers l'analyse de différents paramètres environnementaux (géographie des bassins versants, hydrobiologie, chimie des polluants, biologie du Flet),
- (2) identifier les principaux facteurs de stress spécifiques à chaque estuaire,
- (3) définir un système de référence, peu impacté par les stressseurs,
- (4) étudier les dérégulations moléculaires du Flet en estuaires stressés vs estuaire de référence,
- (5) intégrer les signatures environnementales et les réponses moléculaires pour établir une typologie précise de la qualité écologique des estuaires bretons.

Le **chapitre IV** se concentre sur **l'analyse des lipides et acides gras sur le Flet, un nouvel outil prometteur pour évaluer la qualité de l'eau dans les petits systèmes estuariens**, dans le cadre du projet ECOEST. Dans cette dernière partie, les objectifs sont les suivants :

- (1) quantifier les profils d'acides gras dans le muscle du Flet dans les estuaires bretons,
- (2) explorer la pertinence des lipides et des acides gras en tant qu'indicateurs de l'état écologique des estuaires.

Pour conclure ce manuscrit, une **discussion générale** sera menée sur l'ensemble de ce travail de thèse, suivie de **perspectives** de recherche.

Afin de faciliter la compréhension de l'organisation de cette thèse, des divers projets et de mon implication dans les analyses menées, une frise chronologique synthétique de l'ensemble de mon travail de recherche est présentée ci-dessous ([Figure 25](#)).

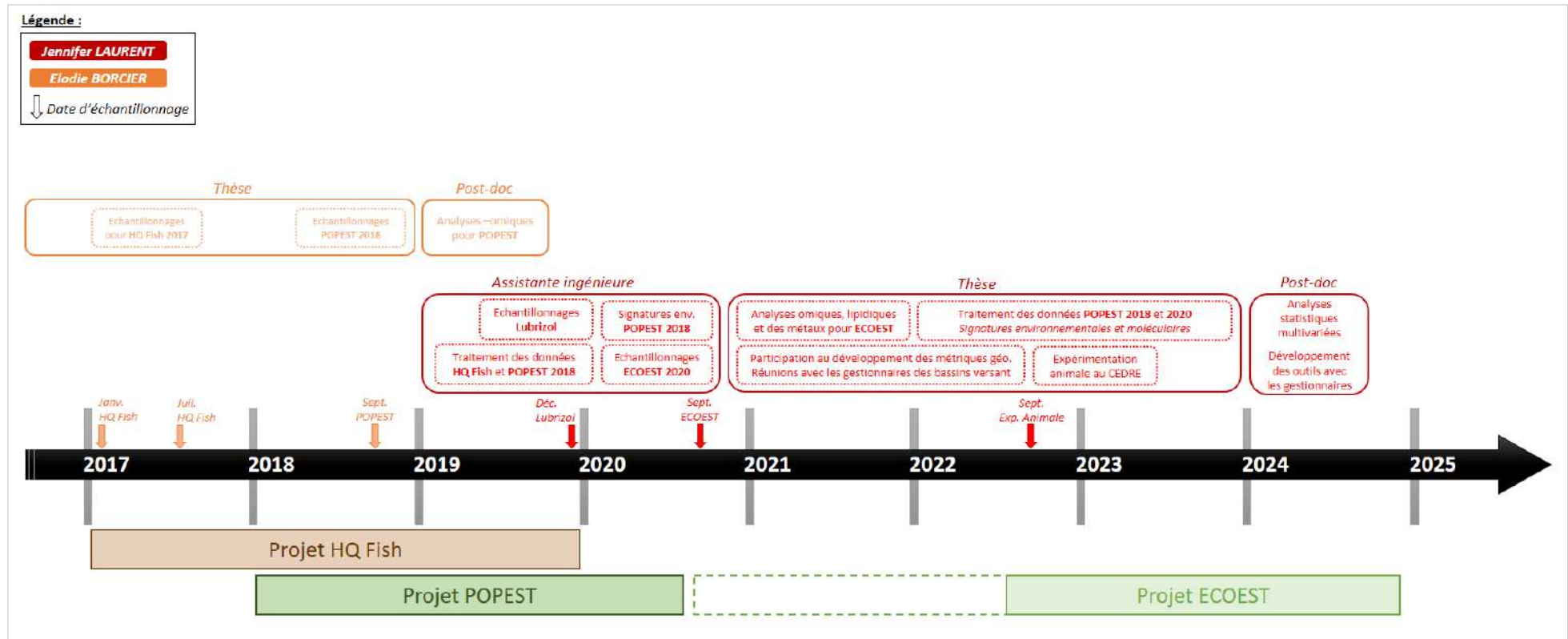


Figure 25. Frise chronologique synthétisant l'ensemble des projets, des échantillonnages et des analyses menées au cours de cette étude.

© Jennifer Laurent.

7. Références

- Aarnio, K., Bonsdorff, E., & Rosenback, N. (1996). Food and feeding habits of juvenile flounder *Platichthys flesus* (L.), and turbot *Scophthalmus maximus* (L.) in the Åland archipelago, northern Baltic Sea. *Journal of Sea Research*, 36, 311-320. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(96\)90798-4](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(96)90798-4)
- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., & Andersen, O. K. (2000). PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic toxicology*, 51(2), 241-258. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00108-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00108-9)
- Akcha, F., Hubert, F. V., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2003). Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 534(1-2), 21-32. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(02\)00244-9](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(02)00244-9)
- Altenritter, M. E., Cohuo, A., & Walther, B. D. (2018). Proportions of demersal fish exposed to sublethal hypoxia revealed by otolith chemistry. *Marine Ecology Progress Series*, 589, 193-208. <https://doi.org/10.3354/meps12469>
- Altieri, A. H., & Gedan, K. B. (2015). Climate change and dead zones. *Global change biology*, 21(4), 1395-1406. <https://doi.org/10.1111/gcb.12754>
- Amara, R., Méziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., & Laffargue, P. (2007). Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series*, 351, 201-208. <https://doi.org/10.3354/meps07154>
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., & Minier, C. (2009). Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia*, 627, 87-98. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9717-9>
- Amat, A., Burgeot, T., Castegnaro, M., & Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). DNA adducts in fish following an oil spill exposure. *Environmental Chemistry Letters*, 4(2), 93-99.
- Amoatey, P., & Baawain, M. S. (2019). Effects of pollution on freshwater aquatic organisms. *Water Environment Research*, 91(10), 1272-1287. <https://doi.org/10.1002/wer.1221>
- Andersson, T., Förlin, L., Härdig, J., & Larsson, Å. (1988). Physiological disturbances in fish living in coastal water polluted with bleached kraft pulp mill effluents. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45(9), 1525-1536. <https://doi.org/10.1139/f88-181>
- Anderson, T. A., Salice, C. J., Erickson, R. A., McMurry, S. T., Cox, S. B., & Smith, L. M. (2013). Effects of land use and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains. *Chemosphere*, 92(1), 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.054>
- Ansell, A. D. (1995). Surface activity of some benthic invertebrate prey in relation to the foraging activity of juvenile flatfishes. *Eleftheriou, A., Ansell, A., Smith, C.J. (Eds.), Biology and Ecology of Shallow Coastal Waters, Proceedings of the 28th European Marine Biologist Symposium. Olsen and Olsen, Fredensborg, Denmark.* 245-252.
- Ansell, A. D., & Trevallion, A. (1967). Studies on *Tellina tenuis* Da Costa I. Seasonal growth and biochemical cycle. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1(2), 220-235. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(67\)90016-0](https://doi.org/10.1016/0022-0981(67)90016-0)
- Arslan, Z., & Secor, D. H. (2005). Analysis of trace transition elements and heavy metals in fish otoliths as tracers of habitat use by American eels in the Hudson River estuary. *Estuaries*, 28, 382-393. <https://doi.org/10.1007/BF02693921>
- Authman, M. M., Zaki, M. S., Khallaf, E. A., & Abbas, H. H. (2015). Use of fish as bio-indicator of the effects of heavy metals pollution. *Journal of Aquaculture Research & Development*, 6(4), 1-13. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546.1000328>
- Bagliniere, J. L., & Arribe-Moutounet, D. (1985). Microrépartition des populations de truite commune (*Salmo trutta* L.) de juvéniles de saumon atlantique (*Salmo salar* L.) et des autres espèces présentes dans la partie haute du Scorff (Bretagne). *Hydrobiologia*, 120, 229-239. <https://doi.org/10.1007/BF00045166>
- Balta, Z. D., Akhan, S., & Balta, F. (2017). The physiological stress response to acute thermal exposure in Black Sea trout (*Salmo trutta labrax* Pallas, 1814). *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 41(3), 400-406. <https://doi.org/10.3906/vet-1606-32>
- Bard, B., & Kieffer, J. D. (2019). The effects of repeat acute thermal stress on the critical thermal maximum (CTmax) and physiology of juvenile shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*). *Canadian Journal of Zoology*, 97(6), 567-572. <https://doi.org/10.1139/cjz-2018-0157>

- Baršienė, J., Lehtonen, K. K., Koehler, A., Broeg, K., Vuorinen, P. J., Lang, T., Pempkowiak, J., Šyvokienė, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Repečka, R., Vuontisjärvi, H., & Kopecka, J. (2006). Biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus*) and mussel (*Mytilus edulis*) in the Klaipėda-Būtingė area (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin*, 53(8-9), 422-436. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.03.009>
- Beck, M. W., Heck, K. L., Able, K. W., Childers, D. L., Eggleston, D. B., Gillanders, B. M., Halpern, B., Hays, C. G., Hoshino, K., Minello, T. J., Orth, R. J., Sheridan, P. F. & Weinstein, M. P. (2001). The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates: a better understanding of the habitats that serve as nurseries for marine species and the factors that create site-specific variability in nursery quality will improve conservation and management of these areas. *Bioscience*, 51(8), 633-641. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0633:TICAMO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0633:TICAMO]2.0.CO;2)
- Beeby, A. (2001). What do sentinels stand for?. *Environmental pollution*, 112(2), 285-298. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00038-5](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00038-5)
- Benedetti, M., Giuliani, M. E., & Regoli, F. (2015). Oxidative metabolism of chemical pollutants in marine organisms: molecular and biochemical biomarkers in environmental toxicology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1340(1), 8-19. <https://doi.org/10.1111/nyas.12698>
- Besse, J. P., Geffard, O., & Coquery, M. (2012). Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry*, 36, 113-127. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.04.004>
- Blanck, A., Tedesco, P. A., & Lamouroux, N. (2007). Relationships between life-history strategies of European freshwater fish species and their habitat preferences. *Freshwater biology*, 52(5), 843-859. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01736.x>
- Blanco-Canqui, H. (2018). Cover crops and water quality. *Agronomy Journal*, 110(5), 1633-1647. <https://doi.org/10.2134/agronj2018.02.0077>
- Blazer, V. S., Hoffman, J., Walsh, H. L., Braham, R. P., Hahn, C., Collins, P., Jorgenson, Z., & Ledder, T. (2014). Health of white sucker within the St. Louis River area of concern associated with habitat usage as assessed using stable isotopes. *Ecotoxicology*, 23(2), 236–251. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1167-5>
- Birch, G. F., Gunns, T. J., & Olmos, M. (2015). Sediment-bound metals as indicators of anthropogenic change in estuarine environments. *Marine pollution bulletin*, 101(1), 243-257. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.09.056>
- Bocquené, G., Chantereau, S., Clérendeau, C., Beausir, E., Ménard, D., Raffin, B., Minier, C., Burgeot, T., Pfohl Leskowitz, A., & Narbonne, J.-F. (2004). Biological effects of the “Erika” oil spill on the common mussel (*Mytilus edulis*). *Aquatic Living Resources*, 17, 309–316. <https://doi.org/10.1051/alr:2004033>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133760>.
- Borcier, E., Charrier, G., Amérand, A., Théron, M., Loizeau, V., Pédrón, N., & Laroche, J. (2016). Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: impacts of pollution and global warming. *Journal of Xenobiotics*, 6(2), 6586. <https://doi:10.4081/xeno.2016.6586>
- Borcier, E., Charrier, G., Couteau, J., Maillet, G., le Grand, F., Bideau, A., Waeles, M., le Floch, S., Amara, R., Pichereau, V., & Laroche, J. (2020). An integrated biomarker approach using flounder to improve chemical risk assessments in the heavily polluted seine estuary. *Journal of Xenobiotics*, 10 (2), 14–35. <https://doi.org/10.3390/jox10020004>.
- Bricker, S. B., Longstaff, B., Dennison, W., Jones, A., Boicourt, K., Wicks, C., Woerner, J. (2007). Effects of nutrient enrichment in the nation’s estuaries: A decade of change. *NOAA coastal ocean program decision analysis series 26. National Centers for Coastal Ocean Science*, Silver Spring, MD, USA, 328 .
- Buruaem, L. M., de Castro, Í. B., Hortellani, M. A., Taniguchi, S., Fillmann, G., Sasaki, S. T., Petti, M. A. V., de Souza Sarkis, J. E., Bicego, M. C., Maranhão, L. A., Davanzo, M. B., Nonato, E. F., Cesar, A., Costa-Lotufo, L. V., & de Souza Abessa, D. M. (2013). Integrated quality assessment of sediments from harbour areas in Santos-São Vicente Estuarine System, Southern Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 130, 179-189. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2013.06.006>
- Cabral, H. N., Vasconcelos, R., Vinagre, C., França, S., Fonseca, V., Maia, A., Reis-Santos, P., Lopes, M., Ruano, M., Campos, J., Freitas, V., Santos, P.T., & Costa, M. J. (2007). Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *Journal of Sea Research*, 57(2-3), 209-217.

- <https://doi.org/10.1016/j.seares.2006.08.007>
- Cachot, J., Chérel, Y., Larcher, T., Pfohl-Leszkowicz, A., Laroche, J., Quiniou, L., Morin, J., Schmitz, J., Burgeot, T., & Pottier, D. (2013). Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 723-737. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1287-0>
- Campana, S. E. (1999). Chemistry and composition of fish otoliths: pathways, mechanisms and applications. *Marine ecology progress series*, 188, 263-297. <https://doi.org/10.3354/meps188263>
- Capela, R., Raimundo, J., Santos, M. M., Caetano, M., Micaelo, C., Vale, C., Guimarães, L., & Reis-Henriques, M. A. (2016). The use of biomarkers as integrative tools for transitional water bodies monitoring in the Water Framework Directive context—A holistic approach in Minho river transitional waters. *Science of the total environment*, 539, 85-96. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.113>
- Caudal, A. L., & Prévost, E. (2003). État du stock de saumon atlantique (*Salmo salar*) du Scorff (Bretagne sud, France) en 2000: production de smolts, retours d'adultes, échappement, taux d'exploitation et de survie. *INRA/FDPPMA*, 56, 2000-2006.
- Cesar, A., Pereira, C. D. S., Santos, A. R., Abessa, D. M. D. S., Fernández, N., Choueri, R. B., & DelValls, T. A. (2006). Ecotoxicological assessment of sediments from the Santos and São Vicente estuarine system-Brazil. *Brazilian Journal of Oceanography*, 54, 55-63. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-87592006000100005>
- Chaalali, A., Beaugrand, G., Boët, P., & Sautour, B. (2013). Climate-caused abrupt shifts in a European macrotidal estuary. *Estuaries and Coasts*, 36, 1193-1205. <https://doi.org/10.1007/s12237-013-9628-x>
- Chen, M., Ohman, K., Metcalfe, C., Ikonou, M. G., Amatya, P. L., & Wilson, J. (2006). Pharmaceuticals and endocrine disruptors in wastewater treatment effluents and in the water supply system of Calgary, Alberta, Canada. *Water Quality Research Journal*, 41(4), 351-364. <https://doi.org/10.2166/wqrj.2006.039>
- Chung, M. T., Trueman, C. N., Godiksen, J. A., Holmstrup, M. E., & Grønkjær, P. (2019). Field metabolic rates of teleost fish are recorded in otolith carbonate. *Communications biology*, 2(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0266-5>
- Coe, T. S., Söffker, M. K., Filby, A. L., Hodgson, D., & Tyler, C. R. (2010). Impacts of early life exposure to estrogen on subsequent breeding behavior and reproductive success in zebrafish. *Environmental science & technology*, 44(16), 6481-6487. <https://doi.org/10.1021/es101185b>
- Connolly, R. M., Gorman, D., Hindell, J. S., Kildea, T. N., & Schlacher, T. A. (2013). High congruence of isotope sewage signals in multiple marine taxa. *Marine Pollution Bulletin*, 71(1-2), 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2013.03.021>
- Cooke, S.J., Fänge, N.A., Farrell, A.P., Brauner, C.J., & Eliason, E.J. (2022). Chapter 1. Conservation physiology and the management of wild fish populations in the Anthropocene. *Fish Physiology*, 39A, 1-31. Eds Farrell, A.P., Brauner, C.J., Eliason, E.J., Academic Press
- Cooper, J. A., & Chapleau, F. (1998) Monophyly and intrarelationships of the family *Pleuronectidae* (Pleuronectiformes), with a revised classification. *Fishery Bulletin, U.S.*, 96(4), 686-726.
- Couteau, J. (2020). Mesure de biomarqueurs sur *Platichthys flesus* prélevés en estuaire de Seine en septembre 2019. Rapport réalisé par TOXEM pour le GIP Seine-Aval, 22.
- Dabrowska, H., Kopko, O., Góra, A., Waszak, I., & Walkusz-Miotk, J. (2014). DNA damage, EROD activity, condition indices, and their linkages with contaminants in female flounder (*Platichthys flesus*) from the southern Baltic Sea. *Science of the Total Environment*, 496, 488-498. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.079>
- Dando, P. R. (2011). Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Marine Ecology Progress Series*, 430, 183-196. <https://doi.org/10.3354/meps09116>
- Daros, F. A., Condini, M. V., Altafin, J. P., de Oliveira Ferreira, F., & Hostim-Silva, M. (2022). Fish otolith microchemistry as a biomarker of the world's largest mining disaster. *Science of The Total Environment*, 807, 151780. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151780>
- Darwano, H., Duy, S. V., & Sauvé, S. (2014). A new protocol for the analysis of pharmaceuticals, pesticides, and hormones in sediments and suspended particulate matter from rivers and municipal wastewaters. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 66, 582-593. <https://doi.org/10.1007/s00244-014-0007-9>
- Daughton, C. G. (2004). Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental impact assessment review*, 24(7-8), 711-732. <https://doi.org/10.1016/j.eiar.2004.06.003>
- Dauvin, J. C., & Ruellet, T. (2009). The estuarine quality paradox: is it possible to define an ecological quality status for specific modified and naturally stressed estuarine ecosystems?. *Marine pollution bulletin*, 59(1-3), 38-47.

- <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2008.11.008>
- Dauvin, J. C., Ruellet, T., Desroy, N., & Janson, A. L. (2007). The ecological quality status of the Bay of Seine and the Seine estuary: use of biotic indices. *Marine Pollution Bulletin*, 55(1-6), 241-257. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.04.010>
- Daverat, F., Tapie, N., Quiniou, L., Brachet, R. M., Riso, R., Eon, M., Laroche, J., & Budzinski, H. (2011). Otolith microchemistry interrogation of comparative contamination by Cd, Cu and PCBs of eel and flounder, in a large SW France catchment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 92(3), 332-338. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.01.011>
- De Andrade, V. M., de Freitas, T. R., & da Silva, J. (2004). Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for the detection of genotoxic pollutants in aquatic environment. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 560(1), 57-67. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2004.02.006>
- De Campos Ventura, B., de Angelis, D. D. F., & Marin-Morales, M. A. (2008). Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 90(1), 42-51. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.07.009>
- De Pontual, H. & Geffen, A. J. (2003). Chapitre VII. Microchimie de l'otolithe. *Manuel de sclérochronologie des poissons IRD Éditions*, 243-303. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.21009>
- De Vlas, J. (1979). Annual food intake by plaice and flounder in a tidal flat area in the Dutch Wadden Sea, with special reference to consumption of regenerating parts of macrobenthic prey. *Netherlands Journal of Sea Research*, 13(1), 117-153. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(79\)90037-1](https://doi.org/10.1016/0077-7579(79)90037-1)
- Defo, M. A., Mercier, L., Beauvais, C., Brua, R. B., Tétreault, G., Fontaine, A., Couture, P., Verreault, J., Houde, M. (2021). Time-dependent biological responses of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) exposed in situ to a major urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112483>
- Deng, D., Chen, H., & Tam, N. F. (2015). Temporal and spatial contamination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in wastewater treatment plants in Hong Kong. *Science of the total environment*, 502, 133-142. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.090>
- Déniel, C. (1981). Les Poissons plats (Téléostéens, Pleuronectiformes) en baie de Douarnenez : reproduction, croissance et migration des *Bothidae*, *Scophthalmidae*, *Pleuronectidae* et *Soleidae*. Ecologie, Environnement. *Ph.D. thesis - Université de Bretagne occidentale*.
- Diaz, R. J., & Rosenberg, R. (2008). Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, 321(5891), 926-929. <https://doi.org/10.1126/science.1156401>
- Dineshram, R., Sharma, R., Chandramouli, K., Yalamanchili, H. K., Chu, I., & Thiyagarajan, V. (2015). Comparative and quantitative proteomics reveal the adaptive strategies of oyster larvae to ocean acidification. *Proteomics*, 15(23-24), 4120-4134. <https://doi.org/10.1002/pmic.201500198>
- Dong, Z., & Chen, Y. (2013). Transcriptomics: advances and approaches. *Science China Life Sciences*, 56, 960-967. <https://doi.org/10.1007/s11427-013-4557-2>
- Duke, S. O., & Powles, S. B. (2008). Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 64(4), 319-325. <https://doi.org/10.1002/ps.1518>
- Dupuy, C., Galland, C., Pichereau, V., Sanchez, W., Riso, R., Labonne, M., Amara, R., Charrier, G., Fournier, M., & Laroche, J. (2015). Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Marine Pollution Bulletin*, 95(2), 634-645. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.033>
- Dwivedi, A. K. (2017). Researches in water pollution: A review. *International Research Journal of Natural and Applied Sciences*, 4(1), 118-142.
- Dyer, K. R. (1995). Sediment transport processes in estuaries. *Developments in Sedimentology*, 53, 423-449. [https://doi.org/10.1016/S0070-4571\(05\)80034-2](https://doi.org/10.1016/S0070-4571(05)80034-2)
- Ebner, J. N. (2021). Trends in the application of “omics” to ecotoxicology and stress ecology. *Genes*, 12(10), 1481. <https://doi.org/10.3390/genes12101481>
- Efferth, T., Schwarzl, S. M., Smith, J., & Osieka, R. (2006). Role of glucose-6-phosphate dehydrogenase for oxidative stress and apoptosis. *Cell Death & Differentiation*, 13(3), 527-528. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401807>
- Elsdon, T. S., & Gillanders, B. M. (2011). Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 59(11), 1796-1808. <https://doi.org/10.1139/F02-154>

- Elsdon, T. S., & Gillanders, B. M. (2004). Fish otolith chemistry influenced by exposure to multiple environmental variables. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 313(2), 269-284. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.08.010>
- Elsdon, T. S., Wells, B. K., Campana, S. E., Gillanders, B. M., Jones, C. M., Limburg, K. E., Secor, D.H., Thorrold, S. R., & Walther, B. D. (2008). Otolith chemistry to describe movements and life-history parameters of fishes: hypotheses, assumptions, limitations and inferences. *Oceanography and marine biology*, 303-336. CRC Press.
- Elliott, M. (2011). Marine science and management means tackling exogenic unmanaged pressures and endogenic managed pressures-a numbered guide. *Marine Pollution Bulletin*, 62(4), 651-655. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.11.033>
- Elliott, M., Borja, A., McQuatters-Gollop, A., Mazik, K., Birchenough, S., Andersen, J. H., Painting, S., & Peck, M. (2015). Force majeure: will climate change affect our ability to attain Good Environmental Status for marine biodiversity?. *Marine pollution bulletin*, 95(1), 7-27. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.03.015>
- Elliott, M., & Quintino, V. (2018). The estuarine quality paradox concept. *Encyclopedia of Ecology*, 1, 78-85.
- Elliott, M., & Quintino, V. (2007). The estuarine quality paradox, environmental homeostasis and the difficulty of detecting anthropogenic stress in naturally stressed areas. *Marine pollution bulletin*, 54(6), 640-645. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2007.02.003>
- Ellis, J. I., Hewitt, J. E., Clark, D., Taiapa, C., Patterson, M., Sinner, J., Hardy, D., & Thrush, S. F. (2015). Assessing ecological community health in coastal estuarine systems impacted by multiple stressors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 473, 176-187. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2015.09.003>
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Cachot, J., Charrier, G., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Responses of juvenile European flounder (*Platichthys flesus*) to multistress in the Vilaine estuary, during a 6-month survey. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 676-689. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1138-z>
- Eyre, B. D. (2000). Regional evaluation of nutrient transformation and phytoplankton growth in nine river-dominated sub-tropical east Australian estuaries. *Marine ecology progress series*, 205, 61-83. <https://doi.org/10.3354/meps205061>
- Facey, D. E., Blazer, V. S., Gasper, M. M., & Turcotte, C. L. (2005). Using fish biomarkers to monitor improvements in environmental quality. *Journal of Aquatic Animal Health*, 17(3), 263-266. <https://doi.org/10.1577/H04-055.1>
- Fall, K. A. (2020). Influence of suspended particle size and composition on particle image processing, estuarine floc fractal properties, and resulting estuarine light attenuation. *The College of William and Mary*.
- Ferreira, M., Antunes, P., Gil, O., Vale, C., & Reis-Henriques, M. A. (2004). Organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) and mullet (*Mugil cephalus*) from Douro estuary, and their use as sentinel species for environmental monitoring. *Aquatic toxicology*, 69(4), 347-357. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.06.005>
- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., & Reis-Henriques, M. A. (2005). Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic toxicology*, 71(1), 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.009>
- Frimpong, E. A., & Angermeier, P. L. (2009). Fish traits: a database of ecological and life-history traits of freshwater fishes of the United States. *Fisheries*, 34(10), 487-495. <https://doi.org/10.1577/1548-8446-34.10.487>
- Fisson, C., Bacq, N., Billen, G., Boust, D., Budzinski, H., Duchemin, J., & Sansom, S. (2014a). Qualité des eaux de l'estuaire de la Seine. *Fascicule Seine-Aval*, 3(2), 52p.
- Fisson, C., Le Boulenger, F., Lecarpentier, T., Moussard, S., & Ranvier, G. (2014b). L'estuaire de la Seine: état de santé et évolution. *Fascicule Seine-Aval*, 3(1), 1-4.
- Fitzsimons, M. F., Lohan, M. C., Tappin, A. D., & Millward, G. E. (2012). The role of suspended particles in estuarine and coastal biogeochemistry. *Geochemistry of Estuaries and Coasts*, 71-114. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-374711-2.00404-6>
- Forget, J., Beliaeff, B., & Bocquene, G. (2003). Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquatic Toxicology*, 62(3), 195-204. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00084-X)
- Fulton, M. H., Moore, D. W., Wirth, E. F., Chandler, G. T., Key, P. B., Daugomah, J. W., Strozier, E. D., Devane, J., Clark, J. R., Lewis, M. A., Finley, D. B., Ellenberg, W., Karnaky, K. J., & Scott, G. I. (1999). Assessment of risk reduction strategies for the management of agricultural nonpoint source pesticide runoff in estuarine ecosystems. *Toxicology and Industrial Health*, 15(1-2), 201-214. <https://doi.org/10.1177/074823379901500118>
- Gajahin Gamage, N. T., Miyashita, R., Takahashi, K., Asakawa, S., & Senevirathna, J. D. M. (2022). Proteomic applications in aquatic environment studies. *Proteomes*, 10(3), 32. <https://doi.org/10.3390/proteomes10030032>

- Galland, C., Dupuy, C., Loizeau, V., Danion, M., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2015). Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH–PCB contamination. *Marine pollution bulletin*, 95(2), 646-657. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.038>
- Gauthier, C., Campbell, P. G., & Couture, P. (2011). Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(9), 2148-2156. <https://doi.org/10.1002/etc.609>
- Giesy, J. P., Pierens, S. L., Snyder, E. M., Miles-Richardson, S., Kramer, V. J., Snyder, S. A., Miles-Richardson, S., Kramer, V. J., Snyder, S. A., Nichols, K. M., & Villeneuve, D. A. (2000). Effects of 4-nonylphenol on fecundity and biomarkers of estrogenicity in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(5), 1368-1377. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190520>
- Goldstein, R. M., & Meador, M. R. (2004). Comparisons of fish species traits from small streams to large rivers. *Transactions of the American Fisheries Society*, 133(4), 971-983. <https://doi.org/10.1577/T03-080.1>
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Geffard, O., & Armengaud, J. (2019). Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of proteomics*, 198, 66-77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001>
- Gunderson, A. R., Armstrong, E. J., & Stillman, J. H. (2016). Multiple stressors in a changing world: the need for an improved perspective on physiological responses to the dynamic marine environment. *Annual review of marine science*, 8, 357-378. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-122414-033953>
- Gunderson, A. R., King, E. E., Boyer, K., Tsukimura, B., & Stillman, J. H. (2017). Species as stressors: heterospecific interactions and the cellular stress response under global change. *Integrative and Comparative Biology*, 57(1), 90-102. <https://doi.org/10.1093/icb/ixc019>
- Halden, N. M., & Friedrich, L. A. (2008). Trace-element distributions in fish otoliths: natural markers of life histories, environmental conditions and exposure to tailings effluence. *Mineralogical Magazine*, 72(2), 593–605. <https://doi.org/10.1180/minmag.2008.072.2.593>
- Hansen, L. P., & Quinn, T. P. (1998). The marine phase of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) life cycle, with comparisons to Pacific salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(S1), 104-118. <https://doi.org/10.1139/d98-010>
- Harley, C. D., Randall Hughes, A., Hultgren, K. M., Miner, B. G., Sorte, C. J., Thornber, C. S., Rodriguez, L.F., Tomanek, L., & Williams, S. L. (2006). The impacts of climate change in coastal marine systems. *Ecology letters*, 9(2), 228-241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00871.x>
- Harmon, S. M. (2015). The toxicity of persistent organic pollutants to aquatic organisms. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 67, 587-613. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63299-9.00018-1>
- Hart, M. R., Quin, B. F., & Nguyen, M. L. (2004). Phosphorus runoff from agricultural land and direct fertilizer effects: A review. *Journal of environmental quality*, 33(6), 1954-1972. <https://doi.org/10.2134/jeq2004.1954>
- Hassanin, A., Kuwahara, S., Tsukamoto, Y., Ogawa, K., Hiramatsu, K., & Sasaki, F. (2002). Gonadosomatic index and testis morphology of common carp (*Cyprinus carpio*) in rivers contaminated with estrogenic chemicals. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(10), 921-926. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.921>
- Hassanzadeh, N. (2017). Histopathological evaluation of the Zebrafish (*Danio rerio*) testis following exposure to methyl paraben. *International Journal of Aquatic Biology*, 5(2), 71-78.
- Hatje, V., Payne, T. E., Hill, D. M., McOrist, G., Birch, G. F., & Szymczak, R. J. E. I. (2003). Kinetics of trace element uptake and release by particles in estuarine waters: effects of pH, salinity, and particle loading. *Environment international*, 29(5), 619-629. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00049-7)
- He, Y., Yu, H., Zhang, Z., Zhang, J., Kang, S., & Zhang, X. (2022). Effects of chronic hypoxia on growth performance, antioxidant capacity and protein turnover of largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Aquaculture*, 561, 738673. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738673>
- Hemmadi, V. (2016). Metallothionein-A potential biomarker to assess the metal contamination in marine fishes-A review. *International Journal Bioassays*, 5(4), 4961-4973.
- Hermant, M., Lobry, J., Bonhommeau, S., Poulard, J. C., & Le Pape, O. (2010). Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France). *Journal of Sea Research*, 64(1-2), 45-53. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2009.07.001>
- Hillyer, K. E., Bose, U., Broadbent, J. A., Bissett, A., & Beale, D. J. (2023). Multi-omics eco-surveillance of complex legacy contamination with a locally adapted estuarine invertebrate. *Environmental Pollution*, 319, 120993.

- <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120993>
- Hooda, P. S., Edwards, A. C., Anderson, H. A., & Miller, A. (2000). A review of water quality concerns in livestock farming areas. *Science of the total environment*, 250(1-3), 143-167. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00373-9](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00373-9)
- Höss, S., Ahlf, W., Fahnenstich, C., Gilberg, D., Hollert, H., Melbye, K., Meller, M., Hammers-Wirtz, M., Heininger, P., Neumann-Hensel, H., Ottermanns, R., ate, H. T., Seiler, T. B., Spira, D., Webber, J., & Feiler, U. (2010). Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination—Determination of toxicity thresholds. *Environmental Pollution*, 158(9), 2999-3010. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.05.013>
- Hughes, B. B., Levey, M. D., Fountain, M. C., Carlisle, A. B., Chavez, F. P., & Gleason, M. G. (2015). Climate mediates hypoxic stress on fish diversity and nursery function at the land–sea interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(26), 8025-8030. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505815112>
- Hylland, K., Sandvik, M., Skåre, J. U., Beyer, J., Egaas, E., & Goksøyr, A. (1996). Biomarkers in flounder (*Platichthys flesus*): an evaluation of their use in pollution monitoring. *Marine Environmental Research*, 42(1-4), 223-227. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(95\)00034-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(95)00034-8)
- Hyndes, G. A., Nagelkerken, I., McLeod, R. J., Connolly, R. M., Lavery, P. S., & Vanderklift, M. A. (2014). Mechanisms and ecological role of carbon transfer within coastal seascapes. *Biological Reviews*, 89(1), 232-254. <https://doi.org/10.1111/brv.12055>
- Jackson, M. C., Loewen, C. J., Vinebrooke, R. D., & Chimimba, C. T. (2016). Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Global change biology*, 22(1), 180-189. <https://doi.org/10.1111/gcb.13028>
- Jeppesen, R., Rodriguez, M., Rinde, J., Haskins, J., Hughes, B., Mehner, L., & Wasson, K. (2018). Effects of hypoxia on fish survival and oyster growth in a highly eutrophic estuary. *Estuaries and Coasts*, 41, 89-98. <https://doi.org/10.1007/s12237-016-0169-y>
- Jones, C. S., Drake, C. W., Hruby, C. E., Schilling, K. E., & Wolter, C. F. (2019). Livestock manure driving stream nitrate. *Ambio*, 48, 1143-1153. <https://doi.org/10.1007/s13280-018-1137-5>
- Kelly, F. L., & King, J. J. (2001, December). A review of the ecology and distribution of three lamprey species, *Lampetra fluviatilis* (L.), *Lampetra planeri* (Bloch) and *Petromyzon marinus* (L.): a context for conservation and biodiversity considerations in Ireland. *Biology and environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 165-185. <https://www.jstor.org/stable/20500120>
- Kennicutt, M. C. (2017). Water quality of the Gulf of Mexico. *Habitats and Biota of the Gulf of Mexico: Before the Deepwater Horizon Oil Spill: Volume 1: Water Quality, Sediments, Sediment Contaminants, Oil and Gas Seeps, Coastal Habitats, Offshore Plankton and Benthos, and Shellfish*, 55-164.
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., & Amara, R. (2013). A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere*, 91(4), 498-505. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.010>
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., & Amara, R. (2011). Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 154(3), 187-195. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2011.05.006>
- Kerr, L. A., Secor, D. H., & Kraus, R. T. (2007). Stable isotope ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{18}\text{O}$) and Sr/Ca composition of otoliths as proxies for environmental salinity experienced by an estuarine fish. *Marine Ecology Progress Series*, 349, 245–253. <https://doi.org/10.3354/MEPS07064>
- Kim, B. M., Kim, J., Choi, I. Y., Raisuddin, S., Au, D. W., Leung, K. M., Wu, R. S. S., Rhee, J. S., & Lee, J. S. (2016). Omics of the marine medaka (*Oryzias melastigma*) and its relevance to marine environmental research. *Marine environmental research*, 113, 141-152. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.12.004>
- Kirby, M. F., Smith, A. J., Rooke, J., Neall, P., Scott, A. P., & Katsiadaki, I. (2007). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): System interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquatic toxicology*, 81(3), 233-244. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.12.004>
- Kleinkauf, A., Connor, L., Swarbreck, D., Levene, C., Walker, P., Johnson, P. J., & Leah, R. T. (2004a). General condition biomarkers in relation to contaminant burden in European flounder (*Platichthys flesus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(3), 335-355. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.03.007>
- Kleinkauf, A., Macfarlane, C., Yeates, S., Simpson, M. G., & Leah, R. T. (2004b). A biomarker approach to endocrine disruption in flounder—estrogen receptors, hepatocyte proliferation, and sperm motility. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 58(3), 324-334. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2003.10.004>

- Kleinkauf, A., Scott, A. P., Stewart, C., Simpson, M. G., & Leah, R. T. (2004c). Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK)—a continuing problem. *Ecotoxicology and environmental safety*, 58(3), 356-364. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.03.009>
- Kopecka, J., & Pempkowiak, J. (2008). Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 70(3), 379-391. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2007.05.017>
- Labadie, P., Alligant, S., Berthe, T., Budzinski, H., Bigot-Clivot, A., Collard, F., Dris, R., Gasperi, J., Guigon, E., Petit, F., Rocher, V., Tassin, B., Tramoy, R., & Treilles, R. (2020). Contaminants of emerging concern in the Seine River basin: overview of recent research. *The Seine River Basin*, 355.
- Lagadic, L. (2002). Biomarkers: useful tools for the monitoring of aquatic environments. *Revue de médecine vétérinaire*, 153(8), 581-588.
- Lajeunesse, A., Smyth, S. A., Barclay, K., Sauvé, S., & Gagnon, C. (2012). Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water research*, 46(17), 5600-5612. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.042>
- Lamouroux, N., Poff, N. L., & Angermeier, P. L. (2002). Intercontinental convergence of stream fish community traits along geomorphic and hydraulic gradients. *Ecology*, 83(7), 1792-1807. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[1792:ICOSFC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[1792:ICOSFC]2.0.CO;2)
- Lang, T., Wosniok, W., Baršienė, J., Broeg, K., Kopecka, J., & Parkkonen, J. (2006). Liver histopathology in Baltic flounder (*Platichthys flesus*) as indicator of biological effects of contaminants. *Marine pollution bulletin*, 53(8-9), 488-496. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.11.008>
- Laroche, J., Gauthier, O., Quiniou, L., Devaux, A., Bony, S., Evrard, E., Cachot, J., Chérel, Y., Larcher, T., Riso, R., Pichereau, V., Devier, M. H., & Budzinski, H. (2013). Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 738-748. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1276-3>
- Laroche, J., Quiniou, L., Juhel, G., Auffret, M., & Moraga, D. (2002). Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 21(12), 2705-2712. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211225>
- Le Pape, O., Gilliers, C., Riou, P., Morin, J., Amara, R., & D esaunay, Y. (2007). Convergent signs of degradation in both the capacity and the quality of an essential fish habitat: state of the Seine estuary (France) flatfish nurseries. *Hydrobiologia*, 588(1), 225-229. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-0665-y>
- Lear, G., Anderson, M. J., Smith, J. P., Boxen, K., & Lewis, G. D. (2008). Spatial and temporal heterogeneity of the bacterial communities in stream epilithic biofilms. *FEMS microbiology ecology*, 65(3), 463-473. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00548.x>
- Li, M., Guo, Y., Cai, W. J., Testa, J. M., Shen, C., Li, R., & Su, J. (2023). Projected increase in carbon dioxide drawdown and acidification in large estuaries under climate change. *Communications Earth & Environment*, 4(1), 68. <https://doi.org/10.1038/s43247-023-00733-5>
- Li, Y., & Wang, W. X. (2021). Integrated transcriptomics and proteomics revealed the distinct toxicological effects of multi-metal contamination on oysters. *Environmental Pollution*, 284, 117533. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117533>
- Lima, F. P., Ribeiro, P. A., Queiroz, N., Hawkins, S. J., & Santos, A. M. (2007). Do distributional shifts of northern and southern species of algae match the warming pattern?. *Global change biology*, 13(12), 2592-2604. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01451.x>
- Limburg, K. E., Walther, B. D., Lu, Z., Jackman, G., Mohan, J., Walther, Y., Nissling, A., Weber, P. K., & Schmitt, A. K. (2015). In search of the dead zone: use of otoliths for tracking fish exposure to hypoxia. *Journal of Marine Systems*, 141, 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.02.014>
- Line, D. E., Wu, J., Arnold, J. A., Jennings, G. D., & Rubin, A. R. (1997). Water quality of first flush runoff from 20 industrial sites. *Water Environment Research*, 69(3), 305-310. <https://doi.org/10.2175/106143097X125489>
- Litvin, S. Y., Weinstein, M. P., Sheaves, M., & Nagelkerken, I. (2018). What makes nearshore habitats nurseries for nekton? An emerging view of the nursery role hypothesis. *Estuaries and Coasts*, 41, 1539-1550. <https://doi.org/10.1007/s12237-018-0383-x>
- Liu, Z. H., Chen, Q. L., Chen, Q., Li, F., & Li, Y. W. (2018a). Diethylstilbestrol arrested spermatogenesis and somatic growth in the juveniles of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*), a fish with sexual dimorphic growth. *Fish physiology and biochemistry*, 44, 789-803. <https://doi.org/10.1007/s10695-018-0469-1>

- Liu, Y., Liu, G., Yuan, Z., Liu, H., & Lam, P. K. (2018b). Heavy metals (As, Hg and V) and stable isotope ratios ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in fish from Yellow River Estuary, China. *Science of the Total Environment*, *613*, 462-471. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.088>
- Livingstone, D. R. (1993). Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, *57*(3), 195-211. <https://doi.org/10.1002/jctb.280570302>
- Livingstone, D. R. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, *120*(1), 43-49. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9)
- Livingstone, D. R. (2003). Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Medecine Veterinaire*, *154*(6), 427-430. <https://doi.org/10.1890/05-0769.1>
- Livingston, R. J. (2007). Phytoplankton bloom effects on a gulf estuary: water quality changes and biological response. *Ecological Applications*, *17*(5), S110-S128.
- Lochet, A., Jatteau, P., Tomas, J., & Rochard, E. (2008). Retrospective approach to investigating the early life history of a diadromous fish: allis shad *Alosa alosa* (L.) in the Gironde–Garonne–Dordogne watershed. *Journal of Fish Biology*, *72*(4), 946-960. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2007.01776.x>
- Lotze, H. K., Lenihan, H. S., Bourque, B. J., Bradbury, R. H., Cooke, R. G., Kay, M. C., Kidwell, S. M., Kirby, M. X., Peterson, C. H., & Jackson, J. B. (2006). Depletion, degradation, and recovery potential of estuaries and coastal seas. *Science*, *312*(5781), 1806-1809. <https://doi.org/10.1126/science.1128035>
- Lowe, R., Shirley, N., Bleackley, M., Dolan, S., & Shafee, T. (2017). Transcriptomics technologies. *PLoS computational biology*, *13*(5), e1005457. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005457>
- Lyons, B. P., Stentiford, G. D., Green, M., Bignell, J., Bateman, K., Feist, S. W., Goodsir, F., Reynolds, W. J., & Thain, J. E. (2004). DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in European flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *552*(1-2), 177-186. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.06.016>
- Lyons, B. P., Stewart, C., & Kirby, M. F. (1999). The detection of biomarkers of genotoxin exposure in the European flounder (*Platichthys flesus*) collected from the River Tyne Estuary. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *446*(1), 111-119. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(99\)00154-0](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(99)00154-0)
- Maccubbin, A. E., Black, J. J., & Dunn, B. P. (1990). ^{32}P -postlabeling detection of DNA adducts in fish from chemically contaminated waterways. *Science of the Total Environment*, *94*(1-2), 89-104. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(90\)90366-3](https://doi.org/10.1016/0048-9697(90)90366-3)
- Machuca-Sepúlveda, J., Miranda, J., Lefin, N., Pedroso, A., Beltrán, J. F., & Farias, J. G. (2023). Current Status of Omics in Biological Quality Elements for Freshwater Biomonitoring. *Biology*, *12*(7), 923. <https://doi.org/10.3390/biology12070923>
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Plee-Gauthier, E., & Laroche, J. (2006). Molecular identification and expression of differentially regulated genes of the European flounder, *Platichthys flesus*, submitted to pesticide exposure. *Marine Biotechnology*, *8*, 275-294. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-0099-3>
- Marchand, J., Tanguy, A., Laroche, J., Quiniou, L., & Moraga, D. (2003). Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Marine Ecology Progress Series*, *260*, 273-284. <https://doi.org/10.3354/meps260273>
- Marchand, J., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *Journal of Xenobiotics*, *3*(s1), e14. <https://doi.org/10.4081/xeno.2013.s1.e14>
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology*, *70*(4), 327-343. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.001>
- Martinho, F., Leitão, R., Neto, J. M., Cabral, H. N., Marques, J. C., & Pardal, M. A. (2007). The use of nursery areas by juvenile fish in a temperate estuary, Portugal. *Hydrobiologia*, *587*, 281-290. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-0689-3>
- Martinho, F., van der Veer, H. W., Cabral, H. N., & Pardal, M. A. (2013). Juvenile nursery colonization patterns for the European flounder (*Platichthys flesus*): A latitudinal approach. *Journal of Sea Research*, *84*, 61-69. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2013.07.014>
- Martino, J. C., Doubleday, Z. A., & Gillanders, B. M. (2019). Metabolic effects on carbon isotope biomarkers in fish.

- Ecological Indicators*, 97, 10–16. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2018.10.010>
- Matozzo, V., Tomei, A., & Marin, M. G. (2005). Acetylcholinesterase as a biomarker of exposure to neurotoxic compounds in the clam *Tapes philippinarum* from the Lagoon of Venice. *Marine pollution bulletin*, 50(12), 1686-1693. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2005.07.011>
- Mattiasen, E. G., Kashef, N. S., Stafford, D. M., Logan, C. A., Sogard, S. M., Bjorkstedt, E. P., & Hamilton, S. L. (2020). Effects of hypoxia on the behavior and physiology of kelp forest fishes. *Global Change Biology*, 26(6), 3498-3511. <https://doi.org/10.1111/gcb.15076>
- Matthiessen, P., & Law, R. J. (2002). Contaminants and their effects on estuarine and coastal organisms in the United Kingdom in the late twentieth century. *Environmental pollution*, 120(3), 739-757. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00175-6](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00175-6)
- Martyniuk, C. J., Mehinto, A. C., & Denslow, N. D. (2020). Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 507, 110764. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110764>
- McLusky, D. S., & Elliott, M. (2004). The estuarine ecosystem: ecology, threats and management. *OUP Oxford*.
- Meng, L., Gray, C., Taplin, B., & Kupcha, E. (2000). Using winter flounder growth rates to assess habitat quality in Rhode Island's coastal lagoons. *Marine Ecology Progress Series*, 201, 287-299. <https://doi.org/10.3354/meps201287>
- Millward, G. E., & Turner, A. (1995). Trace metals in estuaries. *Trace elements in natural waters*, 223-245. RC Press, Boca Raton, Florida.
- Minier, C., Levy, F., Rabel, D., Bocquene, G., Godefroy, D., Burgeot, T., & Leboulenger, F. (2000). Flounder health status in the Seine Bay. A multibiomarker study. *Marine Environmental Research*, 50(1-5), 373-377. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00059-3](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00059-3)
- Mokarram, M., Saber, A., & Sheykhi, V. (2020). Effects of heavy metal contamination on river water quality due to release of industrial effluents. *Journal of Cleaner Production*, 277, 123380. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.123380>
- Mommsen, T. P., & Walsh, P. J. (1988). Vitellogenesis and oocyte assembly. *Fish physiology*, 11, 347-406. *Academic Press*. [https://doi.org/10.1016/S1546-5098\(08\)60202-2](https://doi.org/10.1016/S1546-5098(08)60202-2)
- Morais, P., Dias, E., Babaluk, J., & Antunes, C. (2011). The migration patterns of the European flounder *Platichthys flesus* (Linnaeus, 1758) (Pleuronectidae, Pisces) at the southern limit of its distribution range: ecological implications and fishery management. *Journal of Sea Research*, 65(2), 235-246. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.11.001>
- Morand, P., & Briand, X. (1996). Excessive growth of macroalgae: a symptom of environmental disturbance. *Botanica marina*, 39, 491-516. <https://doi.org/10.1515/botm.1996.39.1-6.491>
- Mourgaud, Y., Martinez, É., Geffard, A., Andral, B., Stanisiere, J. Y., & Amiard, J. C. (2002). Metallothionein concentration in the mussel *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of response to metal contamination: validation in the field. *Biomarkers*, 7(6), 479-490. <https://doi.org/10.1080/1354750021000034528>
- Muntoni, M. (2020). REPERE : Référentiel partagé sur les Priorités de restauration des fonctionnalités des milieux estuariens de la vallée de Seine-Aval. *Rapport réalisé par le GIP Seine-Aval*, 94
- Nagahama, Y., Miura, T., & Kobayashi, T. (2007). The onset of spermatogenesis in fish. *Ciba Foundation Symposium 182-Germline Development*, 255-270. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470514573.ch14>
- Nagelkerken, I., Sheaves, M., Baker, R., & Connolly, R. M. (2015). The seascape nursery: a novel spatial approach to identify and manage nurseries for coastal marine fauna. *Fish and Fisheries*, 16(2), 362-371. <https://doi.org/10.1111/faf.12057>
- Nicolas, D. (2010). Des poissons sous influence?: une analyse à large échelle des relations entre les gradients abiotiques et l'ichtyofaune des estuaires tidaux européens, *Doctoral dissertation, Bordeaux 1*.
- Nuez-Ortín, W. G., Carter, C. G., Nichols, P. D., Cooke, I. R., & Wilson, R. (2018). Liver proteome response of pre-harvest Atlantic salmon following exposure to elevated temperature. *BMC genomics*, 19, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4517-0>
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Opschoor, H., & Reijnders, L. (1991). Towards sustainable development indicators. *Search of indicators of sustainable development*, 7-27.

- Ortiz-Delgado, J. B., Behrens, A., Segner, H., & Sarasquete, C. (2008). Tissue-specific induction of EROD activity and CYP1A protein in *Sparus aurata* exposed to B(a)P and TCDD. *Ecotoxicology and environmental safety*, 69(1), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2006.12.021>
- Owens, N. J. P. (1988). Natural variations in ¹⁵N in the marine environment. *Advances in marine biology*, 24, 389-451. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60077-2](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60077-2)
- Paerl, H. W. (2012). Marine plankton. *Ecology of cyanobacteria II: their diversity in space and time*, 127-153.
- Pandey, A., & Mann, M. (2000). Proteomics to study genes and genomes. *Nature*, 405(6788), 837-846. <https://doi.org/10.1038/35015709>
- Pampanin, D. M., Brooks, S. J., Grøsvik, B. E., Le Goff, J., Meier, S., & Sydnes, M. O. (2017). DNA adducts in marine fish as biological marker of genotoxicity in environmental monitoring: the way forward. *Marine Environmental Research*, 125, 49-62. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.01.002>
- Parmar, T. K., Rawtani, D., & Agrawal, Y. K. (2016). Bioindicators: the natural indicator of environmental pollution. *Frontiers in life science*, 9(2), 110-118. <https://doi.org/10.1080/21553769.2016.1162753>
- Patil, P. N., Sawant, D. V., & Deshmukh, R. N. (2012). Physico-chemical parameters for testing of water—A review. *International journal of environmental sciences*, 3(3), 1194-1207.
- Pédron, N., Artigaud, S., Infante, J. L. Z., Le Bayon, N., Charrier, G., Pichereau, V., & Laroche, J. (2017a). Proteomic responses of European flounder to temperature and hypoxia as interacting stressors: differential sensitivities of populations. *Science of the Total Environment*, 586, 890–899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.068>
- Pédron, N., Le Du, J., Charrier, G., Zambonino-Infante, J. L., Le Bayon, N., Vasconcelos, R. P., Fonseca, V. F., Le Grand, F., & Laroche, J. (2017b). Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Marine environmental research*, 129, 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.06.010>
- Pérez, S., Guillamón, M., & Barceló, D. (2001). Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge from wastewater treatment plants. *Journal of Chromatography A*, 938(1-2), 57-65. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01338-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01338-3)
- Peterson, B. J., & Fry, B. (1987). Stable isotopes in ecosystem studies. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 293-320. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.001453>
- Pihl, L. (1982). Food intake of young cod and flounder in a shallow bay on the Swedish west coast. *Netherlands Journal of Sea Research*, 15(3-4), 419-432. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(82\)90068-0](https://doi.org/10.1016/0077-7579(82)90068-0)
- PIREN-Seine (2019). Hydrologie du bassin de la Seine en quelques chiffres clefs. *Cellule transfert du PIREN-Seine*, ISSN : 2610-0916. www.piren-seine.fr
- Plenty, S. J., Tweedley, J. R., Bird, D. J., Newton, L., Warwick, R. M., Henderson, P. A., Hall, N. G., & Potter, I. C. (2018). Long-term annual and monthly changes in mysids and caridean decapods in a macrotidal estuarine environment in relation to climate change and pollution. *Journal of Sea Research*, 137, 35-46. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2018.03.007>
- Porter, C. M., & Janz, D. M. (2003). Treated municipal sewage discharge affects multiple levels of biological organization in fish. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54(2), 199-206. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00056-8](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00056-8)
- Post, D. M., Layman, C. A., Arrington, D. A., Takimoto, G., Quattrochi, J., & Montana, C. G. (2007). Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia*, 152, 179-189. <https://doi.org/10.1007/S00442-006-0630-X>
- Powers, S. P., Peterson, C. H., Christian, R. R., Sullivan, E., Powers, M. J., Bishop, M. J., & Buzzelli, C. P. (2005). Effects of eutrophication on bottom habitat and prey resources of demersal fishes. *Marine Ecology Progress Series*, 302, 233-243. <https://doi.org/10.3354/meps302233>
- Pye, K., & Blott, S. J. (2014). The geomorphology of UK estuaries: The role of geological controls, antecedent conditions and human activities. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 150, 196-214. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.05.014>
- Rabalais, N. N., Turner, R. E., Díaz, R. J., & Justić, D. (2009). Global change and eutrophication of coastal waters. *ICES Journal of Marine Science*, 66(7), 1528-1537. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsp047>
- Raimonet, M., & Cloern, J. E. (2017). Estuary–ocean connectivity: fast physics, slow biology. *Global change biology*, 23(6), 2345-2357. <https://doi.org/10.1111/gcb.13546>
- Ramos, S., Ré, P., & Bordalo, A. A. (2010). Recruitment of flatfish species to an estuarine nursery habitat (Lima estuary,

- NW Iberian Peninsula). *Journal of Sea Research*, 64(4), 473-486. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2010.01.010>
- Reichenberger, S., Bach, M., Skitschak, A., & Frede, H. G. (2007). Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground-and surface water and their effectiveness; A review. *Science of the total environment*, 384(1-3), 1-35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.04.046>
- Reise, K. (2005). Coast of change: habitat loss and transformations in the Wadden Sea. *Helgoland Marine Research*, 59, 9-21. <https://doi.org/10.1007/s10152-004-0202-6>
- Ribalta, C., Sanchez-Hernandez, J. C., & Solé, M. (2015). Hepatic biotransformation and antioxidant enzyme activities in Mediterranean fish from different habitat depths. *Science of the Total Environment*, 532, 176-183. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.001>
- Richardson, D. M., Davies, I. M., Moffat, C. F., Pollard, P., & Stagg, R. M. (2001). Biliary PAH metabolites and EROD activity in flounder (*Platichthys flesus*) from a contaminated estuarine environment. *Journal of Environmental Monitoring*, 3(6), 610-615.
- Riera, P., Stal, L. J., & Nieuwenhuize, J. (2000). Heavy $\delta^{15}\text{N}$ in intertidal benthic algae and invertebrates in the Scheldt Estuary (The Netherlands): effect of river nitrogen inputs. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 51(3), 365-372. <https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0684>
- Rijnsdorp, A. D., Peck, M. A., Engelhard, G. H., Möllmann, C., & Pinnegar, J. K. (2009). Resolving the effect of climate change on fish populations. *ICES journal of marine science*, 66(7), 1570-1583. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsp056>
- Rivière, J. L. (1993). Les animaux sentinelles. *Le Courrier de l'environnement de l'INRA*, 20(20), 59-68. hal-01207265 , version 1 (30-09-2015)
- Robins, P. E., Skov, M. W., Lewis, M. J., Giménez, L., Davies, A. G., Malham, S. K., Neill, S. P., McDonald, J.E., Whitton, T. A., Jackson, S. E., & Jago, C. F. (2016). Impact of climate change on UK estuaries: A review of past trends and potential projections. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 169, 119-135. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.12.016>
- Roig, N., Sierra, J., Nadal, M., Moreno-Garrido, I., Nieto, E., Hampel, M., Gallego, E. P., Schuhmacher, M., & Blasco, J. (2015). Assessment of sediment ecotoxicological status as a complementary tool for the evaluation of surface water quality: the Ebro river basin case study. *Science of the total environment*, 503, 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.125>
- Rotchell, J. M., Clarke, K. R., Newton, L. C., & Bird, D. J. (2001). Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Marine Environmental Research*, 52(2), 151-171. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(00\)00270-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(00)00270-1)
- Rose, W. L., French, B. L., Reichert, W. L., & Faisal, M. (2001). Persistence of benzo [a] pyrene–DNA adducts in hematopoietic tissues and blood of the mummichog, *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic toxicology*, 52(3-4), 319-328. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00125-9](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00125-9)
- Rossi, A., Bacchetta, C., & Cazenave, J. (2017). Effect of thermal stress on metabolic and oxidative stress biomarkers of *Hoplosternum littorale* (Teleostei, Callichthyidae). *Ecological Indicators*, 79, 361-370. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.042>
- Russell, F. S., (1976). The Eggs and Planktonic Stages of British Marine Fishes. *Academic Press, London*. 442-446.
- Salamat, N., & Zarie, M. (2012). Using of fish pathological alterations to assess aquatic pollution: a review. *World journal of fish and marine sciences*, 4(3), 223-231. [http://idosi.org/wjfms/wjfms4\(3\)12/1.pdf](http://idosi.org/wjfms/wjfms4(3)12/1.pdf)
- Sanchez, W., & Porcher, J. M. (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*, 28(2), 150-158. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2008.10.012>
- Secor, D. H., Henderson-Arzapalo, A., & Piccoli, P. M. (1995a). Can otolith microchemistry chart patterns of migration and habitat utilization in anadromous fishes?. *Journal of experimental marine Biology and Ecology*, 192(1), 15-33. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00054-U](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00054-U)
- Secor, D. H., Trice, T. M., Hornick, H. T. (1995b). Validation of otolith-based ageing and a comparison of otolith and scale-based ageing in mark-recaptured Chesapeake bay striped bass, *Morone saxatilis*. *Fishery Bulletin*, 93(1), 186-190.
- Secor, D. H., Rooker, J. R., Zlokovitz, E., & Zdanowicz, V. S. (2001). Identification of riverine, estuarine, and coastal contingents of Hudson River striped bass based upon otolith elemental fingerprints. *Marine Ecology Progress Series*, 211, 245-253. <https://doi:10.3354/meps211245>

- Sehonova, P., Svobodova, Z., Dolezelova, P., Vosmerova, P., & Faggio, C. (2018). Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: a review. *Science of the Total Environment*, 631, 789-794. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.076>
- Seitzinger, S. P., Mayorga, E., Bouwman, A. F., Kroeze, C., Beusen, A. H., Billen, G., Van Drecht, G., Dumont, E., Fekete, B. M., & Harrison, J. A. (2010). Global river nutrient export: A scenario analysis of past and future trends. *Global biogeochemical cycles*, 24(4). <https://doi.org/10.1029/2009GB003587>
- Selleslagh, J., & Amara, R. (2008). Environmental factors structuring fish composition and assemblages in a small macrotidal estuary (eastern English Channel). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 79(3), 507-517. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2008.05.006>
- Selleslagh, J., & Amara, R. (2015). Are estuarine fish opportunistic feeders? The case of a low anthropized nursery ground (the Canche Estuary, France). *Estuaries and Coasts*, 38, 252-267. <https://doi.org/10.1007/s12237-014-9787-4>
- Selleslagh, J., Blanchet, H., Bachelet, G., & Lobry, J. (2015). Feeding habitats, connectivity and origin of organic matter supporting fish populations in an estuary with a reduced intertidal area assessed by stable isotope analysis. *Estuaries and Coasts*, 38, 1431-1447. <https://doi.org/10.1007/s12237-014-9911-5>
- Selleslagh, J., Echard, A., Pécheyran, C., Baudrimont, M., Lobry, J., & Daverat, F. (2016). Can analysis of *Platichthys flesus* otoliths provide relevant data on historical metal pollution in estuaries? Experimental and in situ approaches. *Science of the Total Environment*, 557, 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.014>
- Shaver, G. R. (2005) Spatial heterogeneity: past, present, and future. *Ecosystem Function in Heterogeneous Landscapes*. Springer, New York, USA, 443– 449.
- Shang, J., Chen, J., Shen, Z., Xiao, X., Yang, H., Wang, Y., & Ruan, A. (2015). Photochemical degradation of PAHs in estuarine surface water: effects of DOM, salinity, and suspended particulate matter. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 12374-12383. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4543-2>
- Shedden, D. L., Williams, T. D., Lyons, B. P., & Chipman, J. K. (2006). Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray. *Marine environmental research*, 62(1), 33-44. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2006.03.001>
- 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(1), 184-191. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0)
- Skerritt, D. J. (2010). A review of the European flounder *Platichthys flesus*—biology, life history and trends in population. *Eastern Sea Fisheries Joint Committee Report*. Newcastle University.
- Sokolova, I. M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and comparative biology*, 53(4), 597-608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>
- Sol, S. Y., Johnson, L. L., Boyd, D., Olson, O. P., Lomax, D. P., & Collier, T. K. (2008). Relationships between anthropogenic chemical contaminant exposure and associated changes in reproductive parameters in male English sole (*Parophrys vetulus*) collected from Hylebos Waterway, Puget Sound, Washington. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 55, 627-638. <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9140-7>
- Somero, G. N. (2010). The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine 'winners' and 'losers'. *Journal of Experimental Biology*, 213(6), 912-920. <https://doi.org/10.1242/jeb.037473>
- Spilsbury, F., McDonald, B., Rankenburg, K., Evans, N. J., Grice, K., & Gagnon, M. M. (2022). Multivariate analysis of otolith microchemistry can discriminate the source of oil contamination in exposed fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 254, 109253. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109253>
- Statham, P. J. (2012). Nutrients in estuaries — An overview and the potential impacts of climate change. *Science of the total environment*, 434, 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.088>
- Stevenson, D. K. & Campana, S. E. (1992). Otolith microstructure examination and analysis. *Department of Fisheries and Oceans*.
- Strimbu, K., & Tavel, J. A. (2010). What are biomarkers?. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), 463. <https://doi.org/10.1097%2FCOH.0b013e32833ed177>
- Summers, R. W. (1979). Life cycle and population ecology of the flounder *Platichthys flesus* (L.) in the Ythan estuary, Scotland. *Journal of Natural History*, 13(6), 703-723. <https://doi.org/10.1080/00222937900770531>
- Tarnawski, M., & Baran, A. (2018). Use of chemical indicators and bioassays in bottom sediment ecological risk assessment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 74, 395-407.

- <https://doi.org/10.1007/s00244-018-0513-2>
- Tarpgaard, E., Mogensen, M., Grønkjær, P., & Carl, J. (2005). Using short-term growth of enclosed 0-group European flounder, *Platichthys flesus*, to assess habitat quality in a Danish bay. *Journal of Applied Ichthyology*, 21(1), 53-63. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2004.00626.x>
- Teichert, N., Lepage, M., Sagouis, A., Borja, A., Chust, G., Ferreira, M. T., Pasquaud, S., Schinegger, R., Segurado, P., & Argillier, C. (2017). Functional redundancy and sensitivity of fish assemblages in European rivers, lakes and estuarine ecosystems. *Scientific Reports*, 7(1), 17611. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17975-x>
- Teichert, N., Lizé, A., Tabouret, H., Roussel, J. M., Bareille, G., Trancart, T., Acou, A., Virag, L.-S., Pécheyran, C., Carpentier, A., & Feunteun, E. (2022). European flounder foraging movements in an estuarine nursery seascape inferred from otolith microchemistry and stable isotopes. *Marine Environmental Research*, 182, 105797. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105797>
- Tetreault, G. R., Kleywegt, S., Marjan, P., Bragg, L., Arlos, M., Fuzzen, M., Smith, B., Moon, T., Massarsky, A., Metcalfe, C., Oakes, K., McMaster, M. E., & Servos, M. R. (2021). Biological responses in fish exposed to municipal wastewater treatment plant effluent in situ. *Water Quality Research Journal*, 56 (2), 83–99. <https://doi.org/10.2166/WQRJ.2021.031>
- Thorrold, S. R., & Shuttleworth, S. (2000). In situ analysis of trace elements and isotope ratios in fish otoliths using laser ablation sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(6), 1232-1242. <https://doi.org/10.1139/f00-054>
- Todgham, A. E., & Stillman, J. H. (2013). Physiological responses to shifts in multiple environmental stressors: relevance in a changing world. *Integrative and comparative biology*, 53(4), 539-544. <https://doi.org/10.1093/icb/ict086>
- Tomanek, L. (2014). Proteomics to study adaptations in marine organisms to environmental stress. *Journal of proteomics*, 105, 92-106. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.009>
- Tomanek, L. (2011). Environmental proteomics: changes in the proteome of marine organisms in response to environmental stress, pollutants, infection, symbiosis, and development. *Annual review of marine science*, 3, 373-399. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-120709-142729>
- Tresnakova, N., Stara, A., & Velisek, J. (2021). Effects of glyphosate and its metabolite AMPA on aquatic organisms. *Applied Sciences*, 11(19), 9004. <https://doi.org/10.3390/app11199004>
- Troch, P. A., Carrillo, G. A., Heidbüchel, I., Rajagopal, S., Switanek, M., Volkmann, T. H., & Yaeger, M. (2009). Dealing with landscape heterogeneity in watershed hydrology: A review of recent progress toward new hydrological theory. *Geography Compass*, 3(1), 375-392. <https://doi.org/10.1111/j.1749-8198.2008.00186.x>
- Turner, A., & Millward, G. E. (2000). Particle dynamics and trace metal reactivity in estuarine plumes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 50(6), 761-774. <https://doi.org/10.1006/ecss.2000.0589>
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., & Loor, J. J. (2017). What are omics sciences?. *Periparturient diseases of dairy cows: a systems biology approach*, 1-7. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1
- Van Ael, E., Covaci, A., Blust, R., & Bervoets, L. (2012). Persistent organic pollutants in the Scheldt estuary: environmental distribution and bioaccumulation. *Environment international*, 48, 17-27. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.06.017>
- Van Ginneken, V. J., & Maes, G. E. (2005). The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its lifecycle, evolution and reproduction: a literature review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 367-398. <https://doi.org/10.1007/s11160-006-0005-8>
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Van Straalen, N. M. (2003). Peer reviewed: ecotoxicology becomes stress ecology. *Environmental science & technology*, 37(17), 324A-330A.
- Van Straalen, N. M., & Van Gestel, C. A. (2008). A stress ecology framework for comprehensive risk assessment of diffuse pollution. *Science of the Total Environment*, 406(3), 479-483. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.054>
- Vasconcelos, R. P., Henriques, S., França, S., Pasquaud, S., Cardoso, I., Laborde, M., & Cabral, H. N. (2015). Global patterns and predictors of fish species richness in estuaries. *Journal of Animal Ecology*, 84(5), 1331-1341. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12372>
- Venancio, L. P. R., & Domingos, C. R. (2014). Effect of pollutants on condition index. *Pollution and fish health in tropical ecosystems*, CRC Press, 394.

- Vieno, N. M., Tuhkanen, T., & Kronberg, L. (2005). Seasonal variation in the occurrence of pharmaceuticals in effluents from a sewage treatment plant and in the recipient water. *Environmental science & technology*, 39(21), 8220-8226. <https://doi.org/10.1021/es051124k>
- Vigano, L., Arillo, A., Falugi, C., Melodia, F., & Polesello, S. (2001). Biomarkers of exposure and effect in flounder (*Platichthys flesus*) exposed to sediments of the Adriatic Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 42(10), 887-894. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(01\)00047-9](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(01)00047-9)
- Vos, J. G., Dybing, E., Greim, H. A., Ladefoged, O., Lambré, C., Tarazona, J. V., Brandt, I., & Vethaak, A. D. (2000). Health effects of endocrine-disrupting chemicals on wildlife, with special reference to the European situation. *Critical reviews in toxicology*, 30(1), 71-133. <https://doi.org/10.1080/10408440091159176>
- Walker, C. H., & Livingstone, D. R. (Eds.). (2013). Persistent pollutants in marine ecosystems. *Elsevier*.
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2012). Principles of ecotoxicology. *CRC press*.
- Wang, Y. Q., Li, Y. W., Chen, Q. L., & Liu, Z. H. (2019). Long-term exposure of xenoestrogens with environmental relevant concentrations disrupted spermatogenesis of zebrafish through altering sex hormone balance, stimulating germ cell proliferation, meiosis and enhancing apoptosis. *Environmental Pollution*, 244, 486-494. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.079>
- Wepener, V. (2013). Active biomonitoring. *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*, 15-20. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5704-2>
- Wheeler, A. C. (1969). The fishes of the British Isles and north-west Europe. *Macmillan*.
- Whitfield, A. K., & Elliott, M. (2002). Fishes as indicators of environmental and ecological changes within estuaries: a review of progress and some suggestions for the future. *Journal of fish biology*, 61, 229-250. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb01773.x>
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology*, 30(4), 347-570. <https://doi.org/10.1080/10408440091159239>
- Williams, T. D., Davies, I. M., Wu, H., Diab, A. M., Webster, L., Viant, M. R., Chipman, J. K., Leaver, M. J., George, S. G., Moffat, C. F., & Robinson, C. D. (2014). Molecular responses of European flounder (*Platichthys flesus*) chronically exposed to contaminated estuarine sediments. *Chemosphere*, 108, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.028>
- Winemiller, K. O. (2005). Life history strategies, population regulation, and implications for fisheries management. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 62(4), 872-885. <https://doi.org/10.1139/f05-040>
- Zhang, X., Xia, P., Wang, P., Yang, J., & Baird, D. J. (2018). Omics advances in ecotoxicology. *Environmental Science & Technology*, 52(7), 3842-3851. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06494>
- Zhang, Y. Y., Zhang, E. R., & Zhang, J. (2008). Modeling on adsorption-desorption of trace metals to suspended particle matter in the Changjiang Estuary. *Environmental geology*, 53, 1751-1766. <https://doi.org/10.1007/s00254-007-0781-z>
- Zia, H., Harris, N. R., Merrett, G. V., Rivers, M., & Coles, N. (2013). The impact of agricultural activities on water quality: A case for collaborative catchment-scale management using integrated wireless sensor networks. *Computers and electronics in agriculture*, 96, 126-138. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.05.00>

CHAPITRE I

Évaluation de la qualité écologique d'un grand estuaire Européen : la Seine

1. Introduction

Ce chapitre explore les **réponses** des populations de Flet Européen (*P. flesus*) face au **multistress** (contamination chimique et réchauffement des eaux) dans les **grands systèmes estuariens**.

Les **grands estuaires** sont caractérisés par une longueur supérieure ou égale à **100 km**. Cette zone, comprise entre la limite amont de la pénétration de la marée dynamique et l'embouchure, est donc fortement hétérogène, avec des gradients amont-aval abiotiques et biotiques marqués (Romana, 1994).

L'un des principaux objectifs des recherches menées sur les grands estuaires est l'étude de l'**impact** des diverses **pollutions** sur la **qualité de l'eau** (Freeman *et al.*, 2019 ; Deycard *et al.*, 2014 ; Langford, 2001), la **qualité des sédiments** (Dhivert *et al.*, 2016 ; Net *et al.*, 2015 ; Chapman & Wang, 2001) et la **qualité écologique** des habitats. En effet, les substances chimiques associées aux sédiments et aux masses d'eau vont altérer les habitats (Delpech *et al.*, 2010). L'ensemble de ces contaminants peuvent aussi présenter un danger pour le biote, selon les conditions de biodisponibilité. Au final, la composition et la dynamique des communautés estuariennes peuvent être fortement altérées (Peterson *et al.*, 2009).

Parmi tous les grands systèmes estuariens d'Europe, l'estuaire de la Seine, très artificialisé, est d'une grande importance stratégique. Ainsi, des **programmes de surveillance** du fleuve ont débuté dès les années 1970.

L'**estuaire de Seine** est le plus grand de la Manche (236 km² à pleine mer), avec un débit en eau douce d'un minimum de 50 m³.s⁻¹ en été et d'un maximum de 2 200 m³.s⁻¹ en hiver. Ce fort débit fluvial charrie une grande quantité de matières en suspension (650 000 t.an⁻¹), entraînant la formation d'une zone turbide au niveau de l'embouchure (Lafite & Romana, 2001). Les caractéristiques physiques de l'estuaire de Seine en font une zone de **nourricerie** pour une multitude d'espèces estuariennes et marines (Morin *et al.*, 1999).

Au cours des 150 dernières années, l'estuaire de Seine a été très largement modifié (dragage du chenal et extensions portuaires) afin d'accueillir des **activités industrielles**, des **activités agricoles** et des **zones urbaines**. Ainsi, le bassin versant de la Seine concentre 40 % des activités économiques et industrielles françaises (dont 33 % du raffinage pétrolier et 50 % du trafic fluvial), 25 % de l'agriculture française (céréales, oléagineux, betteraves et pommes de terre) et une population de 18 millions d'habitants (225 hab.km⁻²).

Ces nombreuses **activités humaines** ont engendré une **perte d'habitat** qui altère la fonction de nurserie (Le Pape *et al.*, 2007) et une **contamination multiple** qui fait de l'estuaire de Seine l'un des plus pollués d'Europe. Tous ces polluants, potentiellement mutagènes et/ou cancérogènes, affectent les espèces présentes dans le milieu, des invertébrés aux poissons (Minier *et al.*, 2006 ; Miramand *et al.*, 2001). De ce fait, cette **contamination chronique** de l'estuaire de Seine peut fortement impacter la qualité de l'eau et des habitats (Fisson *et al.*, 2014).

La grande diversité des xénobiotiques présents en Seine ne peut être analysée de manière exhaustive car les **analyses chimiques** sont onéreuses, ce qui implique de mener des approches ciblées en chimie analytique sur certaines familles de polluants. De ce fait, les **analyses biologiques** complètent les approches chimiques en effectuant directement les mesures d'impact des polluants sur les organismes estuariens (Minier *et al.*, 2006). Combiner les mesures chimiques et biologiques permet donc d'obtenir des informations sur la présence de contaminants et leurs conséquences sur le biote. De nombreuses études ont ainsi été menées sur les populations d'espèces vivant dans l'estuaire de Seine afin d'évaluer les effets **létaux** et **sublétaux** des diverses **pollutions** (Poisson *et al.*, 2011).

Ainsi, des études visant à évaluer la **qualité écologique** de l'estuaire de Seine ont mis en évidence les différents types de contamination, notamment par l'estimation de différents **indices biotiques** (Dauvin *et al.*, 2007) et par les **réponses biologiques** d'espèces sentinelles (Burgeot *et al.*, 2017) ou d'espèces commerciales (Pinzone *et al.*, 2021) face aux stressseurs. Par ailleurs, rappelons que malgré l'ampleur des **pollutions** en Seine, plusieurs études ont démontré que les **espèces estuariennes** peuvent vraisemblablement développer une certaine capacité de **résistance** face à la contamination chimique chronique dans ce grand estuaire (Dauvin *et al.*, 2007 ; Marchand *et al.*, 2004, 2013).

Dans le cadre de cette thèse, il nous est apparu particulièrement pertinent de refaire un **état des lieux** sur l'impact actuel du **multistress** sur le Flet en **Seine**, afin (1) d'analyser la réponse de poissons adultes, dix ans après nos derniers travaux sur cet estuaire, et détecter ainsi une possible évolution dans l'état écologique de l'estuaire, et (2) pour explorer si la nouvelle composante environnementale liée au changement climatique constituait un facteur de stress additionnel pour ce poisson modèle estuarien.

Dans cette optique, nous avons participé au **projet "Seine-Aval HQ Fish"**. Ce projet, mené de 2017 à 2020, a été financé par le Groupement d'Intérêt Public (GIP) Seine-Aval.

Le **GIP Seine-Aval**, constitué de 7 spécialistes de l'environnement, de 12 membres financeurs et de divers partenaires (dont 103 laboratoires), s'intéresse principalement à l'estuaire de la Seine. Fondé en 2003, le GIP Seine-Aval vise à piloter le programme de recherche Seine-Aval, afin de valoriser les connaissances acquises et de les transférer vers les différents décideurs.

Le projet HQ Fish, basé sur l'espèce sentinelle le Flet Européen (*Platichthys flesus*), a été développé afin de mieux comprendre les **services écosystémiques** produits par un **système estuarien** en explorant l'état de santé et la dynamique de la population de Flet en Seine.

La première partie du projet HQ Fish, menée avant mon arrivée au laboratoire (Figure 25), visait à déterminer la **qualité des nourriceries** de l'estuaire de Seine. Dans cette optique, des **flets juvéniles** ont été capturés en Seine et une démarche multi-biomarqueurs a été développée afin de caractériser la fitness de ces individus (bioénergétique, état des réserves, détoxification, dommages tissulaires, croissance). Des analyses chimiques de contaminants ont également été réalisées dans les tissus de poissons et les sédiments estuariens. Toutes ces signatures analysées en Seine ont été comparées à celles mesurées chez les flets d'un système de "référence" peu contaminé en Manche,

la Canche. De plus, des flets ont été capturés en Canche et encagés en Seine et en Canche pendant un mois. Cette expérimentation de “caging” a aussi fait l’objet d’une approche multi-biomarqueurs combinée avec une analyse de polluants dans les individus et les sédiments au niveau des cages. Les réponses des flets juvéniles *in natura* et encagés a permis d’évaluer la fonctionnalité des nourriceries de Seine sur un gradient amont-aval, par rapport à celles de Canche, un milieu “peu stressé” (Borcier *et al.*, 2020, 2019, 2016).

La deuxième partie du Projet HQ Fish, à laquelle j’ai participé (excepté l’échantillonnage (Figure 25)), a permis d’explorer l’impact de la **qualité des habitats** estuariens en Seine vs Canche, en comparant le **statut physiologique** de Flets adultes dans les deux hydrosystèmes. Cette étude avait pour objectif (1) d’améliorer nos connaissances sur les réponses des populations de poissons à des multistress (pollution diffuse et réchauffement des eaux), en considérant leur stade de reproduction, et (2) d’explorer la résilience de ces populations face à un environnement qui évolue rapidement.

Pour ce faire, une **approche multi-biomarqueurs** a été développée afin de caractériser l’état de santé de flets adultes, en Seine vs Canche. Nous avons capturé des individus **sexuellement matures** dans les deux systèmes, en période de **reproduction** (février) et en période de **repos sexuel** (juillet). Ces échantillonnages ont permis d’estimer le taux d’activité métabolique, l’état des réserves, les dommages cellulaires et la maturation sexuelle du Flet pour ces deux saisons. Les teneurs en polluants ont également été mesurées dans les tissus des poissons de Seine et de Canche. Les températures de l’eau mesurées en Seine (Rouen) et à l’embouchure de l’estuaire de la Canche, pendant les mois de décembre et de janvier, ont également été étudiées. Les résultats et la discussion sur cette deuxième partie du projet HQ Fish sont détaillés dans les sous-parties 2. et 3. qui suivent de ce manuscrit. Ces résultats ont fait l’objet d’un article (Laurent *et al.*, 2022), présenté dans la sous-partie 4.

Le projet HQFish a fait l’objet d’un rapport final concluant que la **population de Flet** en Seine présente un **risque écologique** lié au **multistress** induit par le changement climatique global et la pollution locale (Amara *et al.*, 2020).

2. Résultats & Discussion

La variation temporelle des **températures hivernales** des eaux estuariennes de Seine et de Canche (de 2000 à 2021) a révélé une légère augmentation de la température de l'eau en hiver depuis 2017-2018, liée au changement climatique.

Les cycles de **maturation des gonades** du Flet étaient similaires dans les estuaires de Seine et de Canche. Les **RGS** (Rapport Gonado-Somatique) élevés en janvier puis faibles en juillet, chez les mâles et les femelles, confirment les tendances couramment observées dans cette région. Cependant, le RGS des individus femelles issus de Seine était inférieur à celui évalué lors d'une précédente étude en Seine (Marchand *et al.*, 2004).

Cette étude n'a révélé aucun **individu mâle intersexué**, alors qu'ils étaient 8 % dans la Seine en 1998 (Minier *et al.*, 2000). De la même manière, les taux de **VTG** chez les mâles étaient faibles en Seine et en Canche, par rapport aux concentrations détectées dans le passé (Minier & Amara, 2008). Cette absence de mâle intersexué pourrait être liée à l'amélioration générale de la qualité de l'eau de la Seine au cours des dernières décennies (Fisson *et al.*, 2014).

L'**indice de maturité sexuelle des femelles**, évalué par histologie ovarienne, présentait des tendances similaires à celles du RGS, avec une valeur plus élevée en janvier qu'en juillet. Cependant, cet indice était également faible, par rapport à de précédentes études (Gallien-Landriau, 2003), indiquant une faible **vitellogénèse** en janvier 2018.

Ces changements dans la **phénologie de reproduction** du Flet en janvier 2018, par rapport aux années antérieures, semblent être liés à des températures de l'eau plus élevées en hiver, à l'origine du retard dans la maturation des ovocytes et dans la ponte des Flets en Manche. Ainsi, la hausse des **températures** de la Manche en hiver conduit à une ponte plus tardive pour les espèces boréales, comme *P. flesus* (Brown *et al.*, 2006 ; Sims *et al.*, 2005).

Les **dosages de métaux** dans les foies de flets capturés en Seine et en Canche étaient relativement similaires, notamment en hiver. Cependant, les teneurs en métaux en période estivale étaient plus faibles en Canche vs Seine. Les plus faibles concentrations de métaux dans les flets de Canche en été pourraient être liées au faible débit du fleuve côtier en direction du Nord, entre la Seine et la Manche Est, limitant les flux de métaux.

Les **dosages de polluants organiques** dans le foie des flets ont révélé que les concentrations en **PCBs** étaient 10 à 15 fois plus élevées en Seine qu'en Canche. Une diminution des teneurs en PCBs a également été observée dans les poissons de Seine capturés en été vs hiver. Cette baisse des taux de PCBs pendant la période de repos sexuel (en été) pourrait être liée à une décontamination des Flets adultes. En effet, le transfert des polluants lipophiles vers les ovocytes permet d'éliminer les contaminants lors de la ponte (Ostrach *et al.*, 2008). Les polluants lipophiles peuvent également être directement métabolisés lors de la mobilisation des réserves lipidiques pour la reproduction. Les flets de Seine sont également contaminés aux **HAPs**, induisant notamment une forte métabolisation du pyrène, mis en évidence par les dosages d'**hydroxypyrène biliaire**. Les activités intensives de dragage menées en Seine, pour maintenir la profondeur du chenal de navigation,

pourraient être à l'origine de cette contamination aux HAPs des flets, comme cela a été observé dans d'autres estuaires industriels en Europe (Vethaak *et al.*, 2016).

Les **indices de condition** des flets adultes étaient similaires en Seine et en Canche, avec néanmoins des valeurs plus faibles en hiver qu'en été. En période de reproduction, cette baisse dans les indices de condition des poissons est due à la mobilisation générale des **réserves énergétiques**, nécessaires à la maturation finale des gonades.

Les **indices de stockage lipidique** des flets adultes, calculés à partir du ratio triglycérides sur stérols libres (TG/FS) sont significativement plus élevés en Seine vs Canche, quelle que soit la saison. Les réserves lipidiques musculaires plus élevées en Seine vs Canche pourraient être liées à une disponibilité plus importante de proies benthiques dans le système estuarien de la Seine.

Les concentrations en **sphingomyéline** (SPG) contenues dans les membranes musculaires, étaient significativement plus élevées en Seine vs Canche, et en hiver. La hausse des SPG, essentielles au maintien de l'homéostasie du réticulum endoplasmique (Kajiwara *et al.*, 2012), pourrait être liée à une augmentation de la densité des radeaux lipidiques dans le réticulum endoplasmique afin d'améliorer le métabolisme des xénobiotiques.

A contrario, les teneurs en **stérols libres** (FS) et en **phosphatidylsérine** (PS) étaient plus élevées en été vs hiver, pour la Seine et la Canche. L'augmentation des FS et PS en été pourrait être liée à leur rôle dans le maintien de la fluidité membranaire (Leventis & Grinstein 2010).

En outre, une corrélation négative entre SPG-PS et la **peroxydation lipidique** (TBARS) a été clairement détectée dans les deux estuaires.

La hausse des teneurs en **lipides bioactifs** (FS, SPG et PS) dans les membranes confirme leur rôle antioxydant face aux polluants (Borcier *et al.*, 2020), conduisant à une meilleure résistance face au **stress oxydatif** induit dans les sites fortement pollués ou modérément contaminés, tels que la Seine et la Canche.

Les **indices histopathologiques hépatiques**, mesurés chez les flets étaient plus élevés chez les individus capturés en Seine en été. Ces signatures histopathologiques sont caractérisées par la forte prévalence d'agrégats mélanographiques, de vacuolisations hydropiques et de foyers d'altération cellulaire, pouvant refléter l'exposition des poissons de Seine à des substances toxiques (notamment de type HAPs) (Feist *et al.*, 2004).

Enfin, les **biomarqueurs** analysés chez les flets de Seine et de Canche ont permis d'estimer les réponses des poissons face aux différents stressseurs présents dans ces systèmes estuariens.

Les niveaux d'**acétylcholinestérase** (AChE), mesurés dans le cerveau des flets, ont révélé une **neurotoxicité** plus élevée en Seine en hiver. Une induction de l'AChE est causée par une exposition à des cocktails complexes de pesticides, de métaux, de détergents et d'hydrocarbures (Poisson *et al.*, 2011).

Les **dommages à l'ADN**, mesurés grâce au test des Comètes dans le sang des flets, étaient plus faibles en Seine vs Canche, et en hiver. Cette **génotoxicité** réduite en Seine révèle que l'exposition chronique des poissons de Seine à une contamination chimique lourde entraîne probablement une

sélection des individus selon les plus aptes à protéger et/ou à réparer leur ADN (Marchand *et al.*, 2004 ; 2013).

L'**activité enzymatique** du **CYP450**, mesurée grâce à l'**activité EROD** dans le foie des flets, était relativement faible dans les estuaires de Seine et Canche, par rapport à d'autres zones côtières polluées (Dabrowska *et al.*, 2017). Cette faible activité EROD pourrait être liée, là aussi, à une forme d'adaptation locale des Flets vivant dans des eaux chroniquement contaminées (Brammell *et al.*, 2013).

L'**activité enzymatique** de la **G6PDH**, mesurée dans le foie des flets, était plus élevée en juillet en Seine qu'en Canche. L'induction de l'activité G6PDH hépatique reflète un **stress oxydatif** marqué dans l'estuaire de Seine en été.

L'**activité enzymatique hépatique** de la **CS**, plus élevée en été, en Canche vs Seine pourrait être liée à une déficience du métabolisme mitochondrial des Flets de Seine, les empêchant d'augmenter leur taux d'activité métabolique en réponse à l'augmentation de la température de l'eau en juillet.

3. Conclusion

En Manche, l'augmentation générale des températures des eaux côtières hivernales modifie la **phénologie de la reproduction** du Flet dans les estuaires de Seine et de Canche, induisant un retard dans les processus de maturation et de reproduction.

Dans le passé, suite à des hivers froids, le **recrutement** de Flets juvéniles en estuaires se déroulait en **mai** (Masson, 1987), avec un pic de **reproduction** clairement observé en **février**.

Cependant, au cours de la dernière décennie, un **second pic de recrutement** de juvéniles a été observé en **septembre** dans plusieurs systèmes estuariens. Par conséquent, nous suggérons que la **période de fraie** du Flet pourrait être **retardée** et **prolongée** de plusieurs semaines, voire de plusieurs mois, selon les individus (mars-avril, ou peut-être plus tard mai-juin).

De ce fait, les faibles abondances de Flets juvéniles détectées dans les estuaires suite à des hivers doux pourraient être liées au fait que les juvéniles issus d'une reproduction tardive ont une **survie plus faible** en estuaires, relativement à celle des individus issus d'une ponte plus précoce lors des hivers plus rigoureux (Attrill & Power, 2002).

En **période hivernale**, un important **flux côtier** d'eau partiellement dessalée, issu de la Seine, est observé en Manche, du Havre à Dunkerque. Ce flux, dérivant vers le Nord-Est de la Manche, transporte des polluants ainsi que les œufs et les larves de Flet produits au niveau de l'embouchure de l'estuaire de la Seine, considéré comme un grand site de fraie.

Cette **connectivité**, entre les populations de Flets de Seine et de Canche, pourrait être renforcée par le débit maximal de la Seine, des conditions de vent favorables et la longue durée de vie des embryons et des larves de Flet (Barbut *et al.*, 2019).

Les **flux de contaminants** en Manche pourraient ainsi expliquer les concentrations similaires de **métaux** observées dans les flets capturés en Seine et en Canche, principalement en hiver.

Les **biomarqueurs** mesurés chez les poissons ont permis de détecter les impacts du **stress chimique** et du **changement climatique** sur la population de Flet de Seine.

Par conséquent, nous suggérons que la population de Flet de la Seine, ainsi que celles de la Manche Est, pourraient être, à l'avenir, **sérieusement affectées** par un **stress multiple**, tel que des températures hivernales plus élevées combinées à une contamination chimique soutenue.

En outre, les biomarqueurs mesurés chez les poissons capturés en **Canche** ont mis en évidence que les effets du **stress chimique** n'étaient pas aussi négligeables que ce que nous le pensions pour cette population établie dans un site a priori considéré comme « de référence ».

Cette étude nous a permis d'évaluer la **qualité écologique** d'un **grand système estuarien chroniquement** soumis au **multistress**.

Par conséquent, nous pouvons nous demander si les outils mis en œuvre au cours de cette étude seraient pertinents pour diagnostiquer l'impact d'une **pollution accidentelle** dans un **estuaire très anthropisé**, comme celui de la Seine ?

Enfin, il nous paraît très important d'élargir notre approche sur l'estimation de la qualité écologique des milieux de transition à de **petits systèmes estuariens**, encore **peu étudiés** au niveau national, et présentant un multistress probablement nettement moins marqué, relativement aux grands estuaires de la façade Atlantique française (Seine, Vilaine, Loire, Gironde).

4. Article

Ci-dessous, l'article "Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France)", publié dans "Environmental Science and Pollution Research" (Figure 26).

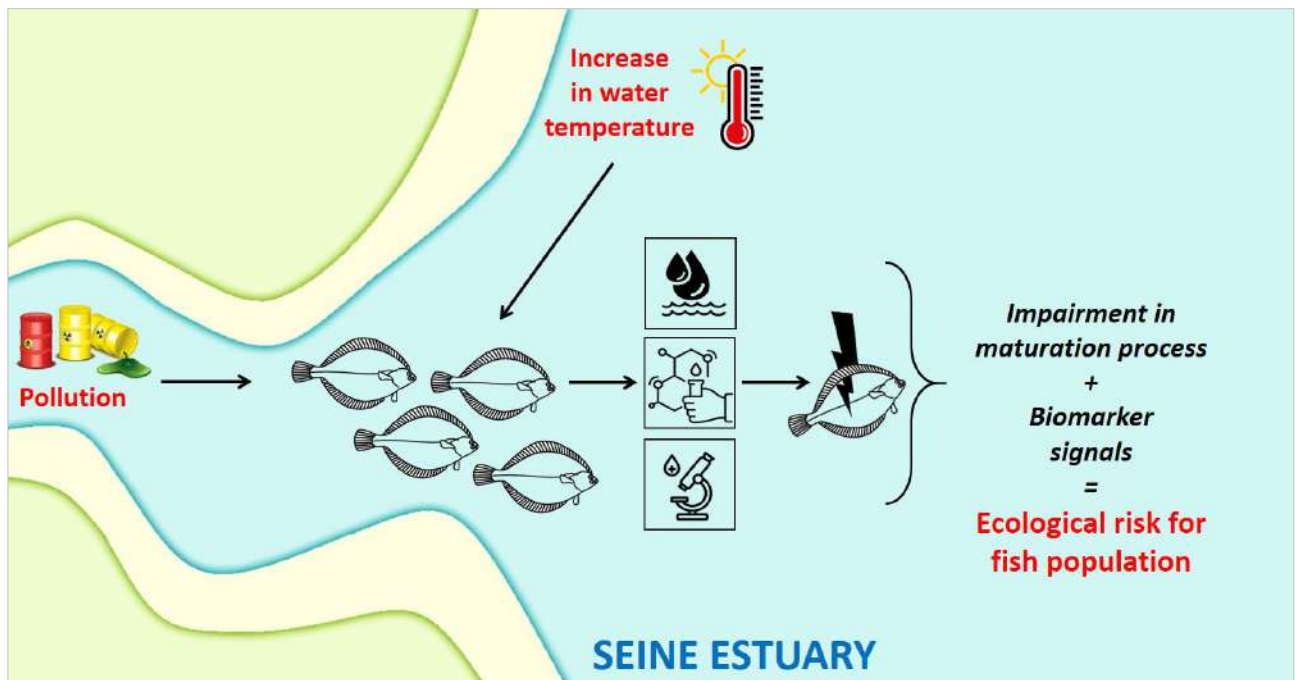


Figure 26. Résumé graphique de l'article "Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France)".

© Laurent *et al.* (2022)



Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France)

Jennifer Laurent¹ · Edouard Lavergne¹ · Jérôme Couteau² · Stéphane Le Floch³ · Baghdad Ouddane⁴ · Jérôme Cachot⁵ · Blandine Davail⁵ · Christelle Clérandeau⁵ · Simon Devin⁶ · Cédric Fisson⁷ · Alain Devaux⁸ · Rachid Amara⁹ · Mamadou Diop⁹ · Vianney Pichereau¹ · Jean Laroche¹

Received: 15 September 2021 / Accepted: 26 March 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2022

Abstract

The main objective of this study was to improve our knowledge on the responses of fish populations to multistress (diffuse pollution and warming waters) in estuaries. Adult flounders were caught in two estuaries in the Eastern English Channel: the heavily polluted Seine estuary vs the moderately contaminated Canche estuary. Fish samplings were conducted in January just before the reproduction period, and in July when gonads were at rest. The overall rise in coastal winter water temperatures detected over the Channel impairs the flounder's phenology of reproduction in the two estuaries, inducing a delay of maturation process and probably also spawning. The higher liver histopathology index in Seine vs Canche could be the consequence of the fish exposition to a complex cocktail of contaminants in a strongly industrialized estuary. Higher levels of neurotoxicity, gill lipid peroxidation, and liver EROD activity were observed in Seine vs Canche. Furthermore, a possible impairment in mitochondrial metabolism was suggested in the Seine flounder population. We confirmed in this study the potential role of two membrane lipids (sphingomyelin and phosphatidylserine) in the resistance towards oxidative stress in Seine and Canche. Finally, we suggest that the Seine flounder population (and possibly the connected Eastern English Channel flounder populations over the French Coast) could be seriously impacted in the future by multistress: higher winter temperatures and chemical contamination.

Keywords *Platichthys flesus* · Pollution · Biomarkers · Reproduction · Winter temperature

Responsible Editor: Philippe Garrigues

✉ Jean Laroche
jean.laroche@univ-brest.fr

¹ LEMAR UMR 6539, CNRS/UBO/IRD/Ifremer, Institut Universitaire Européen de La Mer, Université de Bretagne Occidentale, rue Dumont d'Urville, 29280 Plouzané, France

² TOXEM, 12 rue des 4 saisons, 76290 Montivilliers, France

³ CEDRE, 715 rue Alain Colas, 29200 Brest, France

⁴ LASIRE UMR 8516 CNRS, Equipe Physico-Chimie de L'Environnement, Université de Lille, Bâtiment C8, Bureau 105, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France

⁵ Université de Bordeaux, EPOC UMR 5805 CNRS, Bâtiment B2, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, CS 50023, 33615 Pessac Cedex, France

⁶ Université de Lorraine, LIEC UMR 7360 CNRS, Campus Bridoux, Bâtiment IBISE, rue Claude Bernard, 57070 Metz, France

⁷ GIP Seine-Aval, Hangar C - Espace des Marégraphes, CS 41174, 76176 Rouen Cedex 1, France

⁸ ENTPE, LEHNA UMR 5023, USC INRAE 1369, 3 rue Maurice Audin, 69120 Vaulx en Velin, France

⁹ Université Littoral Côte d'Opale, Université Lille, CNRS, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie Et de Géosciences, 32 Avenue du Maréchal Foch, 62930 Wimereux, France

Introduction

Large estuaries are impacted by interactive and cumulative effects among endogenic stressors (water pollution, coastal urbanization, flow changes, intertidal loss, eutrophication) and exogenic unmanaged stressor (e.g., warming waters linked to climate change). These stressors are seriously affecting the ecological quality of transitional waters and particularly their fish communities (Elliott et al. 2015; Teichert et al. 2016). Resident fish species that experience the estuarine environment throughout their life are more responsive to the local interaction of stressors, than non-resident fish using estuaries during a specific life stage (Teichert et al. 2017).

The flounder (*Platichthys flesus*) is an estuarine resident species excepted during its pelagic larval stage. This species lives principally in the oligo and mesohaline areas which are displaying the most stressful estuarine conditions (Dando 2011; Teichert et al. 2017). Thus, for the past ten years, numerous ecotoxicological studies were conducted in Europe using the flounder which was considered to be a very relevant species for the assessment of the water quality of transitional waters (Evrard et al. 2010; Williams et al. 2011; Henry et al. 2012; Kerambrun et al. 2013; Capela et al. 2016; Dabrowska et al. 2017; Borcier et al. 2020). The previous studies underlined alteration in gene expression patterns, biomarker signals, and fitness loss for the flounder populations living in chronically polluted estuaries, but few studies have explored the variation patterns in flounder response to chemical stress among seasons and genders (Laroche et al. 2013; Kopko and Dabrowska 2018).

Furthermore, *P. flesus* is a boreal species which usually displays a spawning peak in February over the English Channel; a swift ovary growth rate being mainly detected during the two previous months: December–January (Gallien-Landriau 2003). Climate change could induce winter spawner like *P. flesus* to have later spawning period (Sims et al. 2005; Elliott et al. 2015), particularly in the English Channel where a significant overall rise in winter sea surface temperature was detected between 1970 and 2010 (Fincham et al. 2013). Thus, during hot, positive phases of the North Atlantic Oscillation (NAO), flounders tend to spawn later (Sims et al. 2005). Warming waters could reduce the flounder recruitment in estuaries over the English Channel; a negative correlation being detected between the North Atlantic Oscillation Index (NAOI) and the juvenile *P. flesus* abundance in the Thames estuary, UK (Attrill and Power 2002).

In the present paper, the variability of fish chemical signatures, physiological characters, health status indicators, and biomarkers was analysed in two seasons (winter

and summer), considering adults of *P. flesus* collected in contrasted systems located in the Eastern English Channel: the highly anthropised and polluted Seine estuary vs the northern moderately polluted Canche estuary (Fig. 1). Despite a significant improvement of the Seine water quality during the last decades (Fisson et al. 2014), the Seine estuary still shows very high levels of PCBs in flounder linked to intensive industrial activities, and to the high concentrations of persistent organic pollutants in the sediments (Tappin and Millward 2015). On the other hand, the Canche system is an agricultural catchment displaying reduced levels of pesticides, and limited sources of organic pollutants (Belles et al. 2019). Concerning the heavy metal pollution, the highest flux of metals over the Eastern Channel is related to the heritage of a strong historical pollution over the Seine basin (Fisson et al. 2017), and to the dumping of dredged spoil and domestic wastes or the discharge from the industry sector in the Seine estuary (Tappin and Millward 2015). Thus, important metal fluxes over the area from the Seine estuary (Le Havre) to the North of France (Dunkirk) could be related to the “coastal flow;” because of the tidal residual and the dominant south-west winds, particularly in winter, the residual circulation drifts north-eastward and could play an important role in metal fluxes over the French coast (Brylinski et al. 1991; Tappin and Millward 2015).

The objectives of this study were (1) to improve our knowledge on the responses of fish populations to multistress (mainly diffuse pollution and warming waters), considering their reproductive stage, and (2) to explore the resilience of these populations facing a rapidly changing environment (Elliott et al. 2015).

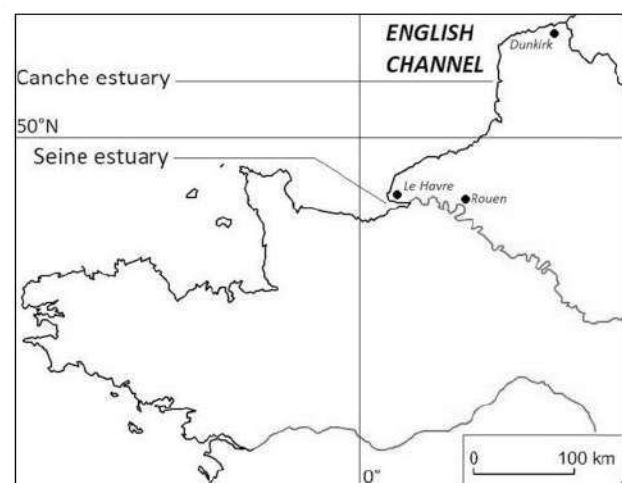


Fig. 1 Location of sampling sites (Seine estuary, Canche estuary) and industrial cities (Le Havre, Rouen)

Materials and methods

Study sites and fish sampling

The study area was located along the French coast of the Eastern English Channel. Two estuaries were sampled (Fig. 1). The Seine estuary (average annual flow 500 m³/s), the largest one in the English Channel, shows a strongly urbanized and industrialized basin (water catchment 80,000 km³) concentrating 40% of the French economic activity. Despite a significant improvement of the Seine water quality during the last two decades, the Seine is still considered one of the most chemically polluted estuaries in western northern Europe (Poisson et al. 2011; Burgeot et al. 2017). The Canche estuary (average annual flow 21 m³/s) is a small system (water catchment 1,300 km³) displaying a reduced anthropisation characterized by a low urban development without strong industrialisation; thus, this estuary is considered to be moderately polluted (Henry et al. 2012; Belles et al. 2019).

In mid-January 2018, a set of 30 adult flounders (total length > 25 cm) were collected by a beam trawl in the mouth of the two estuaries (Canche and Seine). The same procedure was repeated in early July 2018, but only 22 and 28 fish were, respectively, caught in both estuaries. Flounders were sampled during the reproduction period in winter and during the sexual rest period in summer (Kleinkauf et al. 2004b). Immediately after fishing, each fish was measured and weighted to determine the Fulton's condition factor (K), an indicator of well-being ($K = 100 \times (W/L^3)$, where W is the carcass weight in g, and L is the total length in cm). Different tissues were also collected in the field (muscle, liver, gills, brain, plasma) and immediately flash-frozen in liquid nitrogen. The otoliths were collected and air conserved, until their analysis by image processing to assess the growth rate.

Estuarine water temperature monitoring

For the two last decades, we explored the water temperatures measured in the Seine estuary in the harbour of Rouen (HAROPA-Port de Rouen / Seine-Aval) and in the mouth of the Canche estuary (Lefebvre 2015), during December and January, a critical period for the sexual maturation process of the flounder. Monthly means of water minimum day temperature were analysed for Seine and Canche estuaries, respectively, over the period 2000–2021 and 2004–2021.

Pollutant analysis

Liver PCBs

The concentration of 26 PCBs was assessed in fish tissues by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas

chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) using a method adapted from Lacroix et al. (2014). Briefly, 100 mg wet weight (w.w.) of tissue was digested by saponification and analytes were extracted by stirring during 16 h at 700 rpm using polydimethylsiloxane stir-bars (Twister 20 mm × 0.5 mm, Gerstel). Bars were subsequently analysed using a gas chromatography system Agilent 7890A coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) and equipped with a Thermal Desorption Unit (TDU) combined with a Cooled Injection System (Gerstel). Analytes were quantified relatively to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 30 ng per bar. Method was validated by analysing mussel reference material NIST-SRM 1974c.

Liver metals

The lyophilized liver-tissue samples were precisely weighed (about 50–100 mg) into PTFE closed cups and predigested at room temperature for 24 h using 5 ml nitric acid (Merck, Suprapur) and 1 ml hydrogen peroxide (Merck, Suprapur) then digested on a heating block (HotBlock® SC100 Digestion System) at a temperature of 120 °C until total decomposition (~ 3 h). The solutions were then diluted to a final volume of 40 ml with ultrapure Milli-Q water. The metal concentrations were determined by ICP-AES (Agilent 5110, dual view) for the major elements and by ICP-MS (Varian, 820) for the trace elements. All samples were analysed in triplicates for reproducibility, accuracy, and precision. Procedural blanks and fish certified reference materials (CRMs): DORM-3 and IAEA-436 were analysed in the same conditions as the samples for quality assurance/quality control. The results were in good agreement with the certified values (> 90% confidence intervals).

Bile PAH metabolite: hydroxypyrene

The concentration of the bile PAH metabolite hydroxypyrene was determined by semi-quantitative analysis of the metabolites fluorescence (Aas et al. 2000). It consisted in measuring the fluorescence by a spectrophotometer with a 5-nm slit width on emission and excitation channels (Jasco FP-6200). Analyses were performed using excitation-emission wavelengths: 343 to 383 nm (4-ringed compounds including pyrene-type metabolites) (Aas et al. 2000).

Physiological and health status

Estimation of growth rate

The individual growth rate (GR) over one year was estimated using otoliths, between the annual marks of the first winter and second winter, a period displaying a very high and linear

growth for flounders. Otolith parameters were measured through image processing; fish lengths at the beginning of the first and second winter were computed by back-calculation (approximately between 8 and 20 months old fish) as described in Marchand et al. (2003).

Muscle lipid analysis

Lipid analyses were performed on flounder muscles by HPTLC (High-performance Thin Layer Chromatography) following a method adapted for *P. flesus* (Pédrón et al. 2017b) using a CAMAG TLC Sampler 4 (CAMAG, Switzerland). Lipids were extracted, according to Mathieu-Resuge et al. (2019), from approximately 150 mg of muscle crushed by a mixer mill (MM400, RETSCH, Germany). Six neutral lipid classes (sterol esters, glyceride ethers, triacylglycerol, free fatty acids, fatty alcohols, free sterols) and seven polar lipid classes (sphingomyelin, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, cardiolipin, phosphatidylethanolamine) were identified by standard comparison and quantified relatively to standard calibration curves (Visioncats software, CAMAG). Neutral lipids, except free sterols, are storage lipids, whereas polar lipids and free sterols are membrane lipids.

The lipid storage index (triacylglycerol / free sterols: TG/FS) based on the ratio of the quantitative reserve lipid (TG) to the quantity of structural lipid (FS) was assessed for fish, because it was considered a relevant proxy of the fitness (Kerambrun et al. 2013). Furthermore, a focus on particular membrane phospholipids (sphingomyelin, phosphatidylserine, free sterols) was also conducted, because a previous study showed: (1) higher concentrations of these phospholipids in flounders from Seine vs a moderately contaminated bay, and (2) their potential role in the regulation of cellular functions of the plasma membrane as well as intracellular organelles (Borcier et al. 2020).

Gonadosomatic and sexual maturity indices

The gonadosomatic index (*GSI*) which reflects the maturation stage of each individual was assessed as follows: $GSI = (W_g/W_s) \times 100$, where W_g (g) and W_s (g) are, respectively, the gonad and the somatic weight.

The gonads were divided into 4 equal portions, in order to carry out the microscopic observations on three distinct cross sections (Minier et al. 2000) and fixed in 4% formalin solution. Tissues were transferred to 70% alcohol and dehydrated to 100% alcohol before being soaked in Histoclear clearing solution (Sigma, St Louis) for 12 h. Tissues were embedded in molten wax prior to sectioning at 3–5 μm thickness. All sections were stained with Mayers hematoxylin/eosin, mounted and carefully examined

by light microscopy. Intersex for males was characterized by the presence of primary and secondary oocytes within the testes.

Oocyte maturation for females was classified from 1 to 4 as follows (Koç et al. 2008; Gallien-Landriau 2003): stage 1: previtellogenic primary oocytes. Size: 30 to 140 μm /stage 2: appearance of Cortical alveoli. Size: 100 to 200 μm /stage 3: active vitellogenesis showing an increasing number of yolk granule vesicles. Size: 200 to 300 μm /stage 4: hydrated oocytes. Size: 300 to 500 μm . A score of 1, 2, 3, and 4 was assigned to each oocyte according to its stage of maturation. On each section of a female ovary, the individual sexual maturity index (ISM = individual score) was assessed with the following formula: $ISM = [(N1 \times 1) + (N2 \times 2) + (N3 \times 3) + (N4 \times 4)] / Nt$ with $N1$ = number of oocytes at stage 1; $N2$ = number of oocytes at stage 2; $N3$ = number of oocytes at stage 3; $N4$ = number of oocytes at stage 4; Nt = total number of analysed oocytes. A sexual-maturity index for the different female populations (FSM) was estimated by averaging the ISM obtained for females at each estuary.

Plasma steroid concentrations and vitellogenin

Plasma was separated from blood by centrifugation (5 min, 10,000 rpm), and frozen at -20°C . Before the assay, the free steroids were extracted twice from plasma using a mixture made of ethyl acetate/cyclohexane (1:1, v:v). The samples were assayed by competitive enzyme immunoassay (ELISA) method, first developed for 11-ketotestosterone (11-KT) (Cuisset et al. 1994), then adapted for testosterone (T), 17β -estradiol (E2) and 17, 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (MIS) (Nash et al. 2000). The enzymatic competitors, made of acetylcholinesterase-coupled pure steroid, were purchased from Bertin Pharma (France).

The male flounder plasma VTG was quantified by ELISA method using anti-turbot VTG polyclonal antibody (Biosense laboratories) and flounder purified VTG as standard. Briefly, the 96-well microplates were coated overnight at 4°C with male plasma or standard diluted in coating buffer (sodium carbonate buffer pH 9,6). After three washes with washing buffer (PBS-0.05% Tween 20), plates were blocked for one hour at 37°C with a solution of PBS and 1% BSA. Then, plates were incubated with the anti-turbot VTG polyclonal antibody (1:500) for one hour and half at 37°C . After three washes, plates were incubated with goat anti-rabbit IgG HRP conjugated antibody (1:50,000; Agrisera) for one hour at 37°C . Colour development was performed with TMB reagent (Bio-Rad) in darkness at room temperature for 30 min. Then, reaction was stopped by addition of 0.1 mL per well of 1 N HCl. Absorbance was measured after 5 min at 450 nm, using a microplate reader (Synergy HT, Biotek Instruments).

Liver histopathology

A 5 mm × 5 mm portion of fish liver was stored in a histological cassette and fixed in 4% formalin solution. Tissues were transferred to 70% alcohol and dehydrated to 100% alcohol before being soaked in Histoclear clearing solution (Sigma, St Louis) for 12 h. Tissues were embedded in molten wax prior to sectioning at 3–5 µm thickness. All sections were stained with Mayers hematoxylin–eosin–safran (HES), mounted, and carefully examined by light microscopy. Liver damage was categorized according to the recommendations of Feist et al. (2004). A severity score ranging from 1 to 5 was arbitrarily assigned for each liver category of lesions (BEQUALM: Biological Effects Quality Assurances in Monitoring Programmes): (1) non-specific and inflammatory lesions considered to have an uncertain impact on the health of the individual, but must nevertheless be recorded: lipidosis, increased number and size of macrophage aggregates, lymphocytic infiltration; (2) non-neoplastic toxipathic lesions including non-nodular lesions such as hydropic vacuolation, fibrillar inclusions which characterize the body's exposure to contaminants (Myers et al. 1998); (3) foci of Cellular Alteration (FCA); (4) benign neoplasms: hepatocellular adenoma on different constituent cell types (cholangioma, hemangioma, and pancreatic acinar cell adenoma); (5) malignant neoplasms: hepatocellular carcinoma on different constituent cell types and hemangiosarcoma or angiosarcoma.

Each fish was scored with an individual histopathological index corresponding to the sum of the damage scores observed. Likewise, a global index was obtained for a sampling station by the average of the individual ratings.

Biomarkers

Acetylcholinesterase and EROD activities

The brain AChE and the liver EROD activities assays were already described by Borcier et al. (2020). Briefly, after protein extraction, AChE activity was determined within 24 h in quadruplicate, according to the colorimetric method of Ellman et al. (1961), and EROD activity was measured in quadruplicate with modification as described by Burke and Mayer (1974) and in accordance with the AFNOR standard XP T90-336-2. Brain AChE and liver EROD activities were, respectively, expressed as µmol of acetylthiocholine (AcSCh) hydrolysed per minute per milligram of protein and pmol of resorufin per minute per mg of protein.

Comet assays

Immediately after fishing, 10 µL of heparinized blood were added to 1 mL of cryopreservation medium (250 mM

sucrose, 40 mM trisodium citrate, 5% DMSO, pH 7.6) in a cryogenic tube and immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were stored at –80 °C until analysis. The comet assay was performed on flounder erythrocytes according to the protocol described by Singh et al. (1988) with slight modifications. Ten microliters of cell suspension were mixed with 0.7% low melting point agarose in a 1:10 (v:v) ratio and layered on pre-coated slides. After lysis of cells with lysing solution (100 mM EDTA, 2.5 M NaCl, 1% *N*-Laurylsarcosine, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton-100X), electrophoresis was performed using cold alkaline solution (300 mM NaOH, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (Na₂ EDTA), pH > 13) at 300 mA and 23 V (ca. 0.8 V.cm⁻¹) for 20 min. Slides were stained with SYBR® Gold (Invitrogen) and comet cells were scored under a CellInsight CX5 HCS® System (Thermo) which automatically provides standardized percent of total cellular DNA in the tail (%DNA Tail).

TBARS assays

Branchial arches were homogenized on ice in 500 µL of a chilled phosphate buffer (0.1 M; pH 7.5) using the MoBiTec G50 Tissue Grinder set at 3000 rpm and then centrifuged at 9,000 g for 25 min. The supernatant (S9 fraction) was isolated and stored at –80 °C for protein and lipid peroxidation analyses. The total protein concentration was measured on the diluted S9 fraction (1:50 v/v in ultrapure water) following the method of Lowry et al. (1951) and using a BIO-TEK Synergy HT microplate reader. Lipid peroxidation (TBARS) was determined on S9 fraction using the method of Buege and Aust (1978) adapted to microplate readers (Weeks Santos et al. 2019). TBARS levels were measured using a UV-spectrophotometer (Biotek Synergy HT) at 530 nm. Results were expressed as nmoles of thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) equivalents per mg of protein.

Metabolic activities: glucose-6-phosphate dehydrogenase and citrate synthase

Enzymatic activities were conducted from approximately 250 mg of liver and muscle samples, according to Borcier et al. (2020). The G6PDH enzymatic activity was measured on liver tissues at 340 nm for 6 min, while the CS reaction rates were measured on liver and muscle tissues at 412 nm for 4 min, with a spectrophotometer OMEGA PolarStar (BMG Labtech). The protein concentration was determined according to the Coomassie blue method (Bradford 1976), with a bovine serum albumin (BIORAD Laboratories, USA) as standard. The absorbance was measured at 595 nm.

Statistical analysis

Since principal and interactive effects of three independent variables are often difficult to analyze and to interpret, the first step of the data analysis was to prioritize the relative contribution of each one of them (i.e., season, study site, and sex) conditionally to the two others on the global information contained in the samples \times biological endpoint matrix. The variance explained by each factor is then tested to depict whether it can attain a significant level or not. Variance analysis was performed with a partial redundancy analysis (rda function, library vegan, Oksanen et al. 2020). Each computed RDA was then tested with an ANOVA. This preliminary analysis reveals a significant contribution of season (4.9% of variance explained, $p=0.021$), of study site (6.9% of variance explained, $p=0.002$), but not for sex (less than 1% of variance explained, $p=0.634$). Thus, considering that sex effect is neglectable in this study, further analyses were performed considering only season and study site effects.

Statistical tests were performed in R (R Core Team (2021)). Normality and homoscedasticity of variances were controlled with a Shapiro–Wilk test and a Bartlett test, respectively. Since data were not normally distributed, a non-parametric Kruskal–Wallis test followed by a post hoc Dunn test (for multiple comparisons) was applied to compare means over all the conditions (season \times study sites). A p value lower than 0.05 was considered a

significant difference. The data integration was carried out by principal component analyses performed with the FactorMineR package with default settings (Lê et al. 2008).

Results

Water temperature monitoring

Globally, the water temperatures in the Seine and Canche estuaries (Fig. 2) showed convergent temporal trends over 2000–2020. The monthly mean of minimum day temperature in estuaries, during December–January, was rather variable from 2000–2001 to 2010–2011, then was stabilized to the highest values from 2017–2018 to nowadays.

Pollutants

Liver PCBs

The liver PCBs concentrations (Fig. 3a) showed considerably higher levels in Seine vs Canche with no significant difference between seasons within the two estuaries (Seine winter: $4771 \pm 3221 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ dw}$ – summer: $2216 \pm 767 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ dw}$; Canche winter: $302 \pm 288 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ dw}$ – summer: $271 \pm 261 \mu\text{g.kg}^{-1} \text{ dw}$).

Fig. 2 Monthly mean of minimum day water temperature in the Seine and Canche, for December, January and December–January mean, over the last two decades

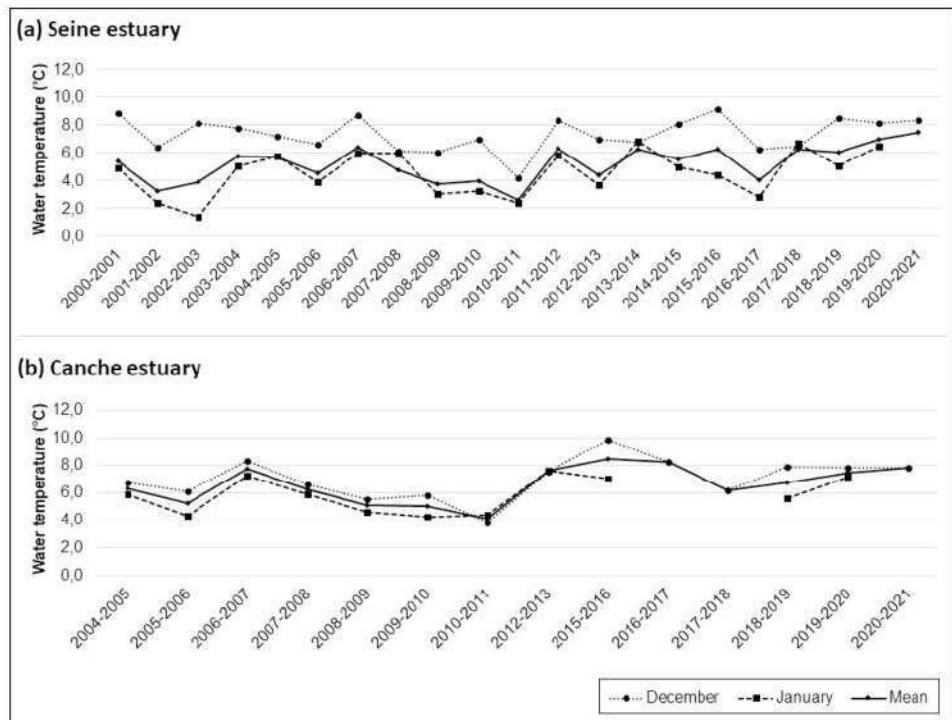
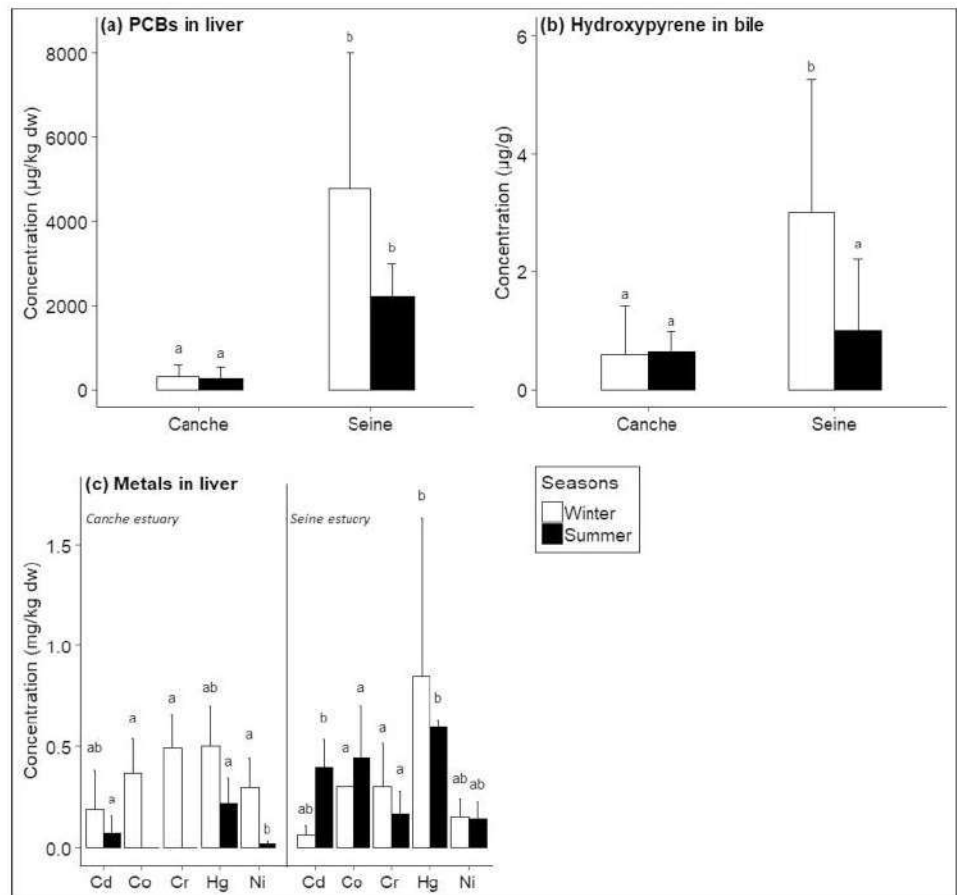


Fig. 3 Mean (and 95% confidence interval) of organic contaminants and heavy metals in *P. flesus* from Canche and Seine estuaries. **a** Polychlorobiphenyl (PCBs) concentrations in liver. **b** Hydroxyppyrene in bile. **c** Cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), mercury (Hg), and nickel (Ni) in the liver. (Statistics: Kruskal–Wallis test; p value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries and seasons)



Liver metals

Globally, the metal concentrations are rather similar in Canche vs Seine, but a seasonal variation was observed for the Canche, particularly for Co, Cr, and Ni which showed decreasing concentrations in summer vs winter (Fig. 3c). The bioaccumulations of Hg were also the highest for Seine and Canche in winter (respectively $0.85 \pm 0.79 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ dw}$, and $0.50 \pm 0.20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ dw}$). On the other hand, the highest Cd concentration was detected in Seine in summer ($0.40 \pm 0.14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ dw}$).

Bile hydroxyppyrene

In winter, the bile hydroxyppyrene level was higher in Seine ($3.00 \pm 2.26 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) vs Canche ($0.58 \pm 0.83 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$); the levels being not different in summer for Seine ($0.99 \pm 1.21 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) vs Canche ($0.63 \pm 0.33 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) (Fig. 3b).

Physiological and health status

Flounder total length, age, sex ratio

The collected adult-fish displayed a total length between 25 and 33 cm; the individual age was determined by reading

otoliths ($2+ \leq$ cohorts detected in the fish samples $\leq 5+$). The sex ratios (males/females) per season were similar in the two estuaries (January: SR Canche = 0.87 / SR Seine = 0.58; July: SR Canche = 0.46 / SR Seine = 0.40).

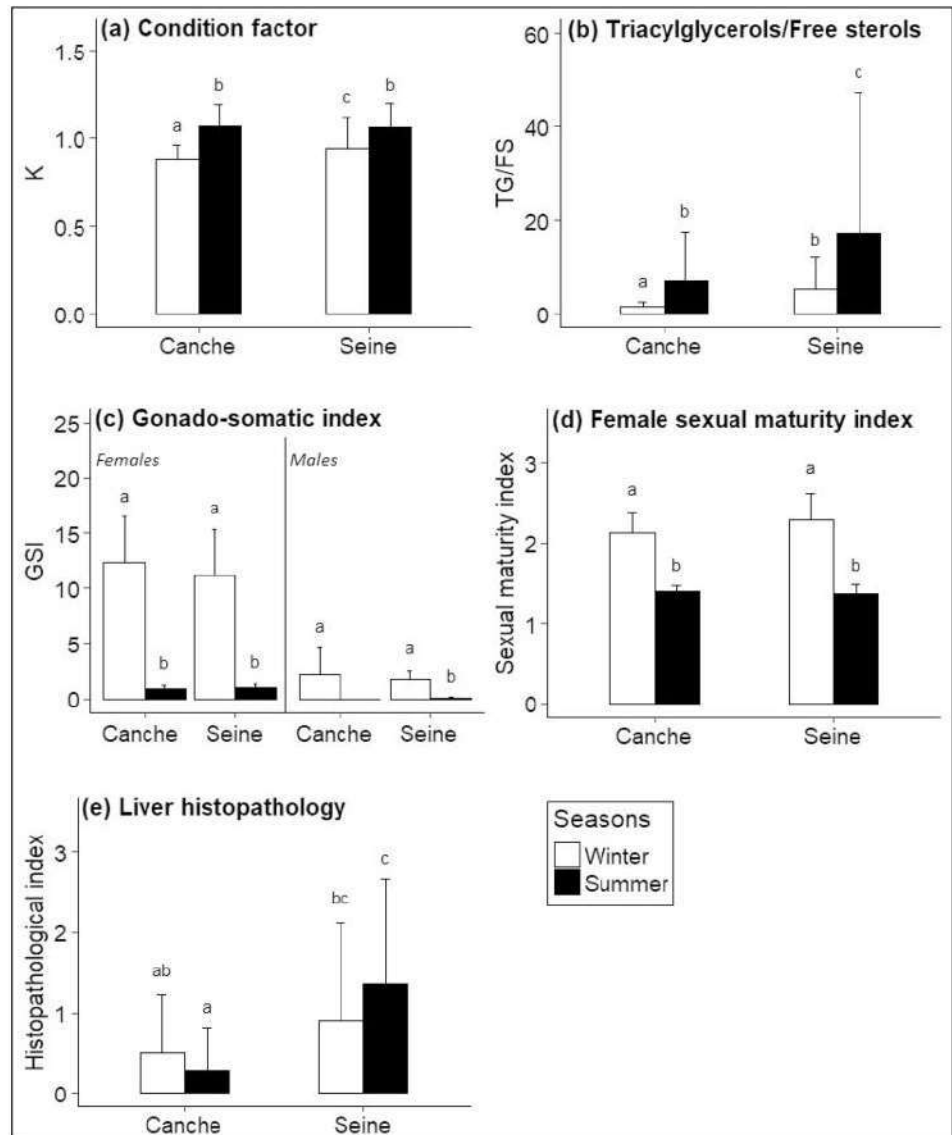
Fulton's condition factor, growth rate, muscle lipids

The Fulton's condition factor (K) showed a significant difference between seasons but not between estuaries (Fig. 4a). K was significantly lower in winter (Canche: 0.88 ± 0.08 , Seine: 0.95 ± 0.18) than in summer (Canche: 1.07 ± 0.13 , Seine: 1.06 ± 0.14).

The average flounder growth rates (between 8- and 20-month-old-fish) estimated using otoliths were not significantly different between the Canche and Seine populations, with respectively $8.78 \pm 2.37 \text{ cm/year}$ and $9.78 \pm 2.56 \text{ cm/year}$.

The amount of total lipids in flounder muscle was lower in winter than in summer for the two estuaries (Table 1). The triacylglycerols (TG) were the major reserves of lipids but the Seine population presented a higher winter concentration than the Canche population. Regarding the bioactive membrane lipids (free sterols (FS), phosphatidylserine (PS), sphingomyelin (SPG)), no significant difference was

Fig. 4 Physiological and health status of *P. flesus* from Canche and Seine estuaries. Mean (and 95% confidence interval). **a** Fish condition factor. **b** Triacylglycerols/Free sterols: lipid storage index. **c** Gonadosomatic index. **d** Female sexual maturity index assessed by histology. **e** Liver histopathology. (Statistics: Kruskal–Wallis test: *p* value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries and seasons)



detected for FS and PS levels between estuaries and between seasons; a higher winter SPG level being observed in Seine ($0.38 \pm 0.12 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{fw}$) vs Canche ($0.30 \pm 0.11 \mu\text{g} \cdot \text{mg}^{-1} \text{fw}$) (Table 1).

The lipid storage index: triacylglycerols/free sterols (TG/FS) was significantly higher in Seine vs Canche in winter and summer; the two estuaries displaying higher TG/FS levels in summer vs winter (Fig. 4b).

Gonadosomatic index, sexual maturity index, plasma steroids, and vitellogenin

The female GSI (Fig. 4c) showed a significant difference between the seasons, but not between the flounder populations. GSI was higher in the winter reproduction period (Canche: $12.42 \pm 4.11\%$; Seine: $11.26 \pm 4.09\%$)

vs the summer rest period (Canche: $0.93 \pm 0.34\%$, Seine: $1.03 \pm 0.34\%$). The same pattern was observed for the male GSI in both estuaries (Fig. 4c).

The histology of male gonads showed no intersex fish, i.e. the absence of individuals characterized by the presence of primary and secondary oocytes within their testes.

The female sexual maturity index analysed by histology (Fig. 4d) displayed a higher level in winter, similar in Canche (2.12 ± 0.25) and Seine (2.28 ± 0.34). This index was lower in summer and again similar in Canche (1.39 ± 0.08) and Seine (1.37 ± 0.11).

The female E2 plasma level (Table 2) was significantly higher in winter (Canche: $3802.88 \pm 3246.81 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Seine: $3958.11 \pm 1960.74 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$) than in summer (Canche: $75.20 \pm 72.23 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Seine: $81.3 \pm 52.56 \text{ pg} \cdot \text{mL}^{-1}$).

Table 1 Muscle lipid content measured in *P. flesus* from Canche and Seine estuaries. Muscle lipid content expressed in µg of lipid per milligram of fresh weight.

	Canche in winter	Canche in summer	Seine in winter	Seine in summer
Storage lipids (µg.mg⁻¹)				
ALC	0.03 ± 0.02 ^(a)	0.03 ± 0.05 ^(ab)	0.032 ± 0.02 ^(a)	0.02 ± 0.03 ^(b)
FFA	0.05 ± 0.03	0.06 ± 0.07	0.054 ± 0.04	0.06 ± 0.05
GE	0.003 ± 0.01 ^(a)	0.06 ± 0.08 ^(b)	0.006 ± 0.01 ^(a)	0.05 ± 0.07 ^(b)
SE	0.077 ± 0.03	0.08 ± 0.07	0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.07
TG	0.62 ± 0.38 ^(a)	4.05 ± 5.18 ^(bc)	2.35 ± 2.82 ^(b)	10.69 ± 18.70 ^(c)
∑ storage lipids	0.78 ± 0.39 ^(a)	4.30 ± 5.20 ^(bc)	2.51 ± 2.82 ^(b)	10.90 ± 18.71 ^(c)
Membrane lipids (µg.mg⁻¹)				
FS	0.44 ± 0.07 ^(a)	0.62 ± 0.11 ^(b)	0.46 ± 0.07 ^(a)	0.60 ± 0.09 ^(b)
CL	0.13 ± 0.11 ^(ac)	0.04 ± 0.07 ^(bc)	0.08 ± 0.05 ^(c)	0.12 ± 0.05 ^(a)
LPC	0.21 ± 0.08	0.21 ± 0.15	0.25 ± 0.10	0.23 ± 0.10
PC	5.02 ± 1.78	5.17 ± 2.65	4.97 ± 1.36	5.26 ± 2.52
PE	1.87 ± 0.68 ^(ac)	2.23 ± 0.29 ^(b)	1.86 ± 0.36 ^(c)	2.03 ± 0.42 ^(ab)
PI	0.71 ± 0.25	0.70 ± 0.13	0.66 ± 0.14	0.72 ± 0.16
PS	0.24 ± 0.08 ^(a)	0.94 ± 0.82 ^(b)	0.28 ± 0.08 ^(a)	0.70 ± 0.71 ^(b)
SPG	0.30 ± 0.11 ^(a)	0.33 ± 0.17 ^(ab)	0.38 ± 0.11 ^(b)	0.30 ± 0.10 ^(a)
∑ Membrane lipids	8.91 ± 2.73 ^(ac)	10.25 ± 2.22 ^(b)	8.95 ± 1.78 ^(c)	9.98 ± 2.44 ^(bc)
Total lipids (µg.mg ⁻¹)	9.69 ± 2.71 ^(a)	14.55 ± 5.48 ^(b)	11.46 ± 3.51 ^(a)	20.87 ± 19.14 ^(b)

ALC fatty alcohols, FFA free fatty acid, GE glyceride ethers, SE sterol esters, TG triacylglycerols, FS free sterols, CL cardiolipins, LPC lysophosphatidylcholine, PC phosphatidylcholine, PE phosphatidylethanolamine, PI phosphatidylinositol, PS phosphatidylserine, SPG sphingomyelin. (Statistics: Kruskal–Wallis test: *p* value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries and seasons)

mL⁻¹). No significant E2 differences were detected between the two estuaries.

The same pattern was observed for the male 11-KT (Table 2) (Canche winter: 4170.54 ± 3246.81 pg.mL⁻¹, Seine winter: 2405.45 ± 1444.91 pg.mL⁻¹, Canche summer: 325.28 ± 59.55 pg.mL⁻¹, Seine summer: 436.13 ± 180.51 pg.mL⁻¹).

The VTG measured in males (Table 2) was not different in Canche winter (24.94 ± 1.13 ng.mL⁻¹), Canche summer (23.53 ± 1.47 ng.mL⁻¹), and Seine Summer (25.15 ± 4.32 ng.mL⁻¹). The lowest level of male VTG was detected in Seine winter (19.97 ± 1.62 ng.mL⁻¹).

Liver histopathology

The main alterations detected by histology on flounder livers were displayed in Fig. 5. Overall, the most observed

liver lesions were assigned to grade 1. Thus, an excessive accumulation of lipids (lipidosis or steatosis) was observed in winter and summer in the Seine and Canche estuaries; this accumulation being not considered a pre-neoplastic lesion in fish.

During both seasons, livers showed a higher percentage of melanomacrophagic aggregates in Seine vs Canche (winter: 23% vs 7%; summer: 17% vs 0%, respectively).

In summer, the hydropic vacuolation considered a non-nodular lesion was detected in the Seine fish (28%) but was not observed in the Canche.

A FCA-type nodular lesion, a pre-tumour liver damage, was only detected in the Seine (one in summer and one in winter).

Finally, the global histopathological index was significantly higher in Seine vs Canche, in summer (Fig. 4e).

Table 2 Hormones and vitellogenin in plasma of *P. flesus* from Canche and Seine estuaries.

	Canche in winter	Canche in summer	Seine in winter	Seine in summer
Female E2 pg.mL ⁻¹	3802.87 ± 3246.81 ^(a)	75.20 ± 72.23 ^(b)	3958.11 ± 1960.74 ^(a)	81.30 ± 52.56 ^(b)
Male 11KT pg.mL ⁻¹	4170.54 ± 3246.81 ^(a)	325.28 ± 59.55 ^(b)	2405.45 ± 1444.91 ^(a)	436.12 ± 180.51 ^(b)
Male [VTG] ng.mL ⁻¹	24.94 ± 1.13 ^(a)	23.53 ± 1.46 ^(a)	19.97 ± 1.62 ^(b)	25.15 ± 4.32 ^(a)

Mean (and 95% confidence interval). Female E2: 17β-estradiol; Male 11-KT: 11-ketotestosterone; Male VTG: Vitellogenin. (Statistics: Kruskal–Wallis test: *p* value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries and seasons)

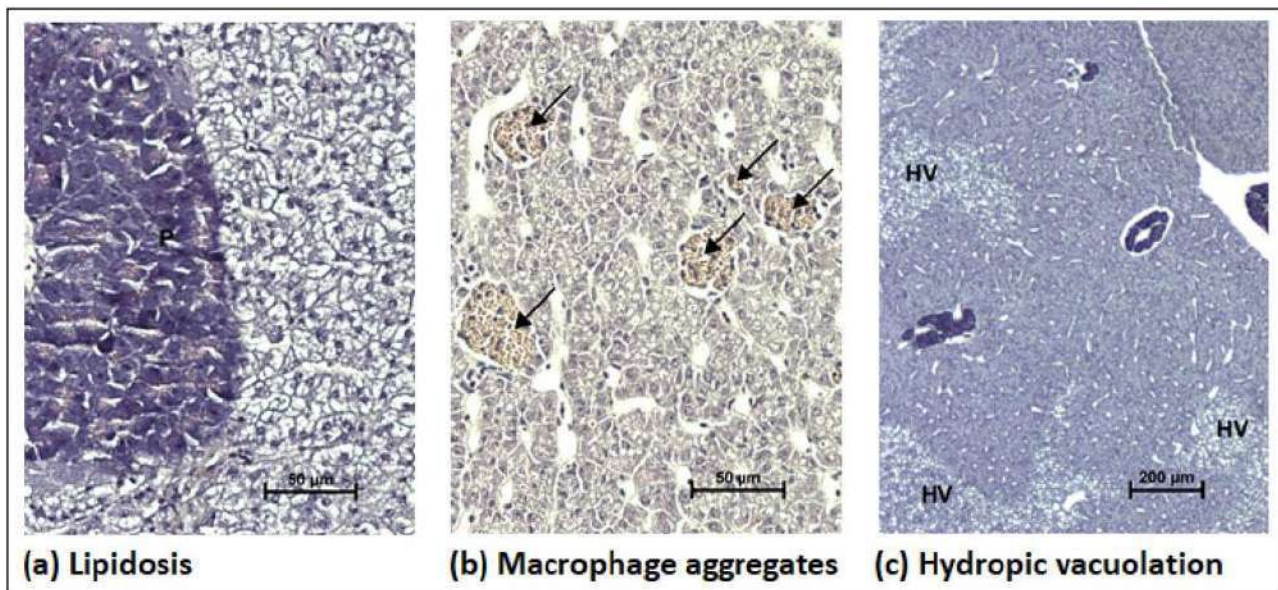


Fig. 5 Histological presentation of the main European flounder liver alterations. **a** Lipidosis: parenchymal cells (hepatocytes) containing few large lipid vacuoles (P=exocrine pancreatic component). **b**

Increase in number and size of macrophage aggregates (arrows). **c** Focal region of hydropic vacuolation (HV) of hepatocytes

Biomarkers

Acetylcholinesterase and EROD activities

The brain AChE activity (Fig. 6a) was the highest in winter in both estuaries; this winter activity being higher in Canche ($0.31 \pm 0.11 \mu\text{mol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$) than in Seine ($0.19 \pm 0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$). No significant difference was detected in the brain AChE activities in summer between both estuaries.

The liver female EROD activity (Fig. 6b) was the highest in summer, with the level in Seine ($7.88 \pm 5.21 \text{ pmol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$) being twice as strong as the level in Canche ($3.55 \pm 2.37 \text{ pmol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$). In winter, the female EROD activity was three times higher in Seine ($3.56 \pm 2.45 \text{ pmol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$) than in Canche ($1.18 \pm 0.45 \text{ pmol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$). An inverse seasonal trend was detected for the male EROD activities (Fig. 6b) which were higher in winter vs summer; the winter EROD activity being higher in Seine ($12.27 \pm 8.54 \text{ pmol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$) than in Canche ($8.50 \pm 13.16 \text{ pmol} \cdot \text{min} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$).

Genotoxicity and lipid peroxidation

In winter, a higher blood cell DNA damage expressed as % of DNA tail (Fig. 6c) was detected in Canche ($49.99 \pm 7.87\%$) vs Seine ($29.895 \pm 4.56\%$). The levels of DNA damage were not different in summer for Canche and Seine (from 44 to 50%).

The gill lipid-peroxidation (Fig. 6d) was higher in winter for both estuaries; a significant higher peroxidation level being only observed in winter in Seine ($3.55 \pm 0.39 \text{ nmol eq. MDA} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$) vs Canche ($2.58 \pm 0.55 \text{ nmol eq. MDA} \cdot \text{mg} \cdot \text{prot}^{-1}$).

Metabolic activities

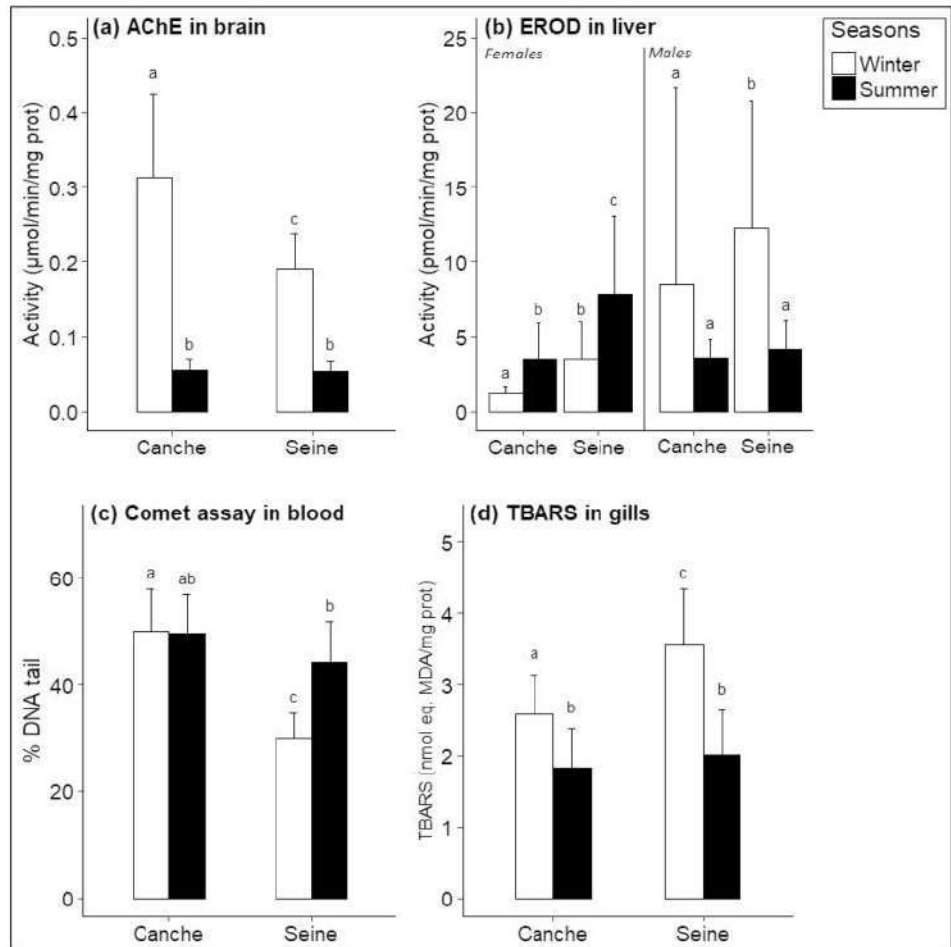
The liver G6PDH activity (Fig. 7a) was the highest in summer in Seine ($0.20 \pm 0.15 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$), with no significant difference detected between the three other conditions ($0.087 < \text{G6PDH activity} < 0.1 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Globally, the liver CS activity (Fig. 7b) was lower in Seine vs Canche, whatever the season. A significant increase of this CS activity was detected from winter to summer in the Canche (0.0014 ± 0.0006 to $0.0028 \pm 0.0017 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$), while an inverse trend was observed in the Seine (0.0010 ± 0.0003 to $0.0006 \pm 0.0006 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$). The muscle CS activity (Fig. 7c) was the highest in Canche in summer ($1.122 \pm 0.081 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$); the other conditions showing a similar activity ($0.080 \text{ IU} \cdot \text{mg}^{-1}$).

Data integration

Globally, the present results (3.1 to 3.5) highlight in winter vs summer (1) higher levels of chemical contamination in the flounder populations of Seine and Canche and (2) more contrasted phenotypic responses between the two fish populations. Thus, two principal component analyses (PCA)

Fig. 6 Biomarkers measured in *P. fesus* from Canche and Seine estuaries. **a** AChE: acetylcholinesterase enzymatic activity in brain. **b** Male and female EROD activities measured in liver. **c** Comet assay measured in blood. **d** Lipid peroxidation (TBARS) measured in gills. (Statistics: Kruskal–Wallis test; *p* value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries and seasons)



were performed for the flounder populations in winter, to integrate fish markers not directly linked to reproductive status and sex. The relationships between the following markers were analysed by PCA: bile hydroxypyrene, physiological and health status (fish total length TL, condition factor K, lipid storage index TG/FS, muscle bioactive membrane lipids (free sterols FS, phosphatidylserine PS, sphingomyelin SPG), liver histopathology index, biomarkers (brain acetylcholinesterase: AChE, blood DNA damage: GENOTOXICITY, gill lipid peroxidation: TBARS), metabolic activities (G6PDH and CS enzymatic activities).

The two first axes of the PCA explained 40.5% and 34.3% of the total variance of the data set, respectively, for Canche and Seine populations (Fig. 8). In the Canche estuary (Fig. 8a), two variables (TBARS and K) were negatively correlated with another group of variables (Genotoxicity, AChE, PS, and SPG). In the Seine estuary (Fig. 8b), a group of variables (TBARS, Histopathology, CS_liver, G6PDH_liver) was negatively correlated with another group of variables (PS and SPG).

Discussion

Temporal trends in winter water temperature in estuaries

The annual winter flounder migration from colder estuarine habitats to warmer coastal and offshore spawning grounds is considered to be a fish response to maintain higher gonadal growth prior to spawning (Graham and Harrod 2009); the Seine flounder spawning peak being classically observed in February, in 2000–2001 (Gallien-Landriau 2003).

The temporal variability in Seine and Canche minimum water temperatures in December–January (two months before the average spawning peak) showed high stabilized values, from the winter 2017–2018 to nowadays. This temporal trend of the winter climate over the Seine and Canche estuaries confirms that the overall rise in coastal winter sea surface temperatures between 1970 and 2010 over the Eastern English Channel (Fincham et al. 2013) was maintained over the last decade 2010–2020. Over the English Channel

Fig. 7 Metabolic activities measured in *P. flesus* from Canche and Seine estuaries. **a** G6PDH enzymatic activity measured in liver. **b** CS enzymatic activity measured in liver. **c** CS enzymatique activity measured in muscle. (Statistics: Kruskal–Wallis test; p value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries and seasons)

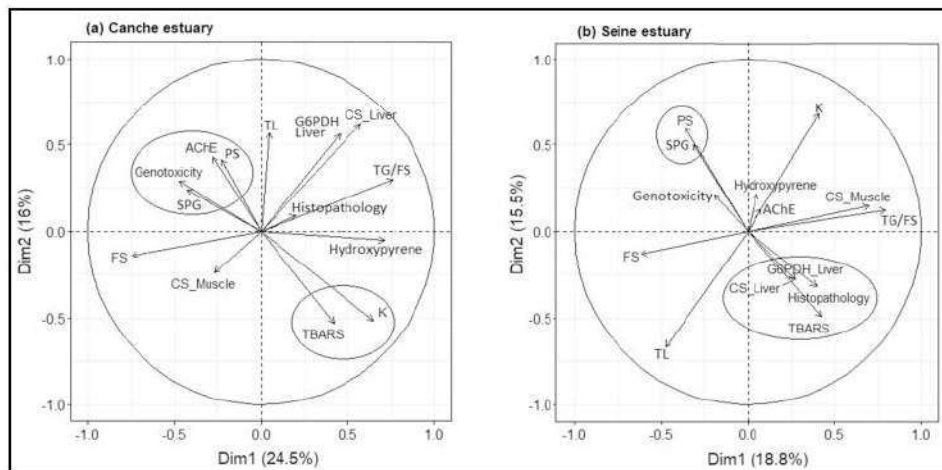
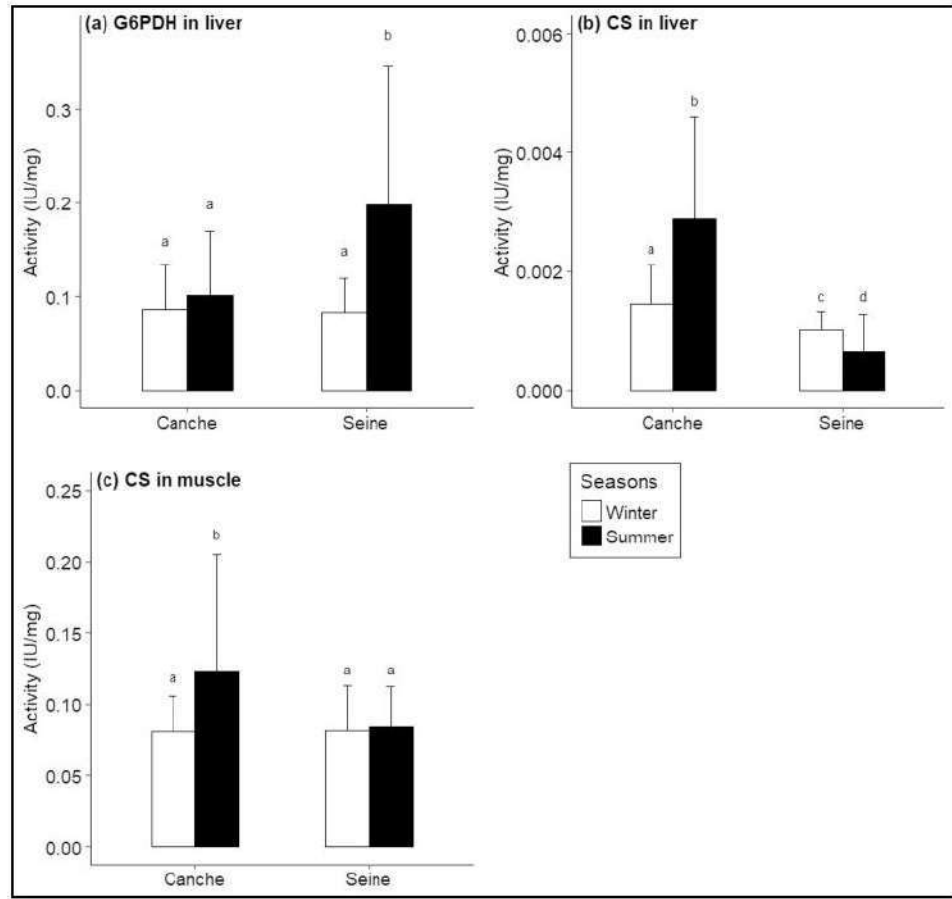


Fig. 8 Principal component analysis (axe 1 and 2). Distribution of 15 markers on the correlation circle in the Canche and Seine flounder populations. G6PDH_liver: glucose-6-phosphate deshydrogenase; CS_liver, CS_muscle: citrate synthase; AChE: brain acetylcholinesterase; Genotoxicity: DNA damage on blood cells; liver histopathol-

ogy index; bile hydroxypyrene; TBARS: lipid peroxydation in gills; K: condition index; TL: fish total length; SPG: sphingomyelin; FS: free sterols; PS: phosphatidylserine; TG: triacylglycerols; TG/FS: lipid storage index

and the North-Sea, the shift in the timing of spawning in sole (classically timed in late winter or spring) was linked to warming sea temperatures (Fincham et al. 2013). We suggest

that the phenology of the flounder spawning could also be modified by such climate change in winter.

Fish contamination by metals and organic pollutants

The flounder liver contamination by metals was rather similar in Seine and Canche estuaries, particularly in winter; the summer contamination levels being however depleted in particular metals (Co, Cr, Ni) in Canche vs Seine. Convergent levels of metal contamination in flounder were also detected in Seine and Canche in the past, considering adults (Henry et al. 2004) and juveniles (Henry et al. 2012). In the present study, we suggest that the lower levels of metals in the Canche flounder in summer could be related to a strong reduction of metal fluxes between the Seine and the Southern Bight of the North Sea, linked to weak river flow.

In this study, the levels of toxic metals such as Cd in Seine and Canche ($0.2\text{--}0.4\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{dw}$) were higher than those observed in adult flounders from moderately anthropised coastal systems in the Ushant Sea, Bay of Douarnenez ($\text{Cd}=0.09\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{dw}$ in Borcier et al. 2020) or in the Bay of Biscay, Ster estuary ($\text{Cd}=0.01\ \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\ \text{dw}$ in Evrard et al. 2010). However, the liver flounder levels of Cr, Cd, Ni, Hg in Seine and Canche presented concentrations around five times lower than those detected in flounder from the highly polluted UK estuaries: Tyne and Mersey (Williams et al. 2011).

The flounder liver concentrations in PCBs were 10–15 times higher in Seine vs Canche; a PCBs decrease being observed in summer vs winter, particularly in the Seine estuary. The PCBs level in the Canche estuary ($\approx 300\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\ \text{dw}$) was similar to the status of moderately polluted systems as the Ster estuary in the Bay of Biscay ($\approx 200\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\ \text{dw}$ in Evrard et al. 2010). On the other hand, the Seine PCBs level observed in winter ($4700\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\ \text{dw}$) was considerably higher than those observed in large polluted French estuaries with $500 < \text{PCBs} < 800\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\ \text{dw}$ in Loire and Gironde (Evrard et al. 2010), or in heavily polluted systems in the UK with $400 < \text{PCBs} < 1600\ \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\ \text{dw}$ in Tyne and Mersey (Williams et al. 2011).

In the Seine system, the lower Flounder PCBs level in summer (rest period) vs winter (reproduction period) could be related to a probable decontamination of adult fish during the reproduction. One part of the lipophilic pollutants was transferred to oocytes then eliminated by spawning (Ostrach et al. 2008), or directly metabolized during the reserve mobilization for the reproduction.

The higher value of bile hydroxypyrene detected in Seine vs Canche, particularly in winter, highlights a strong flounder metabolism of the pyrene, a widely distributed PAH in the Seine. The levels of flounder bile hydroxypyrene showed that concentrations were 4 to 17 times higher, respectively, in Seine vs North Sea—Holland and in Seine vs Iceland (Kamman et al. 2017). We suggest that the intensive dredging activities conducted in the Seine to maintain the

navigation channel depth could be a major factor increasing the flounder contamination by PAHs in this estuary, as described in other industrial estuaries in Europe (Vethaak et al. 2016).

Fish health indicators: condition factor, storage and membrane lipids, growth rate, liver histopathology

The flounder condition factor was similar in Seine vs Canche, with a lower value in winter vs summer. This decrease in January flounder condition was due to fasting during mobilization of body energy stores required for the final gonad maturation; a restauration of the condition factor being observed in post-spawning fish in July. The temporal variability of muscle lipids showed globally the same trend with lower values in January vs July, but the lipid storage index (TG/FS: triacylglycerols/free sterols) was significantly higher in Seine vs Canche, whatever the season. In previous studies conducted on the adult flounders in November–December, in the UK and the Baltic Sea, heavily polluted sites displayed the lowest fish conditions (Kleinkauf et al. 2004b; Dabrowska et al. 2017). In the present study, we suggest that the higher muscle lipid storage in Seine vs Canche could be related to the higher benthic prey production in the Seine estuarine system, where larger intertidal mudflats could produce the major part of the flounder diet.

The concentrations of bioactive muscle membrane lipids (free sterols (FS), phosphatidylserine (PS), sphingomyelin (SPG)) were also analysed in this study and showed a significant increase of winter SPG in Seine vs Canche. SPG is a type of sphingolipids which are located in plasma membrane and endoplasmic reticulum membrane; they are associated with sterols to form heterogeneities in the membrane called lipid rafts which show an important proportion of Cytochrome P450s (Brignac-Huber et al. 2016). This sphingolipids-sterols association is essential for maintaining endoplasmic reticulum homeostasis (Kajiwara et al. 2012). Thus, in the present study, we suggest that the increase of SPG in winter, in Seine vs Canche could be related to an increase of the lipid rafts density in the endoplasmic reticulum to improve the cell capacity for xenobiotic metabolism. This result confirms a previous study on the flounder responses in Seine vs Douarnenez Bay, a moderately polluted system (Borcier et al. 2020) where the authors suggest that the variation in the content of muscle SPG could become a relevant marker in ecotoxicology.

An increase of FS and PS levels in flounder lipids was also reported in Seine vs Douarnenez Bay (Borcier et al. 2020); this trend was not confirmed in the present study and could be related to different sampling seasons between the two studies. PS is an anionic phospholipid that should facilitate protein insertion in membrane and thus should also play

a key role in the regulation of cellular functions in plasma membranes and organelles (Brignac-Huber et al. 2016). In the present study, the general increase of the PS and FS detected in summer vs winter for Seine and Canche could be related to their role in the maintenance of the membrane fluidity (Leventis and Grinstein 2010).

The similar 8- to 20-month-old flounder growth rates (≈ 9 cm/year) estimated in both studied estuaries was previously observed in polluted large French estuaries such as Seine, Loire, and Gironde. However, less polluted systems showed higher flounder growth rates (14–16 cm/year) (Marchand et al. 2004; Evrard et al. 2010).

The higher liver histopathological-index measured in fish caught in Seine vs Canche in summer was mainly explained by the high prevalence of melanographic aggregates (17%) and hydropic vacuolations (28%) in Seine; these non-nodular lesions were not detected in Canche and could reflect the exposure of Seine fish to toxic substances and particularly hydrocarbons (Feist et al. 2004). An FCA-type nodular lesion was detected once in winter and in summer, only in the Seine estuary; this lesion being generally considered a precursor to benign or malignant liver tumours in polluted environments (Myers et al. 1998). The frequency of the pre-tumour FCA lesion is correlated with the size-age of the fish sampled, insofar a neoplastic progression can take several years (Rhodes et al. 1987). Furthermore, in the present study, the prevalence of histopathological lesions was shown to vary according to sampling season; this result being confirmed in French Atlantic estuaries where liver necrosis occurs more frequently in flounders during summer (Cachot et al. 2013). A significant association between ulcer occurrence and measured body burdens, PAH metabolites and toxicopathic liver lesions was observed in a flounder population in the Dutch Wadden Sea (Martínez-Gómez and Vethaak 2019). The flounder displayed higher prevalence (particularly of melanomacrophage aggregates, inflammation, and necrotic foci) in contaminated vs reference sites in the UK (Lyons et al. 2004); thus, we suggest that the higher histopathological index in Seine vs Canche was probably related to a higher chemical contamination.

Phenology of the reproduction

The flounder gonad maturation cycle appeared very similar in both estuarine systems, Seine and Canche. For males and females, high *GSI* in January followed by low *GSI* in July were observed in this study. They confirmed the general trend detected for the flounder in the Eastern Channel where growing and maturing gonads were observed in November–January, normally preceding a reproduction peak in February; gonads at rest being observed in summer (Gallien-Landriau 2003). However, the Seine female *GSI* obtained in the present study (January 2018, *GSI* = 11.26%)

was lower than the *GSI* assessed in our previous study in Seine (January 2003, *GSI* = 18.32%) (Marchand et al. 2004). Furthermore, this Seine January female flounder *GSI* appeared relatively weak compared to the range of female *GSI* observed in January 2003 for four French Atlantic estuaries ($14.1\% < GSI < 26.9\%$) (Marchand et al. 2004).

In the present study, a similar trend was observed for the female sexual maturity index (FSM) assessed by ovary histology, with higher value in January vs July. Furthermore, the low value of the FSM detected for both estuaries (FSM ≈ 2.2) in January 2018 showed that, this year, the majority of the oocytes were not at the stage 3 (active vitellogenesis) or at the stage 4 (hydrated oocytes). This low index is the mark of a weak vitellogenesis in January 2018 compared to previous studies conducted in January (over the period 1975–2002) where 70% of Seine flounders showed advanced vitellogenesis (Gallien-Landriau 2003) and all the Douarnenez Bay flounders displayed final oocyte maturation (Déniel 1981).

The convergent decreasing trend detected in Seine and Canche, for the *GSI* and the vitellogenesis in January 2018 vs 2003 and anterior years, confirms that the higher water temperatures during the vitellogenesis period in November–December 2018 could cause a delay in oocyte maturation and spawning of the flounder in the Eastern Channel. Thus, warming sea temperatures over the English Channel during winter significantly affect the date of peak spawning, leading to earlier spawning for the Lusitanian species like the sole *Solea solea* (Fincham et al. 2013), and to later spawning for boreal species like the flounder and halibut (Sims et al. 2005; Brown et al. 2006).

Undetected reproductive endocrine disruption

In this study, no male flounders were intersex, i.e. had gonads with both male and female tissues in 2018, whereas they were 8% in the Seine in 1998 (Minier et al. 2000); this decrease could be related to the general improvement of the Seine water quality during the last decades (Fisson et al. 2014). This lessening in the degree of estrogenic endocrine disruption phenomenon was also suggested in polluted estuaries in the UK, where only 0.5% of the male flounders contained ovotestes (Kleinkauf et al. 2004a).

The presence of vitellogenin (VTG; egg yolk protein) in the male plasma is considered to be a very sensitive biomarker of exposure to exogenous estrogen in fish (Kar et al. 2021). In the present study, the male VTG levels were very low (20 to 25 ng.mL⁻¹ in plasma) in Seine and Canche compared to the average concentrations of 125 µg.mL⁻¹ and 5 mg.mL⁻¹ detected in the past, respectively, in the Seine (Minier and Amara 2008) and in heavily polluted UK estuaries (Kleinkauf et al. 2004a); they confirmed the actual low

impact of endocrine disruptors on male gonads of flounder in Seine and Canche.

The flounder steroid plasma levels in Seine and Canche decreased considerably in summer vs winter, with spermatogenesis, vitellogenesis, and oocyte maturation, as classically described in the literature (Blazer et al. 2012). The January female E2 assessed in this study for both estuaries ($\approx 3900 \text{ pg.mL}^{-1}$) appeared higher than the one observed in Seine 2001 (1500 pg.mL^{-1}) by Gallien-Landriau (2003); however, we suggest that this limited difference is probably not related to the impact of estrogenic endocrine disruptors on ovaries. The January male 11KT of this study was very close to the Seine 2001 study (Gallien-Landriau 2003) (respectively ≈ 3300 vs 3000 pg.mL^{-1}).

Finally, no major impact of endocrine disruptors on gonads was detected in the flounder populations of Seine and Canche, in the present study.

Biomarkers and metabolic activities

Three biomarkers of damage were explored in the present study (AChE in brain, comet assay in blood, TBARS in gills). The winter lower brain AChE activity detected in Seine vs Canche underlined a higher flounder neurotoxicity induced by the cocktail of pollutants in the Seine system characterized by a very complex mixture of pesticides, metals, detergents and hydrocarbons (Poisson et al. 2011). The AChE level in Seine was particularly stable in autumn and winter, from 2008 to nowadays (AChE activity $\approx 0.2 \text{ } \mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg prot}$) (Burgeot et al. 2017; Borcier et al. 2020; this study).

On the other hand, the blood cell DNA damage assessed by the comet assay in winter showed reduced DNA damages in Seine vs Canche. As numerous chemicals in the field cause DNA damage, the reduced genotoxicity in Seine in winter confirms that in this heavily and chronically contaminated estuary, a selection is acting on the organisms' ability to protect and/or repair their DNA (Marchand et al. 2004; 2013). In the moderately polluted Canche, this selection is probably not active; thus, the flounder displays higher DNA damage.

Pollution induces oxidative stress in aquatic organisms since many pollutants are redox cycling compounds and can induce lipid peroxidation (Lushchak and Bagnyukova 2006). Thus, we suggest that the major fluxes of pollutants in estuaries in winter could explain the higher gill lipid peroxidation in Seine vs Canche.

The EROD activity, a biomarker of defence, showed low values in the Seine and Canche estuaries (EROD activity $< 12 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg prot}$), compared to other polluted but open coastal zones in the Baltic Sea (flounder EROD $\approx 250 \text{ pmol}/\text{min}/\text{mg prot}$) (Dabrowska et al. 2017). We suggest that the low EROD activity particularly in the Seine

estuary could be related to a possible adaptation of the flounder population inhabiting chronically contaminated waters with organic pollutants (Brammell et al. 2013). However, in the present study, the EROD activity remained globally higher in Seine vs Canche, whatever the sex. Furthermore, in Seine and Canche, the reduced female EROD activity in winter vs summer was probably linked to the suppressive effect of the hormone 17 β -estradiol on this activity during the flounder ovary maturation (Kirby et al. 2007).

The glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH: a key regulatory enzyme of the pentose-phosphate shunt, essential for the regeneration of NADPH for biotransformation and detoxification reactions) and the Citrate Synthase (CS: a key enzyme in the Krebs cycle) could be considered pertinent proxies of defence against oxidative damage and aerobiosis in flounder populations (Pédrón et al. 2017a, 2017b). Furthermore, the CS activity could be considered a proxy of mitochondrial amount in tissues and thus was related to aerobic metabolic rate of fish (Norin and Malte 2012). In the present study, we suggest that the higher liver G6PDH activity in July in Seine vs Canche could be related to the fish response to a marked oxidative stress in the Seine system in summer. A convergent trend was observed for the CS activities in liver and muscle within each estuary, with an increase vs a decrease or maintenance of the activities, respectively, in Canche and Seine, from winter to summer. We hypothesize that a possible impairment in mitochondrial metabolism of the Seine flounders prevents them to increase their metabolic rate in response to the increase of water temperature in July.

Potential relationships between sphingomyelin, phosphatidylserine, and lipid peroxidation

The fish markers integration was carried out within the Canche and Seine estuaries in winter, *i.e.* in the season displaying the highest levels of contaminants in fish tissues. A negative correlation between the group SPG-PS and the lipid peroxidation TBARS was clearly detected in the two estuaries. We suggest that the increase of the particular bioactive lipids sphingomyelin (SPG) and phosphatidylserine (PS) in plasma membrane and organelles could conduct to a better resistance towards the oxidative stress induced in heavily polluted or moderately contaminated sites, respectively, the Seine and the Canche estuary. Thus, the present study confirms the potential role of SPG and PS in the flounder antioxidant defence against pollutants detected in a previous study (Borcier et al. 2020). Furthermore, within the Seine estuary, higher levels of lipid peroxidation were positively and strongly correlated with the histopathology index and the liver G6PDH activity, confirming the possible links between oxidative stress and liver pathology in flounders living in chronically polluted sites (Koehler 2004).

Conclusions

During the flounder reproduction period in winter, a major coastal flow of the English Channel drifts north-eastward in the English Channel, from Le Havre to Dunkirk, carrying pollutants and probably also many flounder eggs and larvae produced by a large spawning site in the Seine mouth estuary. The connectivity between flounder populations over the Eastern-Channel could be enhanced by maximum Seine river discharge, favourable wind conditions, and long flounder larval duration (70 days) (Barbut et al. 2019). Thus, the fluxes of pollutants over the Channel could explain similar metal levels in flounders from the Seine and Canche particularly in winter; high organic pollutants levels in flounder being only detected in the industrial Seine estuary. The overall rise in coastal winter water temperatures detected over the Channel impairs the flounder reproduction phenology in both estuaries, inducing a delay of maturation process and probably also of reproduction. In cold winters (Gallien-Landriau 2003), the flounder reproduction peak was usually detected in February and we suggest now that the spawning period in the Channel could be delayed and extended by several weeks or even months (March–April or possibly later May–June). In the past, the major recruitment event of young of the year juvenile flounders (2–3 cm long) along the French Atlantic estuaries was classically detected in May (Masson 1987). However, this last decade, we observed a second recruitment peak of 2–3 cm juveniles in September. We suggest that flounder embryos produced at the end of the spawning season might have a lower survival over those produced earlier, as observed in the winter flounder in the USA (Buckley et al. 1991). This hypothesis could explain the lowest juvenile flounder abundances associated to hot winters in the UK estuaries (Attrill and Power 2002).

Finally, the present study shows that the warming waters of coastal systems could impair the flounder phenology of reproduction, and possibly its future recruitment in estuaries over the Eastern English Channel. The impact of chemical stress was also clearly detected in the Seine flounder population and was probably not negligible in the Canche population. Furthermore, the Seine juvenile flounders could display a lower tolerance to thermal stress compared to moderately contaminated fish from the Bay of Biscay (Lavergne et al. 2015). Thus, we suggest that the Seine flounder population (and possibly the connected Eastern Channel flounder populations over the French Coast) could be seriously impacted in the future by multistress: higher winter temperatures and chemical contamination.

Author contribution Formal analysis was conducted by J. Laurent, E. Lavergne, J. Couteau, S. Devin, and C. Fisson. Investigations were performed by J. Laurent, J. Couteau, S. Le Floch, B. Ouddane, J.

Cachot, B. Davail, C. Clérandeau, A. Devaux, R. Amara, M. Diop, V. Pichereau, and J. Laroche. Resources were provided by J. Couteau, S. Le Floch, B. Ouddane, J. Cachot, A. Devaux, and R. Amara. The original draft was written by J. Laurent and J. Laroche, then reviewed and edited by E. Lavergne, J. Couteau, J. Cachot, B. Davail, and V. Pichereau. Funding was acquired thanks to R. Amara and J. Laroche. Finally, J. Laroche was in charge of the conceptualisation and the supervision of the project.

Funding This work was funded by the project “Seine Aval 6 – HQFish,” and benefited from the French GDR “Aquatic Ecotoxicology” framework which aims at fostering stimulating scientific discussions and collaborations for more integrative approaches.

Data availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed.

Consent for publication All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

References

- Aas E, Beyer J, Goksøyr A (2000) Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: an evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation. *Biomarkers* 5:9–23
- Attrill MJ, Power M (2002) Climatic influence on a marine fish assemblage. *Nature* 417:275–278
- Barbut L, Groot Grego C, Delerue-Ricard S, Vandamme S, Volckaert FAM, Lacroix G (2019) How larval traits of six flatfish impacts connectivity. *Limnol Oceanogr* 9999:1–22
- Belles A, Alary C, Rivière A, Guillon S, Patault E, Flipo N, Franke C (2019) Transfer pathways and fluxes of water-soluble pesticides in various compartments of the agriculture catchment of the Canche river (Northern France). *Water* 11:1428
- Blazer VS, Iwanowicz LR, Henderson JA, Alvarez DA, Young JA (2012) Reproductive endocrine disruption in smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*) in the Potomac River basin: spatial and temporal comparisons of biological effects. *Environ Monit Assess* 184:4309–4334
- Borcier E, Charrier G, Couteau J, Maillet G, Le Grand F, Bideau A, Waeles M, Le Floch S, Amara R, Pichereau V, Laroche J (2020) An integrated biomarker approach using flounder to improve chemical risk assessment in the heavily polluted Seine estuary. *J Xenobiot* 10:14–35
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brammell BF, Price DJ, Birge WJ, Elskus AA (2013) Lack of CYP1A responsiveness in species inhabiting chronically contaminated habitats: two varieties of resistance? *Comp Biochem Physiol C* 157:212–219
- Brignac-Huber LM, Park JW, Reed JR, Backes WL (2016) Cytochrome P450 organization and function are modulated by endoplasmic reticulum phospholipid heterogeneity. *Drug Metab Dispos* 44:1859–1856

Environmental Science and Pollution Research

- Brown NP, Shields RJ, Bromage NR (2006) The influence of water temperature and spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture* 261:993–1002
- Brylinski JM, Lagadeuc Y, Gentilhomme V, Dupont JP, Lafite R, Dupeuble PA, Huault MF, Auger Y, Puskaric E, Wartel M, Cabiocch L (1991) Le “fleuve côtier”: un phénomène hydrologique important en Manche orientale. Exemple Du Pas-De-Calais *Océanologica Acta* 11:197–203
- Buckley LJ, Smigielski AS, Halavik TA, Caldaroni EM, Burns BR, Laurence GC (1991) Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* reproductive success. II. Effects of spawning time and female size on size, composition and viability of eggs and larvae. *Mar Ecol Prog Ser* 74:125–135
- Buege JA, Aust SD (1978) Microsomal lipid peroxidation. In: *Methods in enzymology*, Vol. 52. Academic Press, pp 302–310
- Burgeot T, Akcha F, Ménard D, Robinson C, Loizeau V, Brach-Papa C, Concepción M, Le Goff J, Budzinski H, Le Menach K, Cachot J, Minier C, Broeg K, Hylland K (2017) Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: a key step towards applying biological effects to monitoring. *Mar Environ Res* 124:92–105
- Burke MD, Mayer RT (1974) Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab Dispos* 2(6):583–588
- Cachot J, Chérel Y, Larcher T, Pfohl-Leskowicz A, Laroche J, Quiniou L, Morin J, Schmitz J, Burgeot T, Pottier D (2013) Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. *Environ Sci Pollut Res* 20:723–737
- Capela R, Raimundo J, Santos MM, Caetano C, Vale C, Guimaraes L, Reis-Henriques MA (2016) The use of biomarkers as integrative tools for transitional water bodies monitoring in the Water Framework Directive context – a holistic approach in Minho river transitional waters. *Sci Total Environ* 539:85–96
- Cuisset B, Pradelles P, Kime DE, Kühn ER, Babin P, Davail S, Le Menn F (1994) Enzyme immunoassay for 11-ketotestosterone using acetylcholinesterase as label: application to sex identification in farm Siberian sturgeon. *Comp Biochem Physiol* 108C(2):229–241
- Dabrowska H, Kopko O, Lehtonen KK, Lang T, Waszak I, Balode M, Strode E (2017) An integrated assessment of pollution and biological effects in flounder, mussels and sediment in the southern Baltic Sea coastal area. *Environ Sci Pollut Res* 24:3626–3639
- Dando PR (2011) Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Mar Ecol Prog Ser* 430:183–196
- Déniel C (1981) Les Poissons plats (Téléostéens, Pleuronectiformes) en baie de Douarnenez: reproduction, croissance et migration des Bothidae, Scophthalmidae, Pleuronectidae et Soleidae. *Ecologie, Environnement*. Ph.D. Thesis - Université de Bretagne Occidentale
- Elliott M, Borja A, McQuatters-Gollop A, Mazik K, Birchonough S, Andersen JH, Painting S, Peck M (2015) Force majeure: will climate change affect our ability to attain Good Environmental Status for marine biodiversity? *Mar Pollut Bull* 95:7–27
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V Jr, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7(2):88–95
- Evrard E, Devaux A, Bony S, Burgeot T, Riso R, Budzinski H, Le Du M, Quiniou L, Laroche J (2010) Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers* 15(2):111–127
- Feist SW, Lang T, Stentiford GD, Kohler A (2004) Biological effects of contaminants use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus*) for monitoring. *ICES J Mar Sci* 38:42
- Fincham JJ, Rijnsdorp AD, Engelhard GH (2013) Shifts in the timing of spawning in sole linked to warming sea temperatures. *J Sea Res* 75:69–76
- Fisson C, Bacq N, Billen G, Boust D, Budzinski H, Duchemin J, Fontaine T, Garnier J, Homer S, Lacroix J, Leroy B, Sanson S (2014) Qualité des eaux de l’estuaire de la Seine. Fascicule Seine-Aval 3(2):52p
- Fisson C, Debret M, Houlemare P, Vicquelin L (2017) Industrialisation de l’estuaire de la Seine: quel héritage pour la qualité de l’eau ? Fascicule Seine-Aval 3(6):52p
- Gallien-Landriau I (2003) Etude de l’altération fonctionnelle du système reproducteur par les perturbateurs endocriniens. Caractérisation des effets, identification des xéno-estrogènes impliqués et conséquences sur les populations de poissons en estuaire et Baie de Seine. Ph.D. Thesis, Université du Havre
- Graham CT, Harrod C (2009) Implications of climate change for the fishes of the British Isles. *J Fish Biol* 74:1143–1205
- Henry F, Amara R, Courcot L, Lacouture D, Bertho ML (2004) Heavy metals in four fish species from the French coast of the Eastern English Channel and Southern Bight of the North Sea. *Environ Int* 30:675–683
- Henry H, Filipuci I, Billon G, Courcot L, Kerambrun E, Amara R (2012) Metal concentrations, growth and condition indices in European juvenile flounder (*Platichthys flesus*) relative to sediment contamination levels in four Eastern English Channel estuaries. *J Environ Monit* 14:3211–3219
- Kajiwara K, Muneoka T, Watanabe Y, Karashima T, Kitagaki H, Funato K (2012) Perturbation of sphingolipid metabolism induces endoplasmic reticulum stress-mediated mitochondrial apoptosis in budding yeast. *Mol Microbiol* 86(5):1246–1261
- Kamman U, Akcha F, Budzinski H, Burgeot T, Gubbins MJ, Lang T, Le Menach K, Vethaak AD, Hylland K (2017) PAH metabolites in fish bile: from the Seine estuary to Iceland. *Mar Environ Res* 124:41–45
- Kar S, Sangem P, Anusha N, Senthilkumaran B (2021) Endocrine disruptors in teleosts: evaluating environmental risks and biomarkers. *Aquaculture and Fisheries* 6:1–26
- Kerambrun E, Henry F, Cornille V, Courcot L, Amara R (2013) A combined measurement of bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounders, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere* 91:498–505
- Kirby MF, Smith AJ, Rooke J, Neall P, Scott AP, Katsiadaki I (2007) Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and vitellogenin (VTG) in flounder (*Platichthys flesus*): system interaction, crosstalk and implications for monitoring. *Aquat Toxicol* 81(3):233–244
- Kleinkauf A, Connor L, Swarbreck D, Levene C, Walker P, Johnson PJ, Leah RT (2004a) General condition biomarkers in relation to contaminant burden in European flounder (*Platichthys flesus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 58:335–355
- Kleinkauf A, Scott AP, Stewart C, Simpson MG, Leah RT (2004b) Abnormally elevated VTG concentrations in flounder (*Platichthys flesus*) from the Mersey Estuary (UK) - a continuing problem. *Ecotoxicol Environ Saf* 58:356–364
- Koç ND, Aytekin Y, Yüce R (2008) Ovary maturation stages and histological investigation of Ovary of the zebrafish (*Danio rerio*). *Braz Arch Biol Technol* 51:513–522
- Koehler A (2004) The gender-specific risk to liver and cancer of flounder (*Platichthys flesus* (L.)) at the German Wadden Sea coast. *Aquat Toxicol* 70:257–276

- Kopko O, Dabrowska H (2018) Variability of biological indices, biomarkers, and organochlorine contaminants in flounder (*Platichthys flesus*) in the Gulf of Gdańsk, southern Baltic Sea. *Chemosphere* 194:701–713
- Lacroix C, Le Cuff N, Receveur J, Moraga D, Auffret M, Guyomarch J (2014) Development of an innovative and green stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *J Chromatogr A* 1349:1–10
- Laroche J, Gauthier O, Quiniou L, Devaux A, Bony S, Evrard E, Cachot J, Chérel Y, Larcher T, Riso R, Pichereau V, Devier MH, Budzinski H (2013) Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environ Sci Pollut Res* 20(2):738–748
- Lefebvre A (2015) MAREL Carnot data and metadata from Coriolis Data Centre. SEANOE. <https://doi.org/10.17882/39754>
- Lavergne E, Pédrón N, Calves I, Claireaux G, Mazurais D, Zambonino-Infante J, Le Bayon N, Cahu C, Laroche J (2015) Does the chronological chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar Pollut Bull* 95:658–664
- Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR: an R package for multivariate analysis. *J Stat Softw* 25(1):1–18
- Leventis PA, Grinstein S (2010) The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annu Rev Biophys* 39(1):407–427
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Lushchak VI, Bagnyukova TV (2006) Effects of different environmental oxygen levels on free radical processes in fish. *Comp Biochem Physiol B* 144:283–289
- Lyons BP, Stentiford GD, Green M, Bignell J, Bateman K, Feist SW, Goodsir F, Reynolds WJ, Thain JE (2004) DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in European flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. *Mutat Res* 552:177–186
- Marchand J, Quiniou L, Laroche J (2013) Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *J Xenobiot* 3(1S):14
- Marchand J, Quiniou L, Riso R, Thebaut MT, Laroche J (2004) Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat Toxicol* 70(4):327–343
- Marchand J, Tanguy A, Laroche J, Quiniou L, Moraga D (2003) Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Mar Ecol Prog Ser* 260:273–284
- Martínez-Gómez C, Vethaak AD (2019) Understanding the impact of chemicals on marine fish populations: the need for an integrative approach involving population and disease ecology. *Curr Opin Environ Sci Health* 11:71–77
- Masson G (1987) Biologie et écologie d'un poisson amphihaline, le flet (*Platichthys flesus flesus* Linné, 1758) dans l'environnement Ligérien : distribution, démographie, place au sein des réseaux trophiques. Ph.D. Thesis - Université de Bretagne Occidentale
- Mathieu-Resuge M, Kraffe E, Le Grand F, Boens A, Bideau A, Lluch-Cota SE, Racotta IS, Schaal G (2019) Trophic ecology of suspension-feeding bivalves inhabiting a north-eastern Pacific coastal lagoon: Comparison of different biomarkers. *Mar Environ Res* 145:155–163
- Minier C, Amara R (2008) From pollution to altered fish physiological performance; the case of flatfish in the Seine estuary. In: Amiard-Triquet C. Environmental assessment of estuarine ecosystems. Taylor and Francis Boca Raton. 227–240
- Minier C, Caltot G, Le Boulanger F, Hill EM (2000) An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex regions. *Analysis* 28:801–806
- Myers MS, Johnson LL, Hom T, Collier TK, Stein JE, Varanasi U (1998) Toxicopathic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington, USA: relationships with other biomarkers of contaminant exposure. *Mar Environ Res* 45:47–67
- Nash JP, Cuisset-Davail B, Bhattacharya S, Suter HC, Le Menn F, Kime DE (2000) An enzyme linked immunosorbant assay (E.L.I.S.A.) for testosterone, estradiol, and 17,20 β -dihydroxy-4-pregnene-3-one using acetylcholinesterase as tracer: application to measurement of diel patterns in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiol Biochem* 22:355–363
- Norin T, Malte H (2012) Intraspecific variation in aerobic metabolic rate of fish: relations with organ size and enzyme activity in brown trout. *Physiol Biochem Zool* 85(6):645–656
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlinn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szocs E, Wagner H (2020) vegan: Community Ecology Package. R package version 2.5–7. <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>
- Ostrach DJ, Low-Marchelli JM, Eder KJ, Whiteman SJ, Zinkl JG (2008) Maternal transfer of xenobiotics and effects on larval striped bass in the San Francisco Estuary. *Proc Natl Acad Sci* 105(49):19354–19359
- Pédrón N, Artigaud S, Infante JLZ, Le Bayon N, Charrier G, Pichereau V, Laroche J (2017a) Proteomic responses of European flounder to temperature and hypoxia as interacting stressors: differential sensitivities of populations. *Sci Total Environ* 586:890–899
- Pédrón N, Le Du J, Charrier G, Zambonino-Infante JL, Le Bayon N, Vasconcelos RP, Fonseca VF, Le Grand F, Laroche J (2017b) Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Mar Environ Res* 129:258–267
- Poisson E, Fisson C, Amiard-Triquet C, Burgeot T, Coureau J, Dur G, Durand F, Forget-Leray J, Letendre J, Souissi S, Xuereb B (2011) Effets de la contamination chimique: des organismes en danger? Fascicule Seine-Aval 2, Groupement d'Intérêt Publique Seine-Aval. 1–69
- Rhodes LD, Myers MS, Gronlund WD, McCain BB (1987) Epizootic characteristics of hepatic and renal lesions in English sole, *Parophrys vetulus*, from Puget Sound. *J Fish Biol* 31:395–407
- Sims DW, Wearmouth VJ, Genner MJ, Southward AJ, Hawkins J (2005) Low-temperature-driven early spawning migration of a temperate marine fish. *J Anim Ecol* 73:333–341
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175(1):184–191
- Tappin AD, Millward GE (2015) The English Channel: contamination status of its transitional and coastal waters. *Mar Pollut Bull* 95:529–550
- Teichert N, Borja A, Chust G, Uriarte A, Lepage M (2016) Restoring fish ecological quality in estuaries: implication of interactive and cumulative effects among anthropogenic stressors. *Sci Total Environ* 542:383–393
- Teichert N, Pasquaud S, Borja A, Chust G, Uriarte A, Lepage M (2017) Living under stressful conditions: fish life history strategies across environmental gradients in estuaries. *Estuar Coast Shelf Sci* 188:18–26

Environmental Science and Pollution Research

- Vethaak AD, Baggelaar PK, Van Lieverloo HM, Ariese F (2016) Decadal trends in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination assessed by 1-Hydroxypyrene in fish bile fluid in the Netherlands: declining in marine waters but still a concern in estuaries. *Front Mar Sci* 3(215):1–13
- Williams TD, Turan N, Diab AM, Wu H, Mackenzie C, Barie KL, Hrydziusko O, Lyons B, Stentiford GD, Herbert JM, Abraham JK, Katsiadaki I, Leaver MJ, Taggart JB, George SG, Viant MR, Chipman KJ, Falciani F (2011) Towards a system level understanding of non-model organisms sampled from the environment: a network biology approach. *PLOS Comput Biol* 7(8):e1002126
- Weeks Santos S, Cachot J, Gourves PY, Clérandeau C, Morin B, Gonzalez P (2019) Sub-lethal effects of waterborne copper in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicol Environ Saf* 170:778–788

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

5. Références

- Amara R. & Laroche J. (Coord.), Cachot J., Couteau J., Devaux A., Devin S., Le Floch S., Minier C., Ouddane B. (2020). Projet HQ-Fish : Impact de la qualité des habitats estuariens de la Seine sur le fonctionnement d'une population de poisson (flet). *Rapport de recherche du programme Seine-Aval 6*, 64. <https://www.seine-aval.fr/projet/hqfish/>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133760>.
- Borcier, E., Charrier, G., Amérand, A., Théron, M., Loizeau, V., Pédrón, N., & Laroche, J. (2016). Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: impacts of pollution and global warming. *Journal of Xenobiotics*, 6(2), 6586. <https://doi:10.4081/xeno.2016.6586>
- Borcier, E., Charrier, G., Couteau, J., Maillet, G., le Grand, F., Bideau, A., Waeles, M., le Floch, S., Amara, R., Pichereau, V., & Laroche, J. (2020). An integrated biomarker approach using flounder to improve chemical risk assessments in the heavily polluted seine estuary. *Journal of Xenobiotics*, 10 (2), 14–35. <https://doi.org/10.3390/jox10020004>
- Brammell, B. F., Price, D. J., Birge, W. J., & Elskus, A. A. (2013). Lack of CYP1A responsiveness in species inhabiting chronically contaminated habitats: Two varieties of resistance?. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 157(2), 212-219. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2012.07.001>
- Brown, N. P., Shields, R. J., & Bromage, N. R. (2006). The influence of water temperature on spawning patterns and egg quality in the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Aquaculture*, 261(3), 993-1002. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.08.025>
- Burgeot, T., Akcha, F., Ménard, D., Robinson, C., Loizeau, V., Brach-Papa, C., Martínez-Gómez, C., Le Goff, J., Budzinski, H., Le Menach, K., Cachot, J., inier, C., Broeg, K., & Hylland, K. (2017). Integrated monitoring of chemicals and their effects on four sentinel species, *Limanda limanda*, *Platichthys flesus*, *Nucella lapillus* and *Mytilus* sp., in Seine Bay: A key step towards applying biological effects to monitoring. *Marine environmental research*, 124, 92-105. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.10.009>
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D., & Budzinski, H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic toxicology*, 79(3), 257-267. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.014>
- Callaway, R., Grenfell, S. & Lønborg, C. (2014). Small estuaries: Ecology, environmental drivers and management challenges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 150, 193-195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.06.009>
- Chapman, P. M., & Wang, F. (2001). Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 20(1), 3-22. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200102>
- Cloern, J. E., Abreu, P. C., Carstensen, J., Chauvaud, L., Elmgren, R., Grall, J., Greening, H., Johansson, J. O. R., Kahru, M., Sherwood, E. T., & Yin, K. (2016). Human activities and climate variability drive fast-paced change across the world's estuarine–coastal ecosystems. *Global change biology*, 22(2), 513-529. <https://doi.org/10.1111/gcb.13059>
- Dabrowska, H., Kopko, O., Lehtonen, K. K., Lang, T., Waszak, I., Balode, M., & Strode, E. (2017). An integrated assessment of pollution and biological effects in flounder, mussels and sediment in the southern Baltic Sea coastal area. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 3626-3639. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8117-8>
- Dauvin, J. C., Ruellet, T., Desroy, N., & Janson, A. L. (2007). The ecological quality status of the Bay of Seine and the Seine estuary: use of biotic indices. *Marine Pollution Bulletin*, 55(1-6), 241-257.

<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2006.04.010>

- Delpech, C., Courrat, A., Pasquaud, S., Lobry, J., Le Pape, O., Nicolas, D., Boët, P., Girardin, M., & Lepage, M. (2010). Development of a fish-based index to assess the ecological quality of transitional waters: the case of French estuaries. *Marine Pollution Bulletin*, *60*(6), 908-918. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.01.001>
- Deycard, V. N., Schäfer, J., Blanc, G., Coynel, A., Petit, J. C., Lancelot, L., Dutruch, L., Bossy, C., & Ventura, A. (2014). Contributions and potential impacts of seven priority substances (As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn) to a major European Estuary (Gironde Estuary, France) from urban wastewater. *Marine Chemistry*, *167*, 123-134. <https://doi.org/10.1016/j.marchem.2014.05.005>
- Diop, M., Couteau, J., Bado-Nilles, A., Tavernier, E., Ouddane, B., Denis, J., Duong, G., Gevaert, F., Monchy, S., Laroche, J., & Amara, R. (2022). Bioaccumulation of trace metal elements and biomarker responses in caged juvenile flounder at a polluted site: Effects of fish density and time exposure. *Marine Pollution Bulletin*, *185*, 114289. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114289>
- Dhivert, E., Grosbois, C., Courtin-Nomade, A., Bourrain, X., & Desmet, M. (2016). Dynamics of metallic contaminants at a basin scale—Spatial and temporal reconstruction from four sediment cores (Loire fluvial system, France). *Science of the total environment*, *541*, 1504-1515. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.146>
- Evrard, E., Devaux, A., Bony, S., Burgeot, T., Riso, R., Budzinski, H., Le Du, M., Quiniou, L., & Laroche, J. (2010). Responses of the European flounder *Platichthys flesus* to the chemical stress in estuaries: load of contaminants, gene expression, cellular impact and growth rate. *Biomarkers*, *15*(2), 111-127. <https://doi.org/10.3109/13547500903315598>
- Feist, S. W., Lang, T., Stentiford, G. D., & Köhler, A. I. C. E. S. (2004). Biological effects of contaminants: use of liver pathology of the European flatfish dab (*Limanda limanda* L.) and flounder (*Platichthys flesus* L.) for monitoring. *ICES Journal of Marine Science*, 38-42. <http://dx.doi.org/10.25607/OBP-226>
- Fisson, C., Bacq, N., Billen, G., Boust, D., Budzinski, H., Duchemin, J., & Sansom, S. (2014). Qualité des eaux de l'estuaire de la Seine. Fascicule Seine-Aval, 3(2), 52.
- Freeman, L. A., Corbett, D. R., Fitzgerald, A. M., Lemley, D. A., Quigg, A., & Steppe, C. N. (2019). Impacts of urbanization and development on estuarine ecosystems and water quality. *Estuaries and Coasts*, *42*, 1821-1838. <https://doi.org/10.1007/s12237-019-00597-z>
- Gallien-landriau, I. (2003). Étude de l'altération fonctionnelle du système reproducteur par les perturbateurs endocriniens: caractérisation des effets, identification des xéno-estrogènes impliqués et conséquences sur les populations de poissons en estuaire et Baie de Seine (Doctoral dissertation, Le Havre).
- Kajiwara, K., Muneoka, T., Watanabe, Y., Karashima, T., Kitagaki, H., & Funato, K. (2012). Perturbation of sphingolipid metabolism induces endoplasmic reticulum stress-mediated mitochondrial apoptosis in budding yeast. *Molecular microbiology*, *86*(5), 1246-1261. <https://doi.org/10.1111/mmi.12056>
- Lafite, R., & Romána, L. A. (2001). A man-altered macrotidal estuary: the Seine estuary (France): introduction to the special issue. *Estuaries*, *24*, 939-939.
- Langford, T. E. (2001). Thermal discharges and pollution. *Encyclopedia of Ocean Sciences. Academic Press.*, 2933-2940. <http://dx.doi.org/10.1006/rwos.2001.0051>
- Laurent, J., Lavergne, E., Couteau, J., le Floch, S., Ouddane, B., Cachot, J., Davail, B., Clérandeau, C., Devin, S., Fisson, C., Devaux, A., Amara, R., Diop, M., Pichereau, V., & Laroche, J. (2022). Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the

- highly anthropised Seine estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(39), 59751–59769. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20000-y>
- Le Pape, O., Gilliers, C., Riou, P., Morin, J., Amara, R., & Désaunay, Y. (2007). Convergent signs of degradation in both the capacity and the quality of an essential fish habitat: state of the Seine estuary (France) flatfish nurseries. *Hydrobiologia*, 588(1), 225-229. <https://doi.org/10.1007/s10750-007-0665-y>
- Leventis, P. A., & Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual review of biophysics*, 39, 407-427. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131234>
- Li, J., Lusher, A. L., Rotchell, J. M., Deudero, S., Turra, A., Bråte, I. L. N., Sun, C., Hossain, S. M., Li, Q., Kolandhasamy, P., & Shi, H. (2019). Using mussel as a global bioindicator of coastal microplastic pollution. *Environmental pollution*, 244, 522-533. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.10.032>
- Marchand, J., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *Journal of Xenobiotics*, 3(s1), e14. <https://doi.org/10.4081/xeno.2013.s1.e14>
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology*, 70(4), 327-343. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.001>
- Masson, G. (1987). Biologie et écologie d'un poisson amphihaline, le flet (*Platichthys flesus flesus* Linné, 1758) dans l'environnement Ligérien : distribution, démographie, place au sein des réseaux trophiques. *Ph.D. Thesis - Université de Bretagne Occidentale*.
- Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A. M., Tutundjian, R., Bocquené, G., & Leboulenger, F. (2006). A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 25(1), 112-119. <https://doi.org/10.1897/05-161R.1>
- Minier, C., Caltot, G., Leboulenger, F., & Hill, E. M. (2000). An investigation of the incidence of intersex fish in Seine-Maritime and Sussex region. *Analisis*, 28(9), 801-806. <http://dx.doi.org/10.1051/analisis:2000280801>
- Miramand, P., Guyot, T., Rybarczyk, H., Elkaim, B., Mouny, P., Dauvin, J. C., & Bessineton, C. (2001). Contamination of the biological compartment in the Seine estuary by Cd, Cu, Pb, and Zn. *Estuaries*, 24, 1056-1065. <https://doi.org/10.2307/1353017>
- Morin, J., Riou, P., Lemoine, M., Le Pape, O., Bessineton, C., Vedieu, C., & Simon, S. (1999). Etude des nourriceries de la baie de Seine orientale et de l'estuaire de la Seine. Synthèse des connaissances. Identification d'une nourricerie en estuaire de Seine. Analyse de la fonctionnalité de l'estuaire comme nourricerie. DRV/RH/RST/99-05. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00000/1576/>
- Net, S., El-Osmani, R., Prygiel, E., Rabodonirina, S., Dumoulin, D., & Ouddane, B. (2015). Overview of persistent organic pollution (PAHs, Me-PAHs and PCBs) in freshwater sediments from Northern France. *Journal of Geochemical Exploration*, 148, 181-188. <https://doi.org/10.1016/j.gexplo.2014.09.008>
- Ostrach, D. J., Low-Marchelli, J. M., Eder, K. J., Whiteman, S. J., & Zinkl, J. G. (2008). Maternal transfer of xenobiotics and effects on larval striped bass in the San Francisco Estuary. *Proceedings of*

- the National Academy of Sciences*, 105(49), 19354-19359. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802616105>
- Peterson, M. S., & Lowe, M. R. (2009). Implications of cumulative impacts to estuarine and marine habitat quality for fish and invertebrate resources. *Reviews in Fisheries Science*, 17(4), 505-523. <https://doi.org/10.1080/10641260903171803>
- Pinzone, M., Cransveld, A., Tessier, E., Bérail, S., Schnitzler, J., Das, K., & Amouroux, D. (2021). Contamination levels and habitat use influence Hg accumulation and stable isotope ratios in the European seabass *Dicentrarchus labrax*. *Environmental Pollution*, 281, 117008. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117008>
- Poisson, E., Fisson, C., Amiard-Triquet, C., Burgeot, T., Couteau, J., Dur, G., Durand, F., Forget-Leray, J., Letendre, J., Souissi, S., & Xuereb, B. (2011). Effets de la contamination chimique: des organismes en danger ?.
- Romana, L. A. (1994). Les grands estuaires français. *Equinoxe: les ressources vivantes de la mer et de l'environnement littoral*, (47-48), 38-42. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00701/81332/>
- Sims, D. W., Wearmouth, V. J., Genner, M. J., Southward, A. J., & Hawkins, S. J. (2004). Low-temperature-driven early spawning migration of a temperate marine fish. *Journal of Animal Ecology*, 73(2), 333-341. <https://doi.org/10.1111/j.0021-8790.2004.00810.x>
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vethaak, A. D., Baggelaar, P. K., Van Lieverloo, J. H. M., & Ariese, F. (2016). Decadal trends in polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) contamination assessed by 1-hydroxypyrene in fish bile fluid in the Netherlands: Declining in marine waters but still a concern in estuaries. *Frontiers in Marine Science*, 3, 215. <https://doi.org/10.3389/fmars.2016.00215>

CHAPITRE II

**Impact d'une pollution
accidentelle sur la qualité
de l'eau d'un grand
estuaire Européen :
la Seine**

1. Introduction

Ce chapitre explore les **réponses** des populations de Flet Européen (*P. flesus*) suite à une **pollution industrielle accidentelle** dans un grand système estuarien.

Le terme de **pollution** désigne la destruction ou dégradation d'un écosystème (air, eau, sol) suite à l'introduction dans l'environnement d'éléments physiques, chimiques ou biologiques. En cas de pollution, il y a altération du fonctionnement de l'écosystème avec d'importants effets sur la biosphère. En outre, la contamination peut s'étendre ou se modifier *via* le réseau trophique, entraînant une accumulation progressive de substances toxiques dans les organismes (bioaccumulation), et une augmentation de leur concentration à chaque niveau de la chaîne alimentaire (bio-magnification).

En opposition à la pollution chronique, souvent qualifiée de diffuse (multiples rejets de polluants dans le temps et l'espace), la **pollution accidentelle** désigne une pollution locale engendrée par un événement imprévu et indépendant de la volonté humaine. Les pollutions accidentelles, de nature et de degré divers, sont souvent de courte période mais massive. Une pollution accidentelle peut survenir lors de mauvaises conditions météorologiques, suite à un naufrage de navire (marée noire), à une rupture de canalisation, à un incendie, *etc.*

En général, suite à une pollution accidentelle, un **programme de surveillance** est mis en place pour quantifier les impacts environnementaux liés aux déversements. L'évaluation de l'impact environnemental est cruciale afin de correctement mettre en œuvre un **plan d'intervention** et de **restauration**. Le monitoring d'une pollution accidentelle permet également d'en estimer les dommages écologiques et les pertes économiques, dans le cadre de mesures de compensation (Neuparth *et al.*, 2012). Les programmes de surveillance environnementale incluent différentes méthodologies pour surveiller une contamination chimique au sein des sédiments, de l'eau et du biote, et ainsi d'en évaluer les impacts biologiques et écologiques. Cependant, ces programmes présentent quelques **lacunes** et plusieurs **difficultés** sont associées à la surveillance d'une pollution accidentelle.

Le **manque de données de référence** sur l'écosystème avant la contamination ponctuelle est l'une des raisons pouvant expliquer les difficultés à évaluer l'impact d'une pollution accidentelle. En effet, *in natura*, il est compliqué de différencier les dommages environnementaux causés par un événement accidentel des dommages engendrés par d'autres facteurs, à la fois naturels (climatiques ou hydrographiques) ou anthropiques (pollution chronique) (Neuparth *et al.*, 2012).

Le **manque de connaissances** sur la biologie des **espèces impactées** peut aussi expliquer les difficultés à évaluer l'impact d'une pollution accidentelle. De ce fait, il est nécessaire d'utiliser des espèces indicatrices validées et écologiquement pertinentes. En effet, de solides notions sur ces espèces sont essentielles pour prédire les effets sublétaux et à long terme, les changements physiologiques et les processus de bioaccumulation (Neuparth *et al.*, 2012).

Le **manque de normalisation des procédures** des programmes de surveillance est également l'une des raisons expliquant les difficultés à évaluer l'impact d'une pollution accidentelle (Neuparth *et al.*, 2012). Le caractère unique de chaque pollution accidentelle implique un programme de surveillance adapté aux circonstances, afin de prendre en compte les spécificités de l'incident. Néanmoins, il est nécessaire d'établir des lignes directrices et des procédures normalisées pour garantir la meilleure approche et une bonne coordination. En France, un "guide opératoire de surveillance écologique des pollutions accidentelles" a été élaboré pour normaliser la conception et la réalisation des programmes de surveillance (Girin, 2007).

En outre, il est difficile d'évaluer la **quantité de polluants** déversée sur le site contaminé et d'en identifier précisément la nature, lorsque la source est peu connue. Il est également difficile d'évaluer les conséquences d'une pollution accidentelle dans les grands systèmes estuariens, soumis chroniquement à des conditions de **multistress**.

C'est le cas de la **Seine**, l'un des plus grands estuaires d'Europe, impacté par de multiples stressseurs (Laurent *et al.*, 2022).

Ainsi, dans le cadre de cette thèse, il nous est apparu particulièrement pertinent d'étudier les conséquences de la pollution liées à l'incendie des usines de "Lubrizol" et "NORMANDIE-Logistique", afin d'évaluer l'impact de cette **pollution accidentelle** sur la **qualité de l'eau** de l'estuaire de Seine.

Le 26 septembre 2019, un important **incendie** s'est déclaré dans les entrepôts de stockage de produits chimiques de Lubrizol et NORMANDIE-Logistique, situés à Rouen.

L'usine **Lubrizol**, classée **Seveso** à haut risque par la directive européenne Seveso (Commission européenne, 2012), est une entreprise qui produit et stocke des **substances chimiques** (phosphorés et organo-sulfurés) utilisées comme additifs pour divers lubrifiants.

Le groupe **NORMANDIE-Logistique** est une entreprise de transport et de logistique spécialisée dans le transport terrestre, le transport maritime par conteneurs, le transport frigorifique et le transport de **marchandises dangereuses** (ADR - Accord européen relatif au transport international des marchandises Dangereuses par Route).

L'**incendie de 2019**, déclaré pour des raisons inconnues, a touché la **zone de stockage** de Lubrizol et une partie des entrepôts de NORMANDIE-Logistique à Rouen, en bord de Seine. Le feu a engendré un épais panache de fumée noire, atteignant plus de 20 km de hauteur. Cet incendie, de **catégorie B** (hydrocarbures et solvants inflammables) et de grande ampleur, a nécessité l'intervention des sapeurs-pompiers. Des **mousses d'extinction**, ou **émulseurs**, ont donc été utilisés pour combattre le feu. De ce fait, les eaux d'extinction mélangées aux diverses substances chimiques (dont des hydrocarbures lourds) ont été déversées dans le Bassin aux Bois (volume estimé à 2 000 m³), connecté à la Seine. Dans le but de réduire l'impact de ce **déversement accidentel** dans l'estuaire de Seine, plus de 150 m³ de polluants ont été pompés hors de la Seine (Bouillon & Adam, 2020). Cependant, une forte mortalité piscicole a quand même été observée en Seine, dans le Bassin au Bois, dans les premiers jours qui ont suivi l'incendie.

Après l'accident, **plusieurs campagnes** ont été menées par les services de l'Etat, divers organismes publics et des équipes scientifiques afin d'étudier l'impact de l'évènement sur la Seine. Une multitude de données ont ainsi été acquises, pour déterminer le niveau de contamination de la Seine et l'impact de cette catastrophe sur la faune aquatique. Le **GIP Seine-Aval**, un des organismes ayant pris part aux recherches, a ainsi publié un rapport sur les résultats acquis afin de fournir une vision globale de l'impact de l'accident (Fisson *et al.*, 2020).

Notre équipe a pris part aux recherches menées par le GIP Seine-Aval en explorant les **réponses du Flet** suite à l'incendie de Lubrizol grâce à une **expérience de caging** sur des juvéniles de Flets couplée à des analyses de **protéomique** sur le foie des poissons. Le but était d'explorer l'impact de cette pollution accidentelle sur une espèce estuarienne, en essayant de caractériser sa nature et son impact possible sur la faune.

Nous étions dans une situation particulièrement favorable car dans le cadre de la première partie du **programme HQ Fish**, notre équipe a mené en **2017** (Figure 25), deux ans avant l'incendie, une première expérience de caging à Petit-Couronne (Rouen) couplée à la protéomique sur le Flet, afin d'évaluer la qualité de l'eau estuarienne de la Seine à micro-échelle (Borcier *et al.*, 2019).

Au cours de cette première étude, notre équipe avait capturé des poissons en Canche et les avait encagés durant un mois en Canche et en Seine, au niveau de Rouen. Cette première expérience d'encagement de flets a permis de valider notre stratégie de **biomonitoring actif** afin de caractériser la **qualité de l'eau** estuarienne à **micro-échelle**. Les mesures obtenues sur les poissons encagés à Rouen ont révélé des changements physiologiques et métaboliques induits par une exposition à un mélange chimique complexe.

En **2019**, suite à l'incendie, nous avons reconduit une expérience de **caging identique** (Figure 25), en capturant des flets juvéniles en Canche, puis en les encageant un mois au niveau de Petit-Couronne (Rouen), à 10 km en aval des usines Lubrizol et NORMANDIE-Logistique. Des cages « témoins » ont été aussi placées en parallèle en Canche.

Le **protéome** des flets encagés a été comparé au protéome obtenu deux ans avant l'accident. Les teneurs en **cholestérol** (CT), **triglycérides** (TAG) et **phospholipides** (PL) ont ensuite été mesurées dans le muscle des poissons. Les activités de l'ACHé et EROD ont également été déterminées chez les juvéniles de flets. Enfin, les concentrations en **polluants organiques** ont été mesurées dans les sédiments.

Les résultats et la discussion de cette étude sont détaillés dans les sous-parties 2. et 3. qui suivent de ce manuscrit. Ce travail a fait l'objet d'un article soumis à publication (Laurent *et al.*, 2024a), présenté dans la sous-partie 4. ci-dessous.

2. Résultats & Discussion

Les **flets engagés**, pendant un mois, en aval du site de l'accident de Lubrizol et de NORMANDIE-Logistique ne présentaient **pas de symptômes** apparents d'altération de leur santé, par rapport aux poissons engagés en Canche. En effet, aucune mortalité n'a été observée, ni de baisse de l'indice de condition des poissons.

Les approches de **protéomique globale** menées sur les foies des flets engagés en Seine et en Canche, qui a servi d'estuaire de référence dans notre première expérience de caging (Borcier *et al.*, 2019), ont révélé des différences notables entre Seine vs Canche.

Un examen plus approfondi des protéines hépatiques dérégulées a révélé, chez les flets engagés en Seine, une surexpression des protéines associées aux voies de **détoxification des xénobiotiques**, telles que la NADPH-cytochrome P450 réductase et les cytochromes P450 (CYP1A1 et CYP 2G1-like). Cependant, le nombre de protéines dérégulées associées à la détoxification des xénobiotiques était beaucoup plus faible que lors des analyses réalisées deux ans avant l'incendie. Post-accident, nous avons noté ainsi l'absence de dérégulation de certaines protéines, telles que le CYP450 2, le CYP450 4, la Diméthylaniline monooxygénase ou la GST. (Borcier *et al.*, 2019).

Des protéines impliquées dans le **cycle de la méthionine** sont également apparues dérégulées en Seine, telles que la **BHMT** et la méthionine synthase. Le cycle de la méthionine a souvent été documenté comme dérégulé dans le foie de flets exposés à des xénobiotiques (Galland *et al.*, 2015). La sous-expression de la BHMT combinée à la surexpression de la méthionine synthase suggère que la synthèse de la méthionine a été favorisée au détriment de l'homocystéine.

Les mesures d'**activité EROD**, un biomarqueur spécifique de l'exposition aux HAPs, aux PCBs et aux dioxines (Santana *et al.*, 2018 ; Whyte *et al.*, 2000), n'ont révélé aucune différence significative entre les poissons de la Seine et ceux de la Canche, ni entre les temps d'exposition. Les outils omiques permettent donc une analyse plus fine que les biomarqueurs conventionnels.

Les mesures d'**activité de l'AChE** dans le cerveau, un biomarqueur des dommages neurotoxiques, étaient significativement plus réduites chez les individus engagés en Seine vs Canche. De précédentes études ont montré que les pesticides, les carbamates et les dioxines peuvent induire une altération de l'activité de l'AChE, en supprimant l'expression de manière transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle (Xie *et al.*, 2016 ; Xu *et al.*, 2014).

Les poissons engagés en Seine, suite à l'accident, ont également montré une forte dérégulation du **métabolisme des lipides**. En effet, les analyses de réseau et d'enrichissement KEGG STRING v11.0 (Szklarczyk *et al.*, 2019) réalisées ont révélé des changements hautement significatifs dans les voies métaboliques liées à la **biosynthèse des terpénoïdes** (dre00900) et des **stéroïdes** (dre00100).

Plus précisément, nous avons observé des différences majeures dans l'expression des protéines liées au **transport des lipides**, telles que l'Apolipoprotéine B-100-like (transport du cholestérol), la Périlipine 2 (différenciation adipeuse), la PPT-1 et la PLBD2 (hydrolyse des phospholipides).

Une forte augmentation de la **synthèse du cholestérol** (CT) a également été mise en évidence dans les flets engagés en Seine, avec un total de 14 protéines induites dans le foie des poissons après 15 et 30 jours de caging. En effet, les protéines associées à presque toutes les étapes de la synthèse du

CT étaient sur-accumulées, telles que l'Acétoacétyl-CoA synthétase, l'Hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase ou encore la 3-Hydroxy-3-Méthylglutaryl-Coenzyme A réductase. D'autres protéines impliquées dans la **voie du mévalonate** ont également été accumulées suite à l'incendie, telles que la Diphosphomévalonate décarboxylase et la Farnesyl pyrophosphate synthase.

Plusieurs protéines impliquées dans la **synthèse des acides gras** (AG) ont également été induites chez les poissons encagés en Seine. En effet, l'analyse des catégories KEGG a révélé une dérégulation dans le métabolisme des AG (dre01212), la biosynthèse des AG (dre00061) et la dégradation des AG (dre00071). Plus précisément, nous avons observé une surexpression des protéines impliquées dans la synthèse des AG, telles que l'Acétyl-CoA Carboxylase 1, l'Acétyl-CoA synthétase cytoplasmique, l'Acyl-CoA synthétase ou encore la Fatty Acids synthase.

Les analyses moléculaires ont également mis en évidence une dérivation du **métabolisme des sucres** vers la **synthèse du NADPH**, car les voies impliquées dans la synthèse du CT et des AG dépendent étroitement du cofacteur NADPH, principalement formé par la voie des pentoses phosphates. Dans le cas présent, la voie métabolique des pentoses phosphates est favorisée par rapport à la glycolyse grâce à une surexpression de la G6PDH, de la 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase, de la pyruvate kinase PKM et de l'isocitrate déshydrogénase.

La voie de signalisation des "**peroxisome proliferator-activated receptors**" (PPARs) est également surexprimée dans les flets encagés en Seine. En effet, les expériences de réseau ont montré un enrichissement de la catégorie KEGG "PPARs pathway" (dre03320). Les PPARs jouent un rôle essentiel dans le **métabolisme des lipides**. Les PPAR α régulent les voies de synthèse et d'oxydation des AG et les PPAR γ sont impliqués dans la différenciation des adipocytes et ont la capacité de se lier à certains perturbateurs endocriniens, ce qui peut entraîner une accumulation de graisse dans les adipocytes à la suite d'une exposition à ces composés (Desvergne *et al.*, 2009 ; Grün *et al.*, 2006). Les PPARs sont également impliqués dans la régulation des voies de **détoxification des xénobiotiques** médiées par les oxydases à fonction mixte, en particulier celles impliquant la CYP1A1. De nombreuses études ont exploré le lien entre les PPARs et les polluants, dont plusieurs se concentrent sur les **effets obésogènes** des organoétains et des phtalates (Ahmadian *et al.*, 2013; Feige *et al.*, 2007). Il semble donc y avoir un lien entre la surexpression des voies de **synthèse des lipides** et la dérégulation de la voie de **signalisation PPARs**, cette dérégulation pourrait être liée à la présence de xénobiotiques libérés lors de l'incendie.

En conséquence, nous avons décidé de mesurer les niveaux de **cholestérol** (CT), de **triglycérides** (TAG) et de **phospholipides** (PL) dans le muscle des poissons encagés dans les estuaires de Seine et de Canche, en 2017 et 2019. Les flets encagés en Seine après l'incendie en 2019 présentaient des concentrations en CT et en TAG significativement plus élevées que celles mesurées chez les poissons mis en cage en Canche en 2019 et en Seine en 2017. Ces résultats apportent une preuve supplémentaire que la pollution accidentelle suite à l'incendie a entraîné une augmentation de la synthèse du CT et des AG, conduisant à une accumulation de ces molécules. De précédentes études en transcriptomique ont mis en évidence une dérégulation similaire du métabolisme du CT suite à une exposition au pétrole brut (Price *et al.*, 2022 ; Xu *et al.*, 2019 ; Sørhus *et al.*, 2017 ; Xu *et al.*, 2016), au bisphénol A (Li *et al.*, 2019), ou encore aux PFAS (Rodríguez-Jorquera *et al.*, 2018).

Aux vues de ces résultats, nous avons réalisé des dosages de **HAPs**, de **PCBs** (polluants organiques classiques) et de **PFAS** (probablement présents dans les mousses anti-incendie) dans les sédiments. Ces mesures ont été réalisées afin de détecter une possible pollution additionnelle en Seine liée à cet accident industriel, qui pourrait expliquer les réponses moléculaires induites chez le Flet. Les concentrations en HAPs - PCBs - PFAS dans les sédiments prélevés au début de la mise en cage en novembre 2019 après l'accident, étaient globalement inférieures à celles détectées au même endroit avant l'incendie en 2017.

La **faible contamination** des sédiments de la Seine pourrait être liée au **protocole d'urgence** mis en place lors de l'accident (plan POLMAR), qui consistait à confiner les eaux contaminées dans un bassin adjacent à la Seine, à l'aide de barrages flottants, et à pomper les eaux souillées.

Nous suggérons que l'incendie de Lubrizol a pu entraîner une **pollution ponctuelle** du bassin de rétention vers la Seine par des familles de polluants non analysés (autres que HAPs, PCBs, PFAS) lors de l'accident et/ou une **contamination diffuse** du milieu estuarien par la propagation du panache de fumée de l'incendie sur la ville de Rouen, le dépôt, puis le lessivage des toxiques par la pluie.

Par conséquent, nous avons décidé d'approfondir nos recherches sur une éventuelle contamination chimique de la Seine, en considérant les analyses effectuées par la **STEP de Rouen** suite à l'incendie de Lubrizol et NORMANDIE-Logistique. Une semaine après l'incendie, les eaux entrant dans la STEP étaient polluées significativement par des **dioxines** (OCDD et HPCDD). De la même manière, les boues produites par la STEP étaient également contaminées par des dioxines et surtout des **furanes** (TCDF, PeCDF et HXCDF). Un retour aux valeurs de routine a été observé à la mi-décembre 2019.

Ces résultats laissent suggérer que la **combustion** des différents matériaux lors de l'incendie a produit des **dioxines** et des **furanes** qui ont été dispersés dans l'atmosphère au-dessus de Rouen, puis déposés au sol, pour finalement être lessivés et entraînés par les pluies vers la Seine. Une fois dans l'environnement aquatique, les dioxines et les furanes s'adsorbent sur les particules organiques en suspension dans la colonne d'eau pour être ensuite redistribués au niveau des sédiments (Gatehouse, 2004).

Les flets engagés en Seine après l'incendie ont donc probablement été contaminés à cause de leur **régime alimentaire**, essentiellement constitué d'amphipodes (lié au caging). Ce type de proies peut concentrer fortement les **dioxines** et les **furanes** (Ruus *et al.*, 2006), en étant très peu impactées par leurs effets toxiques (Barber *et al.*, 1998).

En outre, les **dioxines** sont connues pour altérer les **fonctions hépatiques**, même lors d'une exposition à court terme (Sengupta, 2004). En cas d'exposition chronique, ces dioxines peuvent provoquer des altérations du **système immunitaire**, du **système nerveux** et de la **reproduction** (King-Heiden *et al.*, 2013). Les dioxines augmentent également le poids relatif du foie, entraînant une hausse significative de tous les niveaux de biomarqueurs hépatiques (Helal *et al.*, 2022). Les dioxines modifient aussi le **métabolisme des lipides** en affectant l'activité de certaines enzymes clés dans la biosynthèse des acides gras (Mahfouz *et al.*, 2020 ; Hanano *et al.*, 2014).

Une contamination par les dioxines et furanes, suite à l'incendie, pourrait donc expliquer la dérégulation du métabolisme lipidique chez les Flets, détectée par protéomique.

3. Conclusion

Toutes les **études post-accidentelles** menées dans les semaines qui ont suivi l'incendie des infrastructures de Lubrizol et de NORMANDIE-Logistique, que ce soit sur la chimie de l'eau et des sédiments ou sur les bio-essais et les biomarqueurs, n'ont finalement montré qu'une **toxicité réduite** de cette **pollution accidentelle**, avec peu ou pas d'impact sur les organismes aquatiques de l'estuaire de la Seine, en dehors du bassin aux bois.

La **pollution ponctuelle** provenant du site de l'incendie, et donc **directement déversée** dans la Seine dans les jours qui ont suivi l'accident, semble avoir été relativement **faible**.

Par conséquent, l'essentiel de la contamination chimique de la Seine suite à l'accident était probablement la **pollution diffuse**, suite aux retombées de fumée sur la ville de Rouen.

Le rapport de Fisson *et al.* (2020), visant à évaluer l'impact de l'incendie sur l'estuaire de la Seine, n'a pas révélé de pollution évidente par les produits chimiques classiquement mesurés, ni de réponse significative à la pollution par les crevettes (*Palaemon longirostris*) mises en cage dans l'estuaire sur le même site de Petit Couronne (Rouen).

La présente étude menée sur le caging de Flets à Rouen apporte donc une nouvelle vision de l'impact de cet accident industriel sur l'écosystème aquatique, en intégrant les **réponses moléculaires** des poissons encagés et exposés à moyen terme au flux de la Seine.

Le couplage **caging** et **protéomique** sans *a priori* mené sur le Flet apparaît donc comme une **stratégie efficace** pour explorer les multiples voies métaboliques affectées par les polluants, suite à une pollution accidentelle.

La **pollution diffuse** par les **dioxines** et les **furanes** dans l'estuaire de la Seine, qui a contaminé la nourriture des poissons, a probablement eu l'impact le plus important sur le métabolisme des poissons, en provoquant une **dérégulation** majeure des lipides, et plus particulièrement du **cholestérol**.

4. Article

Ci-dessous, l'article "Relevance of flounder caging and proteomics to explore the impact of an industrial accident caused by fire on the Seine estuarine water quality: the case of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities", soumis dans "Marine Pollution Bulletin" (Figure 27).

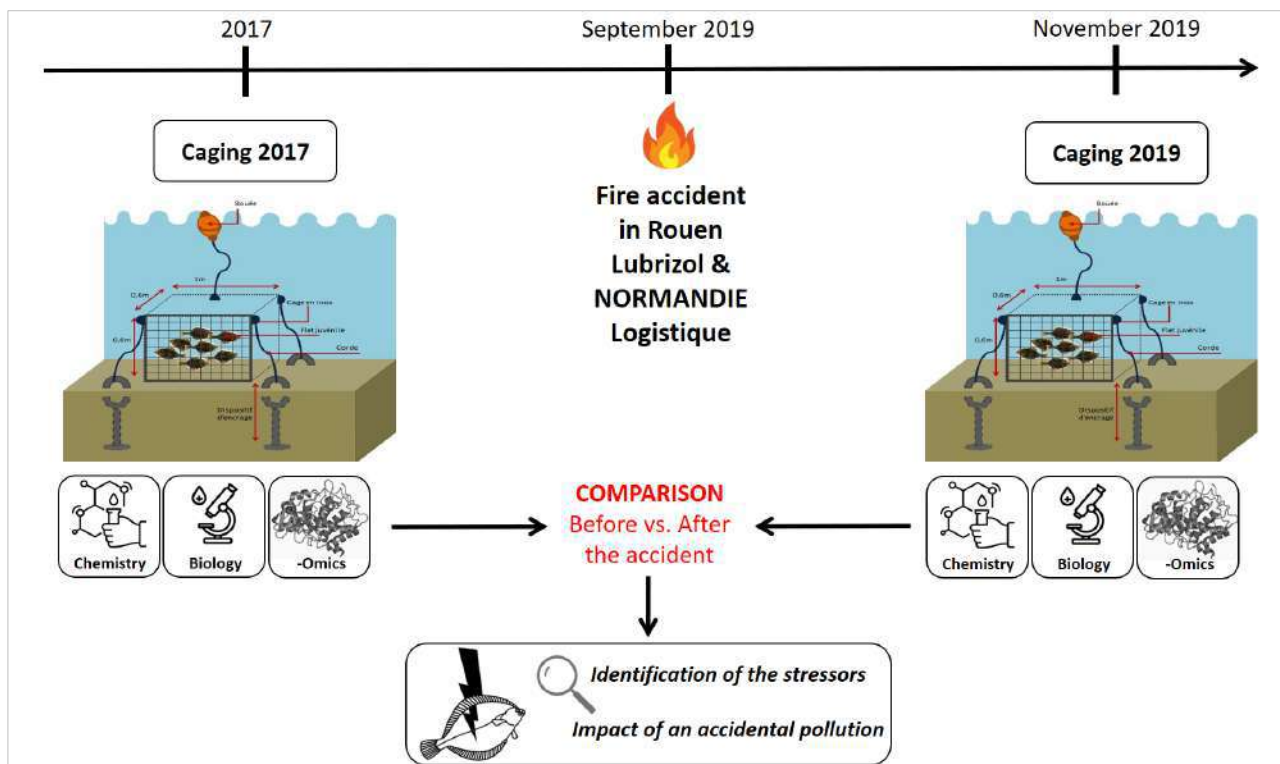


Figure 27. Résumé graphique de l'article "Relevance of flounder caging and proteomics to explore the impact of an industrial accident caused by fire on the Seine estuarine water quality: the case of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities".

© Laurent *et al.* (2024a)

Relevance of flounder caging and proteomics to explore the impact of an industrial accident caused by fire on the Seine estuarine water quality: the case of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities

Jennifer Laurent^{1,2*}, Mamadou Diop³, Rachid Amara³, Cédric Fisson⁴, Jean Armengaud⁵, Pierre Labadie⁶, Hélène Budzinski⁶, Jérôme Couteau⁷, Géraldine Maillet⁷, Stéphane Le Floch², Jean Laroche¹, Vianney Pichereau^{1*}

¹Univ Brest - CNRS - IRD - Ifremer, UMR 6539 LEMAR, IUEM-Université de Bretagne Occidentale, Rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

²CEDRE, 715 rue Alain Colas, 29200 Brest, France

³Univ. Littoral Côte d'Opale, Univ. Lille, CNRS, IRD, UMR 8187, LOG, Laboratoire d'Océanologie et de Géosciences, F-62930 Wimereux, France

⁴GIP Seine-Aval, Hangar C - Espace des Marégraphes, CS 41174, 76176 Rouen Cedex 1, France

⁵Laboratoire Innovations Technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRAe, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

⁶Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, EPOC, UMR 5805, F-33600 Pessac, France

⁷TOXEM, 12 rue des 4 saisons, 76290 Montivilliers, France.

* corresponding authors: jennifer.laurent@univ-brest.fr ; vianney.pichereau@univ-brest.fr

Abstract

This study assessed the environmental impact of the 2019 fire at the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities in Rouen, France, on the water quality of the Seine estuary. Juvenile flounders were captured in the Canche estuary and caged in both the Canche and Seine estuaries, close downstream of the accident site. After one month, organic pollutants were quantified in sediments, and flounder biomarkers were analysed. Fish liver proteins were subjected to proteomics analysis. Results were compared to a previous study conducted two years earlier, exactly at the same site and with identical conditions.

The results revealed significant deregulation of proteins associated with cholesterol synthesis and lipid metabolism in fish caged in the Seine estuary. By contrast, the traditional ecotoxicological biomarkers did not exhibit the same pronounced deregulation observed in our 2017 study. The overall results suggested a diffuse dioxin pollution in the Seine estuary post-fire.

Keywords: Industrial accident (fire), Caging, Estuarine water quality, Shotgun proteomics, Cholesterol, Fish response

1. Introduction

Spills of hazardous chemicals from industrial facilities are quite common. Indeed, the frequency and severity of these spills have increased dramatically in recent decades, due to heavy industrialization and high population density near industrial complexes. Moreover, chemical spills are known to ignite or evaporate and then form highly flammable vapour clouds, which then generate fires (Khan & Abbasi, 1997). These types of accidents are usually accompanied by a release of chemicals into the environment.

On September 26th, 2019, an important fire occurred at the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique chemical storage warehouses in Rouen. It is noteworthy that the Lubrizol chemical plant has a high risk threshold in the European Seveso Directive (European Commission, 2012). Due to this major accident, extinguishing waters and associated pollutants were spilled into the Seine River (estimated volume of 2,000 m³). Heavy hydrocarbons were also spilled into the Seine, resulting in fish mortality. Indeed, more than 150 m³ of pollutants were pumped out of the Seine (Bouillon & Adam, 2020; SDIS-76, 2019).

Following this disastrous event, several questions were raised regarding the consequences on the environment near the fire site and at the scale of the Seine estuary, in terms of water quality, aquatic fauna and ecosystem functioning (Fisson et al., 2020). Assessing the impact of such an accident on ecosystem health could be very difficult, given (1) the limited discharges into the Seine given the river's flow rate, (2) limited knowledge of the state of the basin where the extinguishing water was discharged, and (3) the difficulty of reacting to monitor immediate impacts in the event of an accident. Over the last two decades, our teams have developed tools to better characterize the quality of estuarine waters in Europe, using the European flounder (*Platichthys flesus*) as a key sentinel species (Diop et al., 2022, Laurent et al., 2022; Borcier et al., 2020; Pédrón et al., 2017a; Laroche et al., 2013; Dupuy et al., 2015; Galland et al., 2015; Marchand et al., 2003). *P. flesus* is present in all estuaries on the Atlantic coast, and shows an estuarine life cycle (Dando, 2011). This flatfish lives at the water-sediment interface, where numerous contaminants are present and potentially bioavailable (Chiffolleau, 2017; Williams et al., 2014) and is currently impacted by heavily pollution induced by urban and industrial effluents in estuarine systems (Defo et al., 2021; Tetreault et al., 2021; Vincze et al., 2015). Many studies in the field of stress ecology have thus been conducted on flounder (Laurent et al., 2022; Dabrowska et al., 2017; Galland et al., 2013; Kerambrun et al., 2013).

In 2017, we collected fish in the Canche, an estuary we have been using as a 'reference estuary' for several years, and we caged them for 1 month both in their home estuary, and in three different sites in the Seine estuary (Borcier et al., 2019). This study validated a new active monitoring strategy for characterizing estuarine water quality at micro-scale. One of the three sites on the Seine estuary was

located near Rouen, in Petit-Couronne, 10 km downstream of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique plants, where the fire occurred two years after in 2019.

We had carried out a thorough study on these fish, gathering extensive information on their physiological and metabolic changes in 2017, and showed their likely exposure to complex chemical mixture at the Rouen site (Borcier et al., 2019). Thus, contrary to what happens in the majority of cases, here we have fish data on the situation prior to the accident, in the neighbourhood of the industrial plants.

This study, provided a unique opportunity to obtain reliable data on the water quality of the Seine estuary prior to the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire, thus enabling to assess its impact. Therefore, the aim of the present work was to conduct an identical fish caging experiment that began on November 13th, 2019, just over one month after the disaster. Fish were caged for one month, and we employed a combination of chemical and biological approaches, along with a proteomics analysis of fish liver, that mirrored the methodology used in the previous experiment conducted in 2017 by Borcier et al. (2019). In 2017, the aim was to assess the relevance of a proteomic approach to an upstream-downstream gradient in a heavily polluted estuarine system.

2. Materials and methods

2.1. Study sites

The Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities are located in Rouen along the Seine estuary at Bassin au Bois (Flaubert bridge). The experiments during the present study were conducted at the level of Trou du Chapon in Petit-Couronne; a caging site located about ten kilometres downstream from Bassin au Bois (Fig. 1). The second site, considered as a control site, is located in the Canche estuary, near Etaples-sur-mer (Fig. 1). The caging sites (Seine and Canche) were strictly identical to those in Borcier et al. (2019), allowing to compare fish responses before and after the accident.

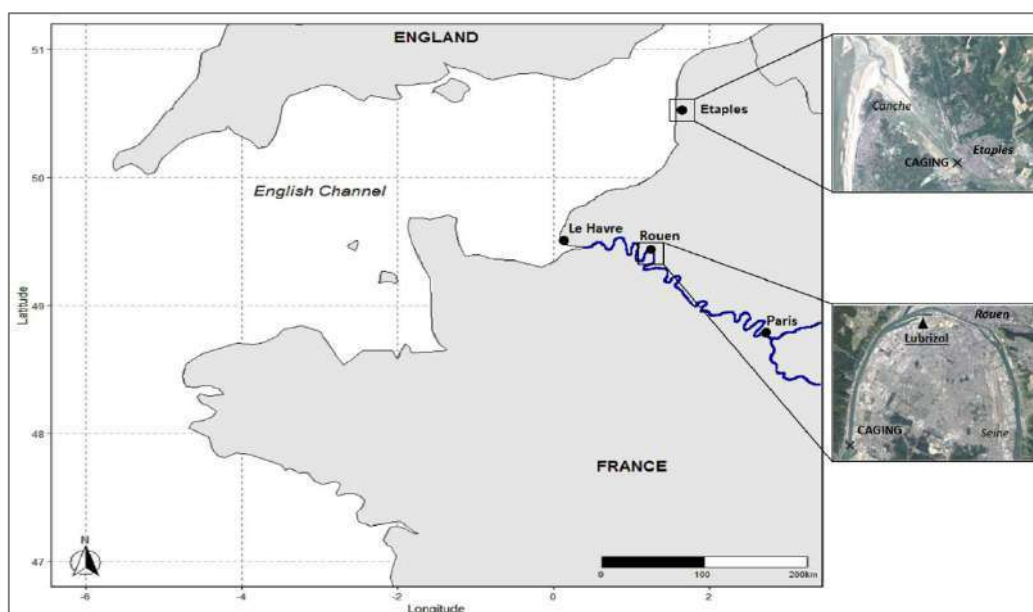


Figure 1. Location of the studied estuaries, site of accident, sites of caging (Canche and Seine) and main cities (Rouen and Etaples).

2.2. Environmental fish sampling and caging experiment

On November 9th, 2019, approximately 300 juvenile flounders (9.25 ± 0.70 cm; 8.04 ± 1.89 g) were caught with a small beam trawl in the Canche estuary and kept alive at the Laboratory of Oceanology and Geosciences in Wimereux. Flounders were acclimated for five days in a 500 L aquarium, with a photoperiod of 10h/14h, temperature maintained at 11°C , dissolved oxygen level at $95 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, and salinity gradually decreased to 5 NTU on the day before the experiment. During acclimation, fish were fed daily (3 % of their body weight) with live prey (Mysidacea, shrimp and artemia). Flounders were then caged on November 13th, 2019 at Petit-Couronne (50 days after the fire) and on November 15th, 2019 in the Canche estuary. Six cages (length = 1 m; width = 0.6 m; height = 0.6 m; volume = 0.36 m^3 ; mesh size = 1 cm) were set up (see Diop et al., 2022 for details on the caging method), four in Rouen and two in Canche. Before caging, juvenile flounders were measured and weighed in order to follow their growth in weight and size. In each cage, 15 individuals were placed with an additional reef made of oyster shells, to facilitate the recruitment of invertebrates for food (mostly amphipods). After 15 days of caging, on November 28th and 29th, 2019, half of the fish were removed from the study sites. The remaining fish were removed one month after the beginning of the experiment, on December 12 and 13th 2019, respectively in Petit-Couronne and Canche. The fish were weighed, measured and then dissected. Immediately after the dissections, brain, liver, muscle and blood samples were flash-frozen at -80°C until biomarker analysis. Muscle and carcass samples were also collected and stored at -20°C for future chemical contaminant analysis.

2.3. Shotgun proteomics

2.3.1. Liver total protein extraction, trypsinolysis and peptides analysis by tandem mass spectrometry

The complete proteome of five fish livers per estuary were analysed, as in Laurent et al. (2023). Briefly, a volume of 30 μL of NuPAGE LDS 1X sample buffer (Invitrogen) supplemented with β -mercaptoethanol (final concentration of 2.5 %) was added to each protein extract (20 μL). Then, each sample was diluted with water and NuPAGE LDS 3X (Invitrogen) depending on its protein concentration to obtain a concentration of total proteins of 1 μg per μL in LDS 1X. The samples were then heated at 99°C for 5 min. For each sample, 30 μg of proteins was deposited onto a NuPAGE 4-12 % gradient gel and subjected to SDS-PAGE in MES SDS running buffer (50 mmol.L^{-1} MES ([2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid), 50 mmol.L^{-1} Tris Base, 0.1 % SDS, 1 mmol.L^{-1} EDTA, pH 7.3) for 5 min. Each proteome was extracted as a single polyacrylamide band and processed for trypsin proteolysis as previously described (Hartmann et al. 2014), resulting in a peptidic sample of 50 μL . One fifth of this volume was injected in a nanoscale C18 PepMapTM 100 capillary column (LC Packings) and resolved with a 120-min gradient of CH_3CN , 0.1 % formic acid, at a flow rate of 0.2 $\mu\text{L.min}^{-1}$. Data-dependent acquisition analysis of the peptides eluting from the column was performed with a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo) operated essentially as described (Klein et al., 2016). Each full scan of peptide ions in the Orbitrap analyser was acquired from m/z 350 to 1800 at a resolution of 60,000 and with a dynamic exclusion of 10 sec. Each MS scan was followed by high-energy collisional dissociation and MS/MS scans on the 20 most abundant precursor ions, selecting only 2+ and 3+ charged ions.

2.3.2. Proteomic data interpretation

MS/MS spectra were assigned to peptide sequences by the MASCOT Daemon 2.3.2 search engine (Matrix Science) using the *Paralichthys olivaceus* full annotated proteome database as previously described (Borcier et al., 2019). A protein was considered validated when at least two different peptides (p-value below 0.05) were detected, resulting in a protein identification false discovery rate below 1 % as verified with a reverse decoy database search. The abundance of the proteins in each condition was assessed by their spectral counts (number of MS/MS spectra per protein). Comparative statistical analysis was carried out using the PatternLab software, with a significance level set at a p-value of 0.05 and an amplification (or reduction) factor (Tfold) of 1.5.

2.3.3. Proteomics data deposition

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [1] partner repository with the dataset identifier PXD043653 and 10.6019/PXD043653.

2.4. Cholesterol, triglycerides and phospholipids in fish muscle

Total lipids were extracted from the dorsal side muscle of flounders. Lipid extraction was carried out with 50 mg of lyophilized muscles according to the method of Folch et al. (1957) slightly modified with a mixture of chloroform and methanol (2:1; v/v) containing 0.01 % of butylated hydroxytoluene and 0.88 % NaCl, for a final proportion of chloroform/ methanol/ water (8:4:3; v/v/v). The chloroform phase was collected and dried with anhydrous sodium sulfate. Total lipids in chloroform were collected in clean pre-weighed vials. Total lipids extract was concentrated under nitrogen. Total lipid content was determined gravimetrically and stored at -80°C. Lipid classes were separated and quantified using a chromatographic separation coupled with flame ionization detector (FID) on an Iatroscan (MK-6s instrument Analyzer Iatron Laboratories, Tokyo, Japan). Total lipid extracts, with a lipid concentration of 40 mg.mL⁻¹, were applied using a SAS A4100 autospotter programmed to deliver 1 µL of chloroform extract per chromarod (Type 5S). Analyses were performed in triplicate. Lipid classes were determined by chromatography following the procedure described by Di Pane et al. (2019). The quantification was calibrated for each lipid class with commercial standards and performed using the software “Chromstar CHS-1”.

2.5. AChE and EROD activities

The brain acetylcholinesterase (AChE) and the liver Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity assays were already described by Borcier et al. (2019) and Laurent et al. (2022). AChE and EROD activities were measured on 10 fish per condition. Briefly, protein were extracted from brain (AChE) and liver (EROD). AChE activity was determined within 24 hours in quadruplicate, according to the colorimetric method of Ellman et al. (1961). EROD activity was measured in quadruplicate as described by Burke & Mayer (1974) and in accordance with AFNOR standard XP ISO/TS 23893-2. Brain AChE and liver EROD activities were respectively expressed as µmol of acetylthiocholine (AcSCh) hydrolysed per minute per milligram of protein and pmol of resorufin per minute per mg of protein.

2.6. Pollutant analysis

2.6.1. PAHs, PCBs and PFAS in sediment

During the caging experiment, sediments were collected in the caging site (Seine estuary: Petit-Couronne). The concentration of 24 PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbon) were quantified in sediments by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) as in Laurent et al. (2022), a method adapted from Lacroix et al. (2014). Briefly, 100 mg wet weight (w.w.) of sample were digested by saponification and analytes were extracted for 16 hours at 700 rpm using polydimethylsiloxane stir-bars (Twister 20 mm x 0.5 mm, Gerstel). Bars were analysed using a gas chromatography system Agilent 7890A, with a Restek Rxi-5ms column (30 m, 0.25 mm, 0.25 μm), coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) equipped with a Thermal Desorption Unit (TDU) combined with a Cooled Injection System (Gerstel). A calibration curve, ranging from 0.01 ng to 30 ng per bar, was used to assess relatively the deuterated compound of the analytes. To remove water, samples were dried at 50°C until the mass remained constant. Results are therefore expressed as μg of analytes/kg dry weight (d.w.). Limits of quantification (LOQ) were calculated by the calibration curve method (Shrivastava & Gupta, 2011) and limit of detection (LOD) were estimated by dividing LOQ by three. Standard Reference Materials 1974c “Organics in Mussel Tissue (*Mytilus edulis*)”, provided by the National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg, USA), were used as analytical quality control.

PCBs (Polychlorinated Biphenyl) analyses were carried out as described previously (Barhoumi et al., 2014). PCBs were extracted from sediment samples using microwave assisted extraction and extracts were cleaned-up on a multilayer column consisting of activated copper, silica and alumina (top to bottom) and further purified on acid-impregnated silica. PCBs were analysed by gas chromatography coupled with electron capture detection (GC-ECD) (Barhoumi et al., 2014). PCBs not present in the environment (CBs 30, 103, 155, 198) and 4,4'-DDT-d8 were used as internal standards (ISs) for quantification. Procedural blanks were performed for each sample batch and blank-correction was applied. Samples and blanks were spiked with internal recovery standards prior to extraction procedures and with a syringe standard (octachloronaphthalene) before injection to monitor IS recovery rates. LODs, as defined based on either blanks or signal to noise ratios, were in the range 0.5–1 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

The sample extraction procedure for PFAS (Per- and Polyfluoroalkyl Substances) was performed according to Simmonet-Laprade et al. (2019). Briefly, sediments samples (1 g dry weight, d.w.) were spiked with mass-labelled internal standards (2 ng each) and subjected to microwaved-assisted solvent extraction with 250 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ in MeOH (12 mL), followed by filtration (glass

wool) and clean-up through graphitized carbon. Extracts were then concentrated to approximately 300 μL under a gentle nitrogen stream at 40°C and then stored at -20°C prior to analysis. Method blanks consisted of extraction solvent spiked with ISs and spiked controls consisted of sand with PFAS and ISs (i.e. material). PFAS analysis was performed using liquid chromatography electrospray ionization coupled with tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS), using a 1290 LC system hyphenated with a 6495 triple quadrupole mass spectrometer (both from Agilent Technologies, Massy, France). Full details are provided in Simmonet-Laprade et al. (2019). LODs were in the range 0.02–0.5 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

2.6.2. Analysis of runoff water and sewage sludge from the Rouen wastewater treatment plant

Following the fire at Lubrizol and NORMANDIE-Logistique, the city sanitation department “Métropole Rouen Normandie - Direction de l'Assainissement” and the departmental directorate for territories and the sea (DDTM) implemented several emergency and monitoring chemical measurements. The analyses especially were carried out at the Emeraude wastewater treatment plant (WWTP), which treats effluent from Rouen's wastewater network. This plant also treated runoff and post-fire leachate from a large artificial surface affected by the fire plume over the city of Rouen. Analyses were carried out on the raw water entering the plant and on the sewage sludge produced by the WWTP which concentrates the pollutants. Thus, these chemical analysis in water and sludge (mainly dioxins and furans) carried out by the “Métropole Rouen Normandie” completed our own analyses of PAHs, PCBs and PFAS conducted in sediments.

2.7. Statistical analysis

Statistical tests were performed using the Stats package in R. Normality and homoscedasticity of variances were controlled with a Shapiro-Wilk test and a Bartlett test, respectively. Since data were not normally distributed, a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn test (for multiple comparisons) were applied to compare means over all the conditions (study sites x days of caging). A p-value lower than 0.05 was considered as a significant difference.

3. Results and discussion

3.1. Caged fish downstream of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique accident site do not display apparent symptoms of health impairment

The Seine is one of the largest estuarine systems in Europe. It is also a multi-stressed system (Laurent et al. 2022); thus, it could be difficult to analyse the consequences of an industrial accident in such altered system. In the case of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique plants fire in 2019, we

took advantage of an active monitoring approach we had carried out two years earlier, in 2017, which allowed to characterize the initial health status of a site located 10 km downstream the accident site (Rouen, France). We have respected the same methodology like two years ago; thus we collected fish in the Canche estuary, and caged them both in their original estuary and in Rouen.

The fish were scarified after 15 days and one month. They did not display any apparent sign of health impairment at the end of caging in Seine vs Canche. Thus, we did not observe in 2019 any mortality in the cages, nor any decrease in the fish condition factor (Table S1). We sampled and analysed the protein content of the fish liver. The molecular signatures of caged fish were compared in Seine vs Canche, as two years ago in 2017.

3.2. Shotgun proteomics

Organisms subjected to stress undergo a process of reprogramming of their gene expression and, therefore, of their proteins. Global proteomic approaches have already demonstrated such a reprogramming in *P. flesus* (Borcier et al., 2019; Galland et al., 2013). Studying the molecular alterations observed following stress allows a better understanding of the metabolic adaptations of organisms to cope with the adverse effects of stress, but also provides essential information on the environmental conditions in which the individuals live. The liver is the organ in which xenobiotics detoxification takes place. Consequently, one efficient way to assess the presence of xenobiotics in the marine environment is to analyse the liver proteins. We therefore used a global shotgun proteomics approach to analyse the livers of fish that had been caged for one month in this environment.

The global proteomic approach presented here aimed at identifying the differences between the flounder caged in the Seine and those caged in the Canche. In all, over 500,000 MS/MS spectra were recorded and analysed, resulting in the identification and quantification tracking of 1,849 proteins in all the samples. We compared the proteomes of fish caged in the Seine vs. Canche, which served as the reference estuary in previous studies conducted on the Seine (Borcier et al., 2019; Laurent et al., 2021).

The proteomic comparisons showed notable differences between the Seine and the Canche, throughout the caging period (Table 1). After 15 days of caging, individuals caged in the Seine showed significant up-regulation of 82 proteins and down-regulation of 70 proteins, compared to those in the Canche. After 30 days, 75 proteins showed significant higher accumulation and 39 proteins exhibited lower accumulation in the liver of fish from the Seine.

Table 1. Number of deregulated proteins in *P. flesus* liver from Seine estuary after Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire accident vs Canche estuary.

Proteins deregulation	15 DAYS OF CAGING	30 DAYS OF CAGING
Up-regulated proteins	82	75
Down-regulated proteins	70	39

It should be noted that we must be very careful to consider that the number of deregulated proteins could be proportional to the fish stress intensity, because our study did not include a non-stressed control environment, since we studied fish collected and caged in the wild. Therefore, fish from the reference estuary (Canche) were also subjected to a possible stress linked to caging (Borcier et al. 2019). To address this limitation, a qualitative differential functional analysis of the deregulated proteins was conducted to gain further insights.

3.2.1. Functional re-annotation and COG classification

A functional analysis of deregulated protein datasets was carried out to highlight metabolic changes in fish caged in Petit-Couronne (Laurent et al., 2023; Borcier et al., 2019).

To this end, the sequences of all deregulated proteins were retrieved and re-annotated using Blast2GO and EggNOG (Conesa et al., 2005; Powell et al., 2014) software, followed by careful manual re-examination. The proteins in each dataset were categorized into protein subsets based on the COGs (Clusters of Orthologous Groups) classification (Fig. S1).

Individuals caged in Seine for 15 days showed a dominance of the I (20.7 %, lipid transport and metabolism) and S (10.9 %, function unknown) categories of up-regulated proteins and a dominance of categories S (28.6 %) and O (11.4 %, protein modification/transformation) of down-regulated proteins.

In the proteomes of fish caged in the Seine for 30 days, the accumulated proteins predominantly belonged to categories S (26.7 %) and I (16 %) and the down-regulated proteins belonged to categories S (25.6 %), D (10.3 %, cell cycle control, cell division, chromosome partitioning) and E (10.3 %, amino acid transport and metabolism).

3.2.2. Network and enrichment analyses

STRING v11.0 (Szklarczyk et al., 2019) network and KEGG enrichment analyses were then performed to identify metabolic changes performed in the liver of fish caged in the Seine and Canche estuaries. The up and down subsets thus analysed provided an overall analysis of the molecular changes in the metabolism of the individuals. Proteins were then submitted to a functional re-annotation using EGGNog, Gene Ontology (GO) and a careful manual examination. This helped us to further characterize the deregulation of some metabolic pathways.

STRING and KEGG enrichment analyses were then carried out to identify metabolic changes in the livers of fish caged in Petit-Couronne following the accident. The up- and down-regulated protein subsets were analysed separately, giving a global analysis of the molecular changes in the metabolism of the individuals (Table S2).

The enrichment analysis yielded highly significant changes in metabolic pathways (KEGG dre01100) in both the fish subjected to 15 and 30 days of caging. Specifically, we observed a substantial accumulation of proteins involved in Terpenoid backbone (dre00900) and steroid (dre00100) biosynthesis. Interestingly, these two categories actually reflect the dysregulation of the same metabolic pathway, as steroids are triterpenoid compounds derived from the condensation of six isoprenes.

Limited induction of xenobiotic detoxification

In ecotoxicology, molecular biomarkers are commonly based on detoxification mechanisms initiated in the liver in response to xenobiotic exposure. Xenobiotic biotransformation processes are classified into two phases (Hassan et al., 2015). Phase I mechanisms engage mixed function oxidases (MFOs), which require a cytochrome P450 protein associated with an NADPH-Cytochrome P450 reductase (Livingstone, 1998). MFO activity is a biomarker for the presence of pollutants such as PAHs, PCBs and dioxins (Porte et al., 2000).

A closer examination of the deregulated proteins in the liver of fish caged in Seine vs Canche (Table 2) revealed a positive deregulation of xenobiotic detoxification pathways. Among these pathways was NADPH-cytochrome P450 reductase (1.51 and 1.09 fold). Similarly, we found two different isoforms of Cytochrome P450; Cytochrome P450 1A1 and Cytochrome P450 2G1-like.

Proteins involved in the methionine cycle also appeared deregulated (Table 2). The methionine cycle has frequently been documented as deregulated in the liver of flounder exposed to xenobiotics (Galland et al., 2015; Laurent et al., 2023). Indeed, Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1-like was down-regulated (-1.05 fold). In contrast, methionine synthase was significantly accumulated in the liver of fish caged in the Seine (1.60 fold). The negative deregulation of BHMT combined with the positive deregulation of methionine synthase, suggest that methionine synthesis was favoured at the expense of homocysteine. This pattern of metabolic pathways has recently been observed in small estuaries exposed to various xenobiotics, either pesticides and/or PAHs (Laurent et al., 2023).

The present study aims to assess the effect of accidental pollution on the Seine water quality, comparatively to a previous study, conducted on the same system in routine condition (Borcier et al., 2019). The molecular analyses presented here, and thus performed after the fire at the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities, showed a much lower number of deregulated proteins associated with xenobiotic detoxification than the analyses performed 2 years before the fire. Post-

accident, there were no longer certain deregulated proteins such as Cytochrome P450 2, Cytochrome P450 4, Dimethylaniline monooxygenase, Glutathione S-transferase, etc. (Borcier et al., 2019). Similarly, analysis of KEGG categories did not show significant deregulation of metabolic pathways associated with "drug metabolism-cytP450" (dre00982, Table S2).

Table 2. List of the deregulated proteins related to the xenobiotics detoxification in *P. flesus* liver from Canche and Seine estuaries.

	Accession	Description	Mascot score	Coverage	Peptides	Seine post-Lubrizol 15 days of caging		Seine post-Lubrizol 15 days of caging	
						Tfold	p-value	Tfold	p-value
Cholesterol synthesis	XP_019959570.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase isoform X1	91	2.2	3	1.60	5.12E-03	1.18	4.12E-01
	XP_019954722.1	3-ketoacyl-coa thiolase, mitochondrial	170	18.2	8	1.67	1,37E-01	2,19	4,03E-05
	XP_019952981.1	Acetyl-coa acetyltransferase, cytosolic	234	10.1	8	1.71	6,33E-04	2,12	3,44E-04
	XP_019954919.1	Acetoacetyl-coa synthetase	473	15.5	12	10.60	1.65E-05	1.33	1.09E-01
	XP_019967852.1	Hydroxymethylglutaryl-coa synthase, cytoplasmic isoform X1	429	22.8	10	10.55	5.68E-05	2.11	3.86E-07
	XP_019969438.1	Hydroxymethylglutaryl-coa synthase, cytoplasmic-like	282	22.3	6	4.29	2.80E-04	1.66	1.56E-05
	XP_019959570.1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase isoform X1	91	2.2	3	1.60	5.12E-03	1.18	4.12E-01
	XP_019954236.1	Diphosphomevalonate decarboxylase	94	5.1	2	1.82	3.80E-02	2.00	1.35E-03
	XP_019948081.1	Farnesyl pyrophosphate synthase isoform X1	214	16.2	5	2.70	2.50E-02	2.50	1.41E-03
	XP_019953344.1	Squalene synthase	423	18.1	10	4.36	4.32E-07	2.38	9.08E-03
	XP_019965795.1	Lanosterol synthase	726	22.6	15	5.83	1.71E-03	3.67	2.66E-04
	XP_019934099.1	Sterol-4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	101	10.7	5	1.30	3.43E-01	2.00	8.47E-03
	XP_019935179.1	7-dehydrocholesterol reductase	93	3.3	2	1.36	1.60E-02	1.57	5.05E-04
	XP_019941117.1	Delta(14)-sterol reductase	158	5	3	1.58	5.12E-02	1.57	3.98E-02
XP_019969465.1	Lanosterol 14-alpha demethylase, partial	322	24.9	8	6.60	2.71E-06	2.41	7.86E-04	
Fatty acids synthesis and modification	XP_019941294.1	Acetyl-coa carboxylase 1 isoform X1	2570	23.9	63	4.94	3.45E-04	1.29	1.88E-01
	XP_019956254.1	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	197	11.1	7	1.69	2.71E-02	1.91	4.35E-02
	XP_019938212.1	Acyl-coa desaturase-like	170	8.3	2	1.70	4.45E-02	2.17	2.80E-02
	XP_019951704.1	Acyl-coa desaturase-like	444	17.1	7	4.50	1.56E-03	1.65	6.76E-03
	XP_019964811.1	Acyl-coa synthetase family member 2, mitochondrial-like	258	11.4	5	1.75	2.01E-01	2.14	1.63E-02
	XP_019961022.1	Acyl-coa synthetase short-chain family member 3, mitochondrial isoform X1	87	3.8	4	2.30	3.90E-02	-1.21	4.97E-01
	XP_019963310.1	Fatty acid synthase-like	1821	21	36	1.73	4.52E-03	1.17	1.27E-01
	XP_019950392.1	Long-chain-fatty-acid-coA ligase 3	262	9.6	7	2.72	7.90E-04	1.07	7.89E-01
	XP_019941733.1	Long-chain-fatty-acid-coA ligase 6	364	17.1	11	1.63	1.57E-02	1.36	1.78E-01
Other lipids transport and metabolism proteins	XP_019953101.1	Apolipoprotein B-100-like	313	1.9	10	2.04	1.19E-02	1.53	5.28E-03
	XP_019953039.1	Apolipoprotein B-100-like	716	4	18	2.39	8.52E-03	2.10	4.55E-03
	XP_019959772.1	Bile salt-activated lipase-like	212	7.6	3	2.40	1.32E-03	1.09	6.10E-01
	XP_019966386.1	Low-density lipoprotein receptor-related protein 1-like, partial	184	2.5	2	1.60	5.12E-03	1.45	1.97E-02
	XP_019960096.1	Palmitoyl-protein thioesterase 1	225	14.2	4	-1.60	2.78E-02	-1.22	3.47E-01
	XP_019951068.1	Perilipin-2	160	7.9	3	2.30	1.33E-02	2.53	2.79E-03
	XP_019944292.1	Phosphomethylethanolamine N-methyltransferase-like isoform X1	622	28.9	16	1.76	1.98E-04	1.27	1.89E-02
	XP_019956342.1	Putative phospholipase B-like 2	127	5.5	3	-2.30	1.33E-02	-1.67	1.60E-02
XP_019968171.1	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-like, partial	50	9.8	2	1.00	0.00E+00	2.27	4.32E-04	

Carbohydrate (energy) metabolism	XP_019951690.1	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase isoform X1	808	37.9	11	1.18	3.60E-01	2.20	1.37E-06
	XP_019934838.1	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial	285	12.4	5	1.80	1.07E-02	1.57	9.49E-02
	XP_019935599.1	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial-like	436	19.8	6	1.77	1.49E-03	1.81	2.91E-03
	XP_019967552.1	Pyruvate kinase PKM-like	376	42.1	5	1.45	3.57E-02	1.70	1.59E-03
Xenobiotics detoxification related proteins	XP_019937145.1	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1-like	401	24.6	5	-1.05	8.45E-01	2.36	3.89E-02
	XP_019935791.1	Cytochrome P450 1A1	374	14.4	8	1.81	4.16E-03	1.16	2.67E-01
	XP_019943823.1	Cytochrome P450 2G1-like	428	15.1	5	2.06	3.50E-03	1.66	6.00E-05
	XP_019941573.1	Glutathione reductase, mitochondrial isoform X1	118	6.2	5	-1.06	8.37E-01	-1.57	4.69E-02
	XP_019938370.1	Methionine synthase	71	2.1	2	1.60	2.39E-02	1.40	3.68E-02
	XP_019950625.1	NADPH-cytochrome P450 reductase	390	12.7	12	1.51	5.53E-03	1.09	3.02E-01
	XP_019952519.1	UDP-glucuronosyltransferase 2C1-like isoform X1	212	6	5	1.89	5.75E-03	1.50	9.00E-02

Caged fish show a strong dysregulation of lipids metabolism

In the present study, major differences in the expression of lipid transport and protein metabolism were detected between the Seine and Canche fish (Table 2). Specifically, eight proteins associated with this metabolic pathway exhibited deregulation in the fish. Two isoforms of Apolipoprotein B-100-like, which play a role in the transportation of cholesterol into arterial walls, showed an over-accumulation of 1.6-fold. Similarly, the expression of Low-density lipoprotein receptor-related protein 1-like partial was up-regulated by 2.4-fold. Additionally, Perilipin 2, also known as Adipose differentiation-related protein, exhibited an up-regulation of 2.3-fold. This protein, belonging to the PAT family of cytoplasmic lipid droplet (CLD) binding protein, is involved in the storage, catalysis, and degradation of lipids.

In contrast, two proteins appeared to be under-detected in the fish from the Seine vs Canche, even as early as 15 days of caging. These proteins are Palmitoyl-protein thioesterase 1 (PPT-1) (with a fold change of -1.6) and Putative phospholipase B-like 2 (PLBD2) (with a fold change of -2.3). PPT-1 is a glycoprotein that participates in the catabolism of lipid-modified proteins during lysosomal degradation. PLBD2, on the other hand, is an enzyme responsible for the hydrolysis of phospholipids.

Strong increase of cholesterol synthesis

Initial network analyses have revealed significant accumulation of proteins involved in terpenoid backbone (dre00900) and steroid (dre00100) biosynthesis, in Seine vs Canche fish. Upon closer examination of the results, it was observed that the proteins associated with nearly all steps of cholesterol synthesis were over-accumulated. These steps encompass the synthesis of mevalonate, the condensation of isoprene residues, the cyclization of squalene to produce lanosterol, and its conversion into cholesterol. Remarkably, a total of 14 proteins involved in cholesterol synthesis were induced in the liver of fish from the Seine at both 15 and 30 days of caging (Table 2). The initial steps of cholesterol synthesis were up-regulated, with a notable increase in Acetoacetyl-CoA synthetase

(10.6-fold) after 15 days of caging. This protein initiates the formation of Hydroxymethylglutaryl-CoA (HMG-CoA) in the mevalonate pathway, which is essential for cholesterol biosynthesis, under the action of HMG-CoA synthase. Additionally, Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase was the second most over-expressed protein in the liver of fish caged in the Seine for 15 days, with a 10.55-fold increase. Similarly, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase, the enzyme responsible for mevalonate synthesis and the main regulatory point of the sterol synthesis pathway, was also overexpressed (1.60-fold). The aforementioned proteins exhibited greater accumulation at 15 days compared to 30 days of caging, but they remained over-accumulated at 30 days compared to the fish caged in the Canche. Other proteins involved in the mevalonate pathway were also accumulated in the Seine at both 15 and 30 days of caging. These proteins include Diphosphomevalonate decarboxylase (1.82-fold and 2.00-fold), which is implicated in the synthesis of Isopentenyl-pyrophosphate and Dimethylallyl-pyrophosphate, intermediates for cholesterol synthesis. Proteomic analyses further revealed an up-regulation of Farnesyl pyrophosphate synthase (2.7-fold and 2.5-fold), an immediate precursor of squalene under the action of Squalene synthase, which was also accumulated in the liver of individuals caged in the Seine (4.36-fold and 2.38-fold).

Induction of fatty acid synthesis

Preliminary network analyses have revealed metabolic changes in fish caged in the Seine. Analysis of KEGG categories (Table S2) has indicated deregulation in "Fatty acid metabolism" (dre01212), "Fatty acid biosynthesis" (dre00061), and "Fatty acid degradation" (dre00071).

Specifically, several proteins involved in the formation of Malonyl-CoA for fatty acid synthesis were found to be overexpressed. Acetyl-CoA carboxylase 1, an enzyme responsible for the initial step of fatty acid synthesis, exhibited up-regulation after 15 days of caging in the Seine (4.94-fold) (Table 2). This protein catalyses the transfer of bicarbonate to activate cytoplasmic Acetyl-Coenzyme A into Malonyl-Coenzyme A, an intermediate in fatty acid synthesis. Rats exposed to monocrotophos, an organophosphate insecticide, displayed deregulation in the expression of acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase in the liver (Nagaraju et al., 2020).

Molecular analysis further revealed an enrichment of cytoplasmic Acetyl-Coenzyme A synthetase (1.69-fold), as well as mitochondrial-like Acyl-CoA synthetase family member 2 and mitochondrial isoform X1 of Acyl-CoA synthetase short-chain family member 3 showed up-regulation (1.75-fold and 2.30-fold, respectively) (Table 2). These proteins catalyse the synthesis of Acetyl-CoA from short-chain fatty acids, acetate, or propionate.

Fatty acid synthase, involved in the catalysis of fatty acid synthesis, was also found to be over-accumulated (1.73-fold) (Table 2). This enzyme system primarily facilitates the synthesis of palmitate (C16:0) from acetyl-CoA and Malonyl-CoA, in the presence of NADPH.

Proteomic analysis additionally detected the up-regulation of two Long-chain-fatty-acid-CoA ligase proteins. Long-chain-fatty-acid-CoA ligases activate fatty acids prior to their subsequent degradation or incorporation into phospholipids, by catalysing the formation of fatty acyl-CoA.

Derivation of sugar metabolism towards NADPH synthesis

It noteworthy that the pathways involved in fatty acid and cholesterol synthesis are closely dependent on the cofactor NADPH, which is mainly formed through the pentose phosphate pathway.

Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase (G6PDH) appeared to be enriched (1.2-fold). This over-accumulation suggests that the Pentose Phosphate metabolic pathway is favored over glycolysis. Indeed, G6PDH is the first enzyme in the Pentose Phosphate route and catalyzes the oxidation of glucose-6-phosphate to 6-phosphoglucono- δ -lactone with the reduction of NADP⁺ to NADPH. It is also worth noting the over-accumulation of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase (2.3-fold after 30 days of caging); this enzyme regulates the cellular levels of fructose 2,6-bisphosphate, which acts as a signaling molecule that regulates glycolysis (Rider et al., 2004).

The pyruvate kinase PKM is also up-regulated (1.45-fold). This isoform of glycolytic pyruvate kinase catalyzes the final rate-limiting step of glycolysis by mediating the transfer of a phosphoryl group from phosphoenolpyruvate (PEP) to ADP, generating pyruvate and ATP. Finally, two isoforms of mitochondrial-like Isocitrate dehydrogenase [NADP] were up-regulated. These enzymes catalyze the decarboxylation of isocitrate to α -ketoglutarate while reducing NADP⁺ to NADPH, thereby contributing to the production of NADPH required for the synthesis of fatty acids and cholesterol.

Dysregulation of the proliferator-activated receptors signaling pathway

The peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) form a subfamily of nuclear receptors. Three isoforms have been identified so far: PPAR γ , PPAR α , and PPAR δ . PPARs are ligand-dependent transcription factors that regulate the expression of target genes by binding to specific peroxisome proliferator response elements (PPREs) located in enhancer sites of regulated genes. Each receptor binds to its PPRE as a heterodimer with the retinoid X receptor (RXR). Upon agonist binding, the conformation of a PPAR receptor is altered and stabilized, creating a binding cleft and allowing the recruitment of transcriptional coactivators. This leads to an increase in gene transcription.

Network experiments have shown an enrichment of the KEGG pathway dre03320 category, both after 15 and 30 days of caging in Petit-Couronne (with FDRs of 1.8e-05 and 0.0045, respectively). It is also important to remember that PPARs are known to play a critical role in lipid metabolism. In fact, the first characterized ligands for PPARs are lipids, particularly fatty acids and derivatives of arachidonic acid, ie. eicosanoids (especially prostaglandins). In addition to these natural molecules, numerous synthetic ligands, including pharmaceutical compounds (such as antidiabetic

thiazolidinediones or hypertriglyceridemia-fighting fibrates) and industrial compounds, have been identified.

The main targets of PPARs are lipid metabolism pathways. PPAR α is predominantly expressed in the liver, heart, and brown adipose tissue, where it regulates fatty acid synthesis and oxidation pathways. PPAR γ is involved in adipocyte differentiation and also regulates lipid metabolism and inflammation. Furthermore, PPAR γ have the ability to bind with certain endocrine disruptors, potentially leading to fat accumulation in adipocytes following an exposure to these compounds (Desvergne et al., 2009; Grun et al., 2006). There is thus a clear link between this signaling pathway and obesity.

Numerous studies have explored the connection between PPARs and pollutants, drugs, including several focusing on the obesogenic effects of organotins and phthalates mediated by PPAR γ or agonists such as thiazolidinediones (Desvergne et al., 2009 ; Feige et al., 2007 ; Ahmadian et al., 2013). It should also be noted that PPARs are involved in the regulation of xenobiotic detoxification pathways mediated by mixed-function oxidases, particularly those involving CYP1A1, which was found accumulated in caged fish in Petit-Couronne following the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire. CYP1A1 catalyzes the biotransformation of numerous xenobiotics, especially polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and arylamines. Although the regulation of CYP1A1 is primarily known to be mediated by the aryl hydrocarbon receptor (Ahr), which is activated by various xenobiotics including dioxins, PAHs, flavonoids, and benzimidazole derivatives (Whithlock et al., 1999), the promoter of the CYP1A1 gene contains two PPREs allowing binding by PPARs. In humans, PPAR α agonists induce the expression of the CYP1A1 gene, while PPAR γ agonists repress it. It should also be noted that perfluorocarboxylic acids (Cheng & Klaasen, 2008) and other PFAS (Evans et al., 2022) induce cytochrome P450 enzymes in mouse liver, through the activation of PPAR α .

Finally, there appears to be a connection between the major metabolic changes observed in caged fish in Rouen, namely the significant positive dysregulation of lipid synthesis pathways and fat accumulation, and the dysregulation of the PPAR signaling pathway revealed by our network analyses. Given the mode of activation of these signaling pathways, this dysregulation could be linked to the presence of xenobiotics released during the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique factories fire.

Phenotypic anchorage of lipid dysregulation: overproduction of cholesterol, triglycerides, and phospholipids in fish muscle

As the molecular analyses indicated a clear dysregulation of lipids synthesis, we decided to measure the levels of cholesterol, triglycerides, and phospholipids in the muscle of fish caged in the Seine and Canche estuaries.

Fortunately, we still had some frozen samples from the caging experiment carried out in 2017, allowing to compare the lipids present in the fish caged both in Rouen compared with the Canche in 2019, and also post-accident in 2019 versus those caged in Rouen in 2017.

Cholesterol (CT), triglycerides (TAG), and phospholipids (PL) were assessed in the muscle tissue of 20 caged flounder specimens (Fig. 2). The measured concentrations of cholesterol in fish caged in Rouen in 2019 were $1.98 \pm 0.74 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w. (15 days of caging) and $2.18 \pm 1.22 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w. (30 days). These CT levels were significantly higher than those recorded in fish caged in the Canche in 2019 at 30 days ($1.46 \pm 0.51 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w.), as well as those measured in fish caged in the Rouen site in 2017 ($1.44 \pm 0.35 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w.).

Triglyceride concentrations were also notably higher in fish caged in the Seine in 2019 after the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire. Indeed, TAG levels at 30 days in fish caged in Petit-Couronne in 2019 were 2.7 times higher compared to those caged in the Canche, and 3.2 times higher compared those measured in fish from the Seine in 2017.

Regarding the concentrations of phospholipids, no significant difference were observed between the fish caged in the Canche ($9.76 \pm 2.58 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w. and $7.48 \pm 2.09 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w. after 15 and 30 days caging, respectively) and in Petit-Couronne in 2019 ($8.64 \pm 2.34 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w. and $9.16 \pm 2.05 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w. at 15 and 30 days). However, the PL levels in the Seine in 2019 were slightly higher than those observed for the fish caged in 2017 at 15 and 30 days ($7.41 \pm 1.38 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w. and $7.23 \pm 0.99 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ d.w., respectively).

These findings provide further evidence that the upregulation of cholesterol and fatty acid synthesis leads to an accumulation of these molecules. Interestingly, similar dysregulation of cholesterol metabolism has been associated with exposure to environmental contaminants. Previous studies have shown that this metabolic pathway can be affected by PFAS. For instance, fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to various PFAS compounds exhibited changes in the expression of several genes involved in cholesterol metabolism (Rodríguez-Jorquera et al., 2018). Elevated cholesterol synthesis in fish has also been observed following exposure to polycyclic aryl hydrocarbons (PAHs). Transcriptomic studies have demonstrated this response in Atlantic haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) (Sørhus et al., 2017), red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Xu et al., 2019), and mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) (Xu et al., 2016).

Furthermore, Zebrafish (*Danio rerio*) exposed to PAHs exhibited a similar increase in the cholesterol biosynthesis pathway, accompanied by altered concentrations of steroid hormones (Price et al., 2022). However, in our molecular analysis, it is important to note that no dysregulation of steroid hormone synthesis or the conversion of cholesterol into steroid hormones was observed. Finally, it is worth mentioning that other substances, such as Bisphenol A (Li et al., 2019) and phthalates (Lee et al., 2020), have also been found to disrupt cholesterol synthesis.

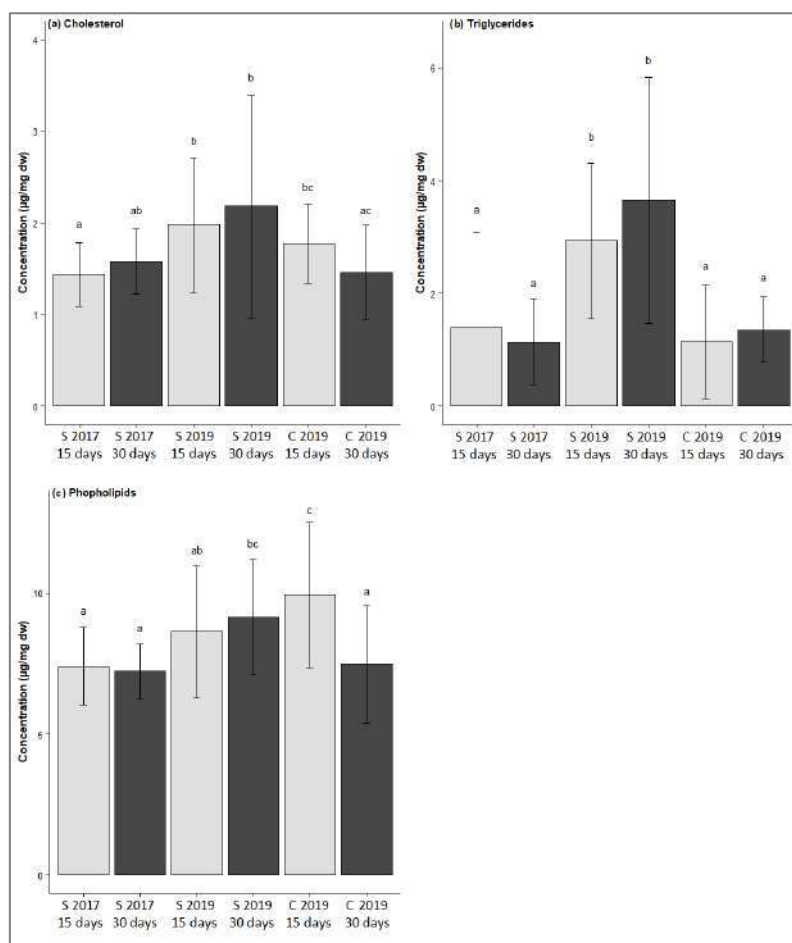


Figure 2. Mean (and 95% confidence interval) of lipids measured in *P. flesus* caged in Canche (C) and Seine (S) estuaries after Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire accident. (a) Cholesterol in muscle. (b) Triglycerides (TAG) in muscle. (c) Phospholipids in muscle. (Statistics: Kruskal-Wallis test: p -value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries and days of caging).

3.3. EROD and AChE activities

It is important to recall that experiments conducted on caged fish in Petit-Couronne in 2017 had showed an accumulation of almost all proteins associated with xenobiotic detoxification pathways, suggesting a high level of contamination of that site. However, after the accident in 2019, our enrichment experiments did not highlight protein categories related to these detoxification mechanisms. Therefore, we conducted a targeted approach on two classical biomarkers of contamination (EROD and AChE activities).

EROD activity highlights receptor-mediated induction of cytochrome P450 (CYP1A)-dependent monooxygenases. EROD activity is the most specific biomarker of PAHs, PCBs and dioxin-like exposure (Santana et al., 2018; Whyte et al., 2000). No significant difference was observed for EROD activity between Seine vs Canche fish or between exposure time (15 d. vs 30 d.) (Fig. 3b). Although there was no difference in EROD activity between the two sites, molecular analyses revealed a limited but significant deregulation of cytochrome P450 1A1 and cytochrome P450 2G1, phase I

detoxification proteins used as biomarkers for the presence of PAHs, PCBs and dioxins (Cf 3.2.). Omics tools therefore enable more refined analysis than conventional biomarkers.

Brain AChE activity, used as a biomarker of neurotoxic damage, is one of the oldest biomarkers in environmental monitoring of pesticide exposure (organophosphate and carbamates). AChE activity can also be modified by co-exposure to other pollutants (organophosphate and carbamate) (Van der Oost et al., 2003). In this study, AChE activity was significantly higher in Canche at 15 days ($0.195 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$) and 30 days ($0.117 \pm 0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$) than in Seine at 15 days ($0.11 \pm 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$) and 30 days ($0.112 \pm 0.02 \mu\text{mol}\cdot\text{min}\cdot\text{mg}^{-1}$), regardless of the number of caging days (Fig. 3a). Studies have shown that, in addition to the classic AChE inhibitors (pesticides and carbamates), dioxins can also induce altered AChE activity. In vitro, in human or mouse cells, dioxins can transcriptionally or post-transcriptionally suppress AChE expression (Xie et al. 2016; Xu et al., 2014).

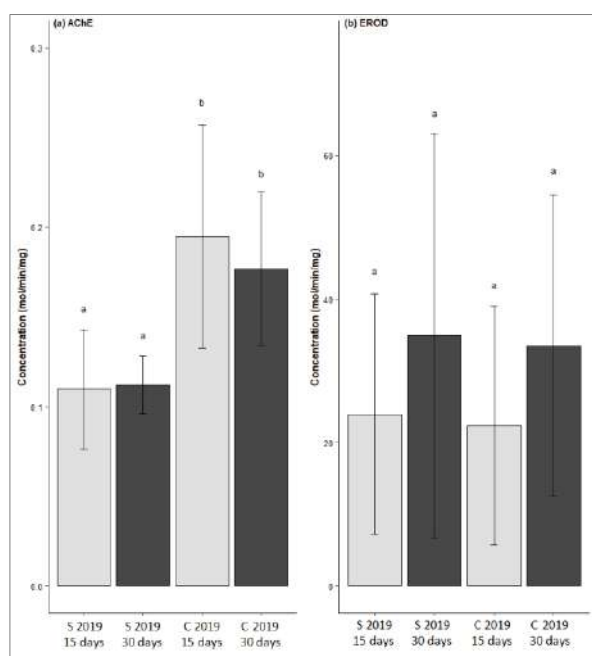


Figure 3. Mean (and 95% confidence interval) of biomarkers measured in *P. flesus* caged in Canche (C) and Seine (S) estuaries after Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire accident. (a) Acetylcholinesterase (AChE) in brain. (b) Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) in liver. (Statistics: Kruskal-Wallis test: p-value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries and days of caging).

3.4. PAHs, PCBs and PFAS in sediment

Preliminary proteomics and network analyses revealed a marked dysregulation of liver lipids and fatty acids metabolisms in fish caged in the Seine estuary, ten kilometres downstream the fire site. Thus, we decided to carry out pollutant assays in estuarine sediments. The objective was to detect an additive pollution in the Seine linked to this industrial accident, that could match the fish molecular response.

We focused our chemical analysis on organic pollutants; the levels of metallic contamination in water and sediment over the Seine estuary being not significantly increased by the accident (Fisson et al. 2020). Commonly, the assessment of water quality in industrial estuarine systems explored the levels

of classical pollutants like PAHs and PCBs. Furthermore, the fire-fighting foams used to extinguish incidents generally contain PFAS (Korzeniowski et al., 2018; Dauchy et al., 2017). We therefore measured PAHs, PCBs and PFASs in sediments, collected from the caging site itself (Table 3.).

Concentrations of PAHs ($1,175.9 \text{ ng.g}^{-1} \text{ d.w.}$), PCBs ($87.9 \text{ ng.g}^{-1} \text{ d.w.}$) and PFAS ($6.3 \text{ ng.g}^{-1} \text{ d.w.}$) in sediments sampled at the beginning of caging in November 2019 after the accident, were globally lower than those detected in the same location before the fire in 2017 (PAHs: $7,274.5 \pm 1,368.3 \text{ ng.g}^{-1} \text{ d.w.}$ / PCBs: $158.0 \pm 55.2 \text{ ng.g}^{-1} \text{ d.w.}$ / PFAS: $13.8 \pm 5.2 \text{ ng.g}^{-1} \text{ d.w.}$).

We must consider cautiously this difference, because the analysis was only conducted in one sediment sample in 2019. However, these results could suggest that one month after the accident, an additive contamination of the Seine sediment by PAHs - PCBs - PFAs could not be evidenced despite (1) the combustion of various chemical products stored in the plant and (2) the massive use of extinguishing foam.

The low contamination of the sediment of the Seine could be related to the emergency protocol implemented during the accident (POLMAR plan), which consisted in containing the contaminated water in a basin adjacent to the Seine, using floating booms, and pumping out the soiled water. We suggest that the Lubrizol fire may have led to (1) a direct contamination of water and sediment by other families of pollutants during the accident and/or (2) a diffuse contamination of the estuarine environment by the spread of the fire's smoke plume over Rouen metropole and washout in rain. Furthermore, we also suggest that the possible fluxe of PAHs - PFAs in the Seine estuary related to the LUBRIZOL fire could be moderate relatively to the usual diffuse contamination by PAHs - PFAs in this highly industrial system.

Table 3. Pollutants analysis realised on sediments samples from Canche in 2017, Seine in 2017 and Seine in 2019 after the accident in Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities. (a) Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAHs) in sediments. (b) Polychlorinated Biphenyl (PCBs) in sediments. (c) Per- and Polyfluoroalkyl Substances (PFAS) in sediments.

Pollutants	Seine 2017	Lubrizol 2019
PAHs (ng.g⁻¹ d.w.)	7,274.5 ± 1,368.3	1,175.9
Naphtalene	308.9 ± 102.5	0.7
2-methylnaphtalene	296.1 ± 42.9	NA
1-methylnaphtalene	270.7 ± 60.9	NA
Biphenyl	110.3 ± 12.5	0.5
Acenaphtylene	ND	0
Acenaphtene	64.7 ± 0.0	0
Fluorene	140.2 ± 13.5	0
Dibenzothiophene	52.5 ± 0.8	1.8
Phenanthrene	383.4 ± 69.9	23.5
Anthracene	258.8 ± 153.7	4.8
Fluoranthene	605.9 ± 87.4	77.7
2-methylfluoranthene	84.3 ± 20.5	NA
Pyrene	587.2 ± 92.5	70.3
Benzo(a)pyrene	531.4 ± 261.1	70.2
Benzo(e)pyrene	447.8 ± 176.4	74.3
Perylene	192.5 ± 80.5	14.7
Benzo(a)anthracene	436.6 ± 160.8	50.5
Dibenzo(ah)anthracene	203.2 ± 94.8	12.0
Chrysene	623.8 ± 200.8	63.4
Benzo(b)fluoranthene	525.3 ± 212.4	75.6
Benzo(k)fluoranthene	603.8 ± 295.2	NA
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	342.9 ± 158.5	73.3
Benzo(ghi)perylene	348.2 ± 155.1	66.6
PCBs (ng.g⁻¹ d.w.)	158.0 ± 55.2	87.9
PCB 28	7.8 ± 2.8	4.1
PCB 52	11.9 ± 3.2	6.9
PCB 101	16.2 ± 4.6	8.8
PCB 118	19.4 ± 4.9	11.4
PCB 153	47.8 ± 17.4	26.6
PCB 138	36.4 ± 12.6	19.7
PCB 180	18.5 ± 10.3	10.5
PFAS (ng.g⁻¹ d.w.)	13.8 ± 5.2	6.3
PFHxA	0.2 ± 0.1	0.3
PFHpA	0.1 ± 0.0	0.1
FPePA	0.2 ± 0.2	0.6
6:2 FTS	0.8 ± 0.6	0.8
PFOA	0.6 ± 0.3	0.3
PFHxS	0	0.1
PFNA	0.1 ± 0.0	0.1
6:2 FTAB	0.5 ± 0.1	0.8
8:2 FTS	1.0 ± 0.6	0.2
FOSAA	0.1 ± 0.0	0.1
PFDA	0.3 ± 0.1	0.4
L-PFOS	3.3 ± 0.7	2.4
Br-PFOS	0.4 ± 0.1	0.2
MeFOSAA	1.7 ± 0.9	0.1
EtFOSAA	4.7 ± 2.9	0.2
PFUnA	0.1 ± 0.0	0.2
10:2 FTS	0.6 ± 0.1	0.3
8:2 FTAB	0.6 ± 0.1	1.0
PFDoA	0.4 ± 0.1	0.7
PFDS	0.1 ± 0.1	0
PFTTrDA	0.1 ± 0.0	0.2
6:2 diPAP	0.1 ± 0.0	0.1
PFTeDA	0.2 ± 0.0	0.3
FOSA	0.1 ± 0.0	0
8:2 diPAP	0.5 ± 0.2	0.2
MeFOSA	0.1 ± 0.0	0
EtFOSA	0.5 ± 0.3	0

* NA, not applicable - ND, not detectable

3.5. Dioxins and furans in runoff water and sewage sludge

We decided to deepen our research in the possible chemical contamination of the aquatic environment by the Lubrizol accident, considering measures conducted by the Rouen wastewater treatment plant (RWWTP).

Assays performed by the RWWTP revealed a significant increase of dioxins and furans contamination in water and sewage sludge following the Lubrizol fire (Table 4). Thus, the raw water entering the plant is polluted by dioxins, in particular Octachlorodibenzodioxin (OCDD) and Heptachlorodibenzo-p-dioxin (HPCDD). At the beginning of October, one week after the fire, raw water dioxin concentrations were 0.03 ng.L⁻¹. A recovery was observed in mid-December 2019, with a dioxin concentration of 0.007 ng.L⁻¹. Concerning sludge produced by the RWWTP, measures also revealed high levels of dioxins and particularly of furans, mainly Tetrachlorodibenzofuran (TCDF), Pentachlorodibenzofuran (PeCDF) and Hexachlorodibenzofuran (HXCDF). In early October, the sludge showed a dioxins & furans concentration of 190 ng.kg⁻¹ (d.w.). A return to routine values was observed in mid-December 2019, with a dioxins & furans concentration of 7.7 ng.kg⁻¹ (d.w.).

Table 4. Pollutants analysis carried out on raw water and sewage sludge by the Rouen wastewater treatment plant, after the Lubrizol accident in September 2019.

Wastewater treatment plant 24-hour average	October 2019	November 2019	December 2019
Raw water samples			
Dioxins (ng.L ⁻¹)	0.03	NA	0.007
OCDD and HPCDD*			
Sewage sludge samples			
Dioxins and furans (ng.kg ⁻¹ d.w.)	190	15	7.7
TCDF, PeCDF and HXCDF**			

*Dioxins: Octachlorodibenzodioxine (OCDD) and Heptachlorodibenzo-p-dioxin (HPCDD)

**Furans: Tetrachlorodibenzofurane (TCDF), Pentachlorodibenzofurane (PeCDF) and Hexachlorodibenzofuran (HXCDF)

3.6. Interpretation of fish molecular responses based on chemical assays

Liver proteomic analysis conducted on flounders caged in Seine vs Canche after the Lubrizol industrial accident revealed a severe dysregulation of lipid metabolism, particularly cholesterol; this trend was reinforced by the specific assays identifying a global increased production of lipids in the fish muscle. The induction of cholesterol synthesis was also accompanied by a marked dysregulation of the metabolism of fatty acids. Molecular analysis also revealed a shift in sugar metabolism towards NADPH synthesis to support lipid and fatty acid synthesis. Finally, proteomics showed dysregulation of the PPAR signalling pathway, linked to the presence of xenobiotics released during the fire at the Lubrizol plants. However, we observed a weak induction of phase I detoxification mechanisms (MFO type), confirmed by EROD activity assays which showed no significant difference between Seine vs. Canche. Furthermore, levels of pollutants such as PAHs and PCBs detected in the Seine sediment

after the accident were lower than in a previous study (Borcier et al., 2019). No increase of the PFAS levels in sediment was observed in the sediment, despite the use of extinction foam to extinguish the fire at the Lubrizol site. In contrast, measurements performed by the Rouen Waste Water Treatment Plant revealed a significant increase of dioxins and furans contamination in raw water and sewage sludge. Different studies highlighted that dioxins and furans in polluted rivers and estuaries are not increasing EROD activity or cytochrome P450 1A1 expression in fish liver (Orrego et al., 2005; Yuan et al., 2001). On the other hand, in the present study, we suggest that the significant inhibition of AChE activity in fish caged after the accident could be explained by the aquatic contamination of water and sediment by dioxins and furans which showed neurotoxic effects (Sengupta, 2004).

Accidental fires can generate emissions of persistent organic pollutants (POPs), such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), as a result of the combustion of the various materials involved, the nature of the fire and the environmental conditions (De Filippis et al., 2022; Zang et al., 2016). Thus, considering the main results of the present study, we suggest that the Lubrizol produced air borne dioxins and furans largely dispersed over the Rouen city; the dioxins most present being OCDD and HPCDD. Dioxins are known to impair liver functions during short-term exposure (Sengupta, 2004). In the case of chronic exposure, these dioxins can cause alterations to the immune system, the nervous system and reproductive function, which can lead to cancer (Helal et al., 2022; King-Heiden et al., 2013). Dioxins increase the relative weight of the liver, leading to a significant increase in all liver biomarker levels (glucose, cholesterol, triglycerides) (Helal et al., 2022). Furans concentrations also increased in the Seine following the fire, particularly TCDF, PeCDF and HXCDF. Despite many years of intensive research, the mechanisms by which dioxins and furans induce toxicity are not fully understood, but dioxins and furans toxicity is probably not secondary to CYP1A induction, as originally thought, and other genes are involved (King-Heiden et al., 2013).

Due to their structural stability, dioxins and furans persist in the environment for a long time, and can be transported over long distances from their emission sources. Thus, after air dispersion, dioxins and furans get deposited on soil; these molecules may subsequently enter the aquatic environment via runoff. Dioxins and furans deposited in aquatic environment will adsorb strongly to particulate organic carbon suspended in the water column; they tend to rapidly redistribute to bottom sediments by settling out (Gatehouse, 2004).

In aquatic ecosystems, uptake of dioxins in food is the most important source of exposure, the uptake from water via gill and skins being weak owing their low aqueous solubility (Gatehouse, 2004).

We therefore hypothesize that the flounders caged in the Seine after the Lubrizol fire were particularly contaminated by their diet, considering their major food in the cage: amphipods. This family of

invertebrates accumulates particularly high concentrations of dioxins and furans in the field (Ruus et al., 2006) and displays a reduced sensitivity to the toxic effects of dioxins (Barber et al., 1998).

The mechanisms of dioxin and furan toxicity in natura are still poorly understood, and further studies are needed (Jeno et al., 2021). Dioxins and furans are highly hydrophobic and have a high affinity for the lipid macromolecules of exposed organisms, which reinforces their toxicity (Geyer et al., 1993). Dioxins modify lipid metabolism by affecting the activity of certain key enzymes in fatty acid biosynthesis, triacylglycerol and cholesterol levels in dioxin-exposed microorganisms, animals, plants and humans (Mahfouz et al., 2020; Hanano et al., 2014). In the present study, the aquatic contamination by dioxins and furans resulting from the Lubrizol fire may therefore explain the deregulation of lipid metabolism in flounder detected by proteomics.

4. Conclusion

All the analyses and experiments carried out by various laboratories in the weeks following the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire, on water and sediment chemistry, bioassays and biomarkers, showed reduced toxicity. The report by Fisson et al (2020) assessing the impact of the fire on the Seine estuary revealed no obvious pollution by the chemicals conventionally measured, nor any significant response to pollution by shrimps (*Palaemon longirostris*) caged in the estuary. These post-accident studies were necessary, but finally showed little or no impact of the accident on aquatic organisms in the Seine estuary outside the bassin aux bois, in the very short term. We have therefore decided to conduct this new study on flounder in Rouen, comparing our current results with those obtained in 2017 by Borcier et al. (2019).

The present study, coupling flounder caging and proteomics, yielded a new vision on the impact of this industrial accident on the aquatic ecosystem, integrating fish response after a mid-term exposure. Molecular analyses on the flounder without *a priori* appeared to be an effective strategy to explore the multiple metabolic pathways affected by the pollutants, during and after an accidental pollution. In this study, the diffuse pollution by dioxins and furans in the Seine estuary, which contaminated fish food had probably the major impact on fish metabolism, particularly causing lipid dysregulation. On the other hand, the impact of the point source pollution from the fire site directly discharged into the Seine in the days following the accident seems to have been relatively weak.

5. Acknowledgments

This work was funded by the GIP Seine Aval and was also supported by ISblue project, Interdisciplinary graduate school for the blue planet: ANR-17-EURE-0015, and co-funded by a grant from the French government under the program “Investissements d’Avenir”.

Many thanks to Métropole Rouen Normandie - Direction de l’Assainissement for providing us with a summary of the results of sediment sampling in the Seine and measurements at the Emeraude WWTP.

We also warmly thank J.-C. Gaillard for help with proteomics measurements.

This work also benefited from the French GDR EA, “Aquatic Ecotoxicology”, framework that aims at fostering scientific discussions and collaborations for more integrative approaches.

6. References

- Aarnio, K. (2000). Experimental evidence of predation by juvenile flounder, *Platichthys flesus*, on a shallow water meiobenthic community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 246(1), 125–138. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00175-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00175-6)
- Aarnio, K., Bonsdorff, E., & Rosenback, N. (1996). Food and feeding habits of juvenile flounder *Platichthys flesus* (L.), and turbot *Scophthalmus maximus* L. in the åland archipelago, northern Baltic Sea. *Journal of Sea Research*, 36(3–4), 311–320. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(96\)90798-4](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(96)90798-4)
- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, 19(5), 557-566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>
- Bahamonde, P. A., Feswick, A., Isaacs, M. A., Munkittrick, K. R., & Martyniuk, C. J. (2016). Defining the role of omics in assessing ecosystem health: Perspectives from the Canadian environmental monitoring program. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 35(1), 20–35. Wiley Blackwell. <https://doi.org/10.1002/etc.3218>
- Barber, T. R., Chappie, D. J., Duda, D. J., Fuchsman, P. C., & Finley, B. L. (1998). Using a spiked sediment bioassay to establish a no-effect concentration for dioxin exposure to the amphipod *Ampelisca abdita*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(3), 420-424. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170311>
- Barhoumi, B., Clérandeau, C., Gourves, P. Y., Le Menach, K., El Megdiche, Y., Peluhet, L., Budzinski, H., Baudrimont, M., Driss, M. R., & Cachot, J. (2014). Pollution biomonitoring in the Bizerte lagoon (Tunisia), using combined chemical and biomarker analyses in grass goby, *Zosterisessor ophiocephalus* (Teleostei, Gobiidae). *Marine environmental research*, 101, 184-195. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.07.002>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133760>
- Borcier, E., Charrier, G., Amérand, A., Théron, M., Loizeau, V., Pédrón, N., & Laroche, J. (2016). Bioenergetic transcriptomic responses of European flounder (*Platichthys flesus*) populations in contrasted environments: Impacts of pollution and global warming. *Journal of Xenobiotics*, 6(2 2Special Issue), 28–32. <https://doi.org/10.4081/xeno.2016.6586>
- Borcier, E., Charrier, G., Couteau, J., Maillet, G., le Grand, F., Bideau, A., Waeles, M., le Floch, S., Amara, R., Pichereau, V., & Laroche, J. (2020). An Integrated Biomarker Approach Using Flounder to Improve Chemical Risk Assessments in the Heavily Polluted Seine Estuary. *Journal of Xenobiotics*, 10(2), 14–35. <https://doi.org/10.3390/jox10020004>
- Bouillon, C., & Adam, D. (2020). Rapport d’information sur l’incendie d’un site industriel à Rouen. Rapport N°2689 de l’Assemblée Nationale.

- Burke, M. D., & Mayer, R. T. (1974). Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*, 2(6), 583–588. <https://europepmc.org/article/med/4155680>
- Cheng, X., & Klaassen, C. D. (2008). Perfluorocarboxylic acids induce cytochrome P450 enzymes in mouse liver through activation of PPAR- α and CAR transcription factors. *Toxicological Sciences*, 106(1), 29–36. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfn147>
- Chiffolleau, J.-F. (2017). La contamination chimique sur le littoral Loire-Bretagne. Résultats de 35 années de suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00405/51617/>
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics*, 21(18), 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti610>.
- Currie, R. S., Fairchild, W. L., Holoka, M. H., & Muir, D. C. (2000). Long-term fate and bioavailability of sediment-associated 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzofuran in littoral enclosures. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 19(6), 1491–1500. <https://doi.org/10.1002/etc.5620190604>
- Dabrowska, H., Kopko, O., Lehtonen, K. K., Lang, T., Waszak, I., Balode, M., & Strode, E. (2017). An integrated assessment of pollution and biological effects in flounder, mussels and sediment in the southern Baltic Sea coastal area. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(4), 3626–3639. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8117-8>
- Dando, P. R. (2011). Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Marine Ecology Progress Series*, 430, 183–196. <https://doi.org/10.3354/MEPS09116>
- Dauchy, X., Boiteux, V., Bach, C., Rosin, C., & Munoz, J. F. (2017). Per- and polyfluoroalkyl substances in firefighting foam concentrates and water samples collected near sites impacted by the use of these foams. *Chemosphere*, 183, 53–61. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.056>
- De Filippis, S. P., Abate, V., De Luca, S., Fulgenzi, A. R., Iacovella, N., Iamiceli, A. L., Ingelido, A. M., Settimo, G., Soggiu, M. E., & De Felip, E. (2022). Human Exposure to Dioxins and Other Contaminants Following an Accidental Fire at the Fiumicino Airport (Italy): A Public Health Response. *Atmosphere*, 13(12), 2058. <https://doi.org/10.3390/atmos13122058>
- Defo, M. A., Mercier, L., Beauvais, C., Brua, R. B., Tétreault, G., Fontaine, A., Couture, P., Verreault, J., & Houde, M. (2021). Time-dependent biological responses of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) exposed in situ to a major urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112483>
- Desvergne, B., Feige, J. N., & Casals-Casas, C. (2009). PPAR-mediated activity of phthalates: a link to the obesity epidemic?. *Molecular and cellular endocrinology*, 304(1-2), 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.017>
- Diop, M., Couteau, J., Bado-Nilles, A., Tavernier, E., Ouddane, B., Denis, J., Duong, G., Gevaert, F., Monchy, S., Laroche, J., & Amara, R. (2022). Bioaccumulation of trace metal elements and biomarker responses in caged juvenile flounder at a polluted site: Effects of fish density and time exposure. *Marine Pollution Bulletin*, 185, 114289. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2022.114289>
- Dupuy, C., Galland, C., Pichereau, V., Sanchez, W., Riso, R., Labonne, M., Amara, R., Charrier, G., Fournier, M., & Laroche, J. (2015). Assessment of the European flounder responses to chemical stress in the English Channel, considering biomarkers and life history traits. *Marine Pollution Bulletin*, 95(2), 634–645. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.033>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7(2), 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- European Commission. (2012). Directive 2012/18/EU of the European Parliament and of the Council of 4 July 2012 on the control of major-accident hazards involving dangerous substances, amending and subsequently repealing Council Directive 96/82/EC.
- Evans, N., Conley, J. M., Cardon, M., Hartig, P., Medlock-Kakaley, E., & Gray Jr, L. E. (2022). In vitro activity of a panel of per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS), fatty acids, and pharmaceuticals in peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha, PPAR gamma, and estrogen receptor assays. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 449, 116136. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116136>
- Feige, J. N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Métivier, R., Tudor, C., Anghel, S. I., Grosdidier, A., Lathion, C., Engelborghs, Y., Michielin, O., Wahli, W. & Desvergne, B. (2007). The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator that promotes adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 19152–19166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702724200>

- Folch, J., Lees, M., & Sloane, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Fisson, C., Aït-Aïssa, S., & Amara, R. (2020). Incendie du 26 septembre 2019 des installations «Lubrizon/NL-Logistique»: Quel impact sur la Seine. *Rapport d'étude réalisé par le GIP Seine-Aval*.
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2013). Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *Journal of Sea Research*, 75, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.05.009>
- Galland, C., Dupuy, C., Loizeau, V., Danion, M., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2015). Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH–PCB contamination. *Marine pollution bulletin*, 95(2), 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.038>
- Gatehouse, R. (2004). Ecological Risk Assessment of Dioxins in Australia. *National Dioxins Program - Technical Report*, 11. ISBN 0 642 55003 4
- Geyer, H. J., Schheunert, I., Rapp, K., Gebefugi, I., Steinberg, C., & Kettrup, A. (1993). The relevance of fat content in toxicity of lipophilic chemicals to terrestrial animals with special reference to dieldrin and 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Ecotoxicology and environmental safety*, 26(1), 45–60. <https://doi.org/10.1006/eesa.1993.1040>
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Geffard, O., & Armengaud, J. (2019). Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of Proteomics*, 198, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001>
- Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D. M., Kanno, J., Iguchi, T., & Blumberg, B. (2006). Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Molecular endocrinology*, 20(9), 2141–2155. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0367>
- Hanano, A., Almously, I., & Shaban, M. (2014). Phytotoxicity effects and biological responses of *Arabidopsis thaliana* to 2, 3, 7, 8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin exposure. *Chemosphere*, 104, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.060>
- Hanano, A., Shaban, M., Almutk, D., & Almously, I. (2019). The cytochrome P450BM-1 of *Bacillus megaterium* A14K is induced by 2, 3, 7, 8-Tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin: Biophysical, molecular and biochemical determinants. *Chemosphere*, 216, 258–270. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.10.103>
- Helal, M., Ghanem, S., & El-Sikaily, A. (2022). Impact of PCBs, Furan and Dioxin on Hepatocarcinogenesis. In *Persistent Organic Pollutants (POPs)-Monitoring, Impact and Treatment*. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101526>
- Jeffrey, J. D., Jeffries, K. M., & Suski, C. D. (2019). Physiological status of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in the Illinois River: An assessment of fish at the leading edge of the invasion front. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 32, 100614. <https://doi.org/10.1016/J.CBD.2019.100614>
- Jeno, J. G. A., Rathna, R., & Nakkeeran, E. (2021). Biological Implications of Dioxins/Furans Bioaccumulation in Ecosystems. *Environmental Pollution and Remediation*, 395–420. https://doi.org/10.1007/978-981-15-5499-5_14
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., & Amara, R. (2013). A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere*, 91(4), 498–505. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2012.12.010>
- Khan, F. I., & Abbasi, S. A. (1997). Accident hazard index: a multi-attribute method for process industry hazard rating. *Process Safety and Environmental Protection*, 75(4), 217–224. <https://doi.org/10.1205/095758297529093>
- King-Heiden, T. C., Mehta, V., Xiong, K. M., Lanham, K. A., Antkiewicz, D. S., Ganser, A., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2012). Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Molecular and cellular endocrinology*, 354(1-2), 121–138. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.027>
- Korzeniowski, S. H., Buck, R. C., Kempisty, D. M., & Pabon, M. (2018). Fluorosurfactants in firefighting foams: past and present. *Perfluoroalkyl Substances in the Environment*, *CRC Press.*, 3–34. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220126>
- Lacroix, C., le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., & Guyomarch, J. (2014). Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *Journal of Chromatography A*, 1349, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.04.094>

- Laurent, J., Lavergne, E., Couteau, J., le Floch, S., Ouddane, B., Cachot, J., Davail, B., Clérandeau, C., Devin, S., Fisson, C., Devaux, A., Amara, R., Diop, M., Pichereau, V., & Laroche, J. (2022). Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(39), 59751–59769. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20000-y>
- Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Kailasam, S., Couteau, J., Waeles, M., Le Floch, S., Laroche, J., & Pichereau, V. (2023). Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France. *Science of The Total Environment*, 878, 163195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163195>
- Laroche, J., Gauthier, O., Quiniou, L., Devaux, A., Bony, S., Evrard, E., Cachot, J., Chérel, Y., Larcher, T., Riso, R., Pichereau, V., Devier, M. H., & Budzinski, H. (2013). Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 738-748. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1276-3>
- Lee, Y. S., Lim, J. E., Lee, S., & Moon, H. B. (2020). Phthalates and non-phthalate plasticizers in sediment from Korean coastal waters: Occurrence, spatial distribution, and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111119. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111119>
- Li, Q., Zhang, H., Zou, J., Mai, H., Su, D., Feng, X., & Feng, D. (2019). Bisphenol A exposure induces cholesterol synthesis and hepatic steatosis in C57BL/6 mice by down-regulating the DNA methylation levels of SREBP-2. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110786. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110786>
- Marchand, J., Tanguy, A., Laroche, J., Quiniou, L., & Moraga, D. (2003). Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Marine Ecology Progress Series*, 260, 273-284. <https://doi.org/10.3354/meps260273>
- Marchand, J., Quiniou, L., & Laroche, J. (2013). Relationships between genotypes and phenotypes in natural populations of the European flounder (*Platichthys flesus*) under different types of contamination in estuaries. *Journal of Xenobiotics*, 3(s1), e14. <https://doi.org/10.4081/xeno.2013.s1.e14>
- Martyniuk, C. J., Mehinto, A. C., & Denslow, N. D. (2020). Organochlorine pesticides: Agrochemicals with potent endocrine-disrupting properties in fish. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 507, 110764. <https://doi.org/10.1016/J.MCE.2020.110764>
- Mahfouz, S., Mansour, G., Murphy, D. J., & Hanano, A. (2020). Dioxin impacts on lipid metabolism of soil microbes: towards effective detection and bioassessment strategies. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00347-1>
- Mikolajczyk, S., Warenik-Bany, M., Maszewski, S., & Pajurek, M. (2020). Dioxins and PCBs—Environment impact on freshwater fish contamination and risk to consumers. *Environmental Pollution*, 263, 114611. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114611>
- Nagaraju, R., Joshi, A. K., Vamadeva, S. G., & Rajini, P. S. (2020). Deregulation of hepatic lipid metabolism associated with insulin resistance in rats subjected to chronic monocrotophos exposure. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 34(8), e22506.
- Nakata, H., Sakai, Y., Miyawaki, T., & Takemura, A. (2003). Bioaccumulation and toxic potencies of polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in tidal flat and coastal ecosystems of the Ariake Sea, Japan. *Environmental science & technology*, 37(16), 3513-3521. <https://doi.org/10.1021/es021083h>
- Orrego, R., Jimenez, B., Bordajandi, L.R., Gavila, J.F., Inzunza, B., Abad, E., Gonzalez, M.J., Rivera, J., Barra, R. (2005). EROD induction and PCDD/F levels in fish liver from the Biobio River in Chile. *Chemosphere*, 60(7), 829-835.
- Pédrón, N., Artigaud, S., Infante, J. L. Z., Le Bayon, N., Charrier, G., Pichereau, V., & Laroche, J. (2017a). Proteomic responses of European flounder to temperature and hypoxia as interacting stressors: differential sensitivities of populations. *Science of the Total Environment*, 586, 890–899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.068>
- Pédrón, N., Le Du, J., Charrier, G., Zambonino-Infante, J. L., Le Bayon, N., Vasconcelos, R. P., Fonseca, V. F., Le Grand, F., & Laroche, J. (2017b). Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Marine environmental research*, 129, 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.06.010>
- Powell, S., Forslund, K., Szklarczyk, D., Trachana, K., Roth, A., Huerta-Cepas, J., Gabaldón, T., Rattei, T., Creevey, C., Kuhn, M., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2014. eggNOG v4. 0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D231–D239. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1253>
- Price, E. R., Bonatesta, F., McGruer, V., Schlenk, D., Roberts, A. P., & Mager, E. M. (2022). Exposure of zebrafish larvae to water accommodated fractions of weathered crude oil alters steroid hormone concentrations with minimal effect on cholesterol. *Aquatic Toxicology*, 242, 106045. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106045>

- Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., & Hue, L. (2004). 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. *Biochemical Journal*, 381(3), 561-579.
- Rodríguez-Jorquera, I. A., Colli-Dula, R. C., Kroll, K., Jayasinghe, B. S., Parachu Marco, M. V., Silva-Sanchez, C., ... & Denslow, N. D. (2018). Blood transcriptomics analysis of fish exposed to perfluoro alkyls substances: assessment of a non-lethal sampling technique for advancing aquatic toxicology research. *Environmental science & technology*, 53(3), 1441-1452.
- Ruus, A., Berge, J.A., Bergstad, O.A., Knutsen, J.A., Hylland, K. (2006). Disposition of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in two Norwegian epibenthic marine food webs. *Chemosphere*, 62, 1856-1868.
- Santana, M. S., Sandrini-Neto, L., Neto, F. F., Ribeiro, C. A. O., Di Domenico, M., & Prodocimo, M. M. (2018). Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): systematic review and meta-analysis. *Environmental pollution*, 242, 449-461. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.004>
- Schückel, S., Sell, A. F., Kihara, T. C., Koeppen, A., Kröncke, I., & Reiss, H. (2013). Meiofauna as food source for small-sized demersal fish in the southern North Sea. *Helgoland Marine Research*, 67(2), 203–218. <https://doi.org/10.1007/S10152-012-0316-1/FIGURES/3>
- SDIS-76. (2019). Audition parlementaire – fiches thématiques consolidées. 90.
- Sengupta, B. (2004). Dioxin (PCDDs) And Furan(PCDFs). Central Pollution Control Board Ministry Of Environment & Forests, *Parivesh Newsletter*. www.cpcb.nic.in
- Shrivastava, A., & Gupta, V. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles of Young Scientists*, 2(1), 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>
- Simmonet-Laprade, C., Budzinski, H., Babut, M., le Menach, K., Munoz, G., Lauzent, M., Ferrari, B. J. D., & Labadie, P. (2019). Investigation of the spatial variability of poly- and perfluoroalkyl substance trophic magnification in selected riverine ecosystems. *Science of The Total Environment*, 686, 393–401. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.05.461>
- Sørhus, E., Incardona, J. P., Furmanek, T., Goetz, G. W., Scholz, N. L., Meier, S., Edvardsen, R. B. & Jentoft, S. (2017). Novel adverse outcome pathways revealed by chemical genetics in a developing marine fish. *elife*, 6, e20707. <https://doi.org/10.7554/eLife.20707>
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C.V., 2019. STRING v11:protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47 (D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Tetreault, G. R., Kleywegt, S., Marjan, P., Bragg, L., Arlos, M., Fuzzen, M., Smith, B., Moon, T., Massarsky, A., Metcalfe, C., Oakes, K., McMaster, M. E., & Servos, M. R. (2021). Biological responses in fish exposed to municipal wastewater treatment plant effluent in situ. *Water Quality Research Journal*, 56(2), 83–99. <https://doi.org/10.2166/WQRJ.2021.031>
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vincze, K., Scheil, V., Kuch, B., Köhler, H. R., & Triebkorn, R. (2015). Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(15), 11822–11839. <https://doi.org/10.1007/S11356-015-4398-6/TABLES/3>
- Whitlock Jr, J. P. (1999). Induction of cytochrome P4501A1. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 39(1), 103-125. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.103>
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology*, 30(4), 347-570. <https://doi.org/10.1080/10408440091159239>
- Williams, T. D., Davies, I. M., Wu, H., Diab, A. M., Webster, L., Viant, M. R., Chipman, J. K., Leaver, M. J., George, S. G., Moffat, C. F., & Robinson, C. D. (2014). Molecular responses of European flounder (*Platichthys flesus*) chronically exposed to contaminated estuarine sediments. *Chemosphere*, 108, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.028>

- Xie, H. Q., Xu, T., Chen, Y., Li, Y., Xia, Y., Xu, S. L., Wang, L., Tsim, K. W. K. & Zhao, B. (2016). New perspectives for multi-level regulations of neuronal acetylcholinesterase by dioxins. *Chemico-biological interactions*, 259, 286-290. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.030>
- Xu, E. G., Khursigara, A. J., Li, S., Esbaugh, A. J., Dasgupta, S., Volz, D. C., & Schlenk, D. (2019). mRNA-miRNA-Seq reveals neuro-cardio mechanisms of crude oil toxicity in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Environmental science & technology*, 53(6), 3296-3305. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00150>
- Xu, E. G., Mager, E. M., Grosell, M., Pasparakis, C., Schlenker, L. S., Stieglitz, J. D., Benetti, D., Hazard, E.S., Courtney, S.M., Diamante, G., Freitas, J., Hardima, G. & Schlenk, D. (2016). Time-and oil-dependent transcriptomic and physiological responses to Deepwater Horizon oil in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) embryos and larvae. *Environmental Science & Technology*, 50(14), 7842-7851. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02205>
- Xu, H. M., Xie, H. Q., Tao, W. Q., Zhou, Z. G., Li, S. Z., & Zhao, B. (2014). Dioxin and dioxin-like compounds suppress acetylcholinesterase activity via transcriptional downregulations in vitro. *Journal of Molecular Neuroscience*, 53, 417-423. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0167-5>
- Yan, S., Wang, J., & Dai, J. (2015). Activation of sterol regulatory element-binding proteins in mice exposed to perfluorooctanoic acid for 28 days. *Archives of toxicology*, 89(9), 1569-1578. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1322-7>
- Yuan, Z., Wirgin, M., Courtenay, S., Fkonomou, M., Wirgin, I. (2001). Is hepatic cytochrome P4501A1 expression predictive of hepatic burdens of dioxins, furans, and PCBs in Atlantic tomcod from the Hudson River estuary? *Aquatic Toxicology*, 54, 217-230.
- Zhang, M., Buekens, A., & Li, X. (2016). Brominated flame retardants and the formation of dioxins and furans in fires and combustion. *Journal of hazardous materials*, 304, 26-39. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2015.10.014>

Supplementary data

Table S1. Samples description from Seine and Canche estuaries.

Estuaries	SEINE	CANCHE
Sampling date	09/11/2019	09/11/2019
Sampling method	Beam trawl	Beam trawl
Sampling location	Canche estuary	Canche estuary
Start of caging	13/11/2019	15/11/2019
End of caging	12/12/2019	13/12/2019
Caging location	49°23'0.37"N, 01°00'42.26"E	50°30'31"N 1°39'02"E
Fish Condition Factor	1.11 ± 0.08	0.97 ± 0.10

Table S2. KEGG pathways of deregulated proteins in *P. flesus* liver from Canche and Seine estuaries after Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire accident.

Estuaries	Term ID	Term Description	Gene Count	False Discovery Rate
Seine vs Canche Proteins up-regulated 15 days of caging	dre01100	Metabolic pathways	30	8.46e-14
	dre01212	Fatty acid metabolism	7	5.03e-07
	dre00900	Terpenoid backbone biosynthesis	5	9.41e-07
	dre03320	PPAR signaling pathway	6	1.83e-05
	dre00061	Fatty acid biosynthesis	4	3.65e-05
	dre00100	Steroid biosynthesis	4	3.65e-05
	dre00640	Propanoate metabolism	4	0.00010
	dre00620	Pyruvate metabolism	4	0.00022
	dre00071	Fatty acid degradation	4	0.00050
	dre00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	4	0.00050
	dre00330	Arginine and proline metabolism	4	0.00077
	dre03060	Protein export	3	0.00081
	dre00650	Butanoate metabolism	3	0.00094
	dre00072	Synthesis and degradation of ketone bodies	2	0.0058
	dre00380	Tryptophan metabolism	3	0.0065
	dre00310	Lysine degradation	3	0.0172
	dre03015	mRNA surveillance pathway	3	0.0322
	dre04146	Peroxisome	3	0.0322
	dre00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	0.0441
	dre01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	2	0.0443
dre00053	Ascorbate and aldarate metabolism	2	0.0445	
Seine vs Canche Proteins down-regulated 15 days of caging	dre04142	Lysosome	6	0.00073
	dre03040	Spliceosome	5	0.0021
	dre01100	Metabolic pathways	14	0.0032
	dre04910	Insulin signaling pathway	5	0.0032
	dre00500	Starch and sucrose metabolism	3	0.0042
	dre04210	Apoptosis	4	0.0330
Seine vs Canche Proteins up-regulated 30 days of caging	dre01100	Metabolic pathways	26	4.30e-11
	dre00100	Steroid biosynthesis	6	1.16e-08
	dre00900	Terpenoid backbone biosynthesis	4	4.45e-05
	dre01212	Fatty acid metabolism	4	0.0032
	dre03320	PPAR signaling pathway	4	0.0045
	dre00072	Synthesis and degradation of ketone bodies	2	0.0116
	dre00280	Valine, leucine and isoleucine degradation	3	0.0120
	dre01200	Carbon metabolism	4	0.0120
	dre00650	Butanoate metabolism	2	0.0406
dre04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	4	0.0406	
Seine vs Canche Proteins down-regulated 30 days of caging	dre01100	Metabolic pathways	11	0.0027
	dre04512	ECM-receptor interaction	3	0.03

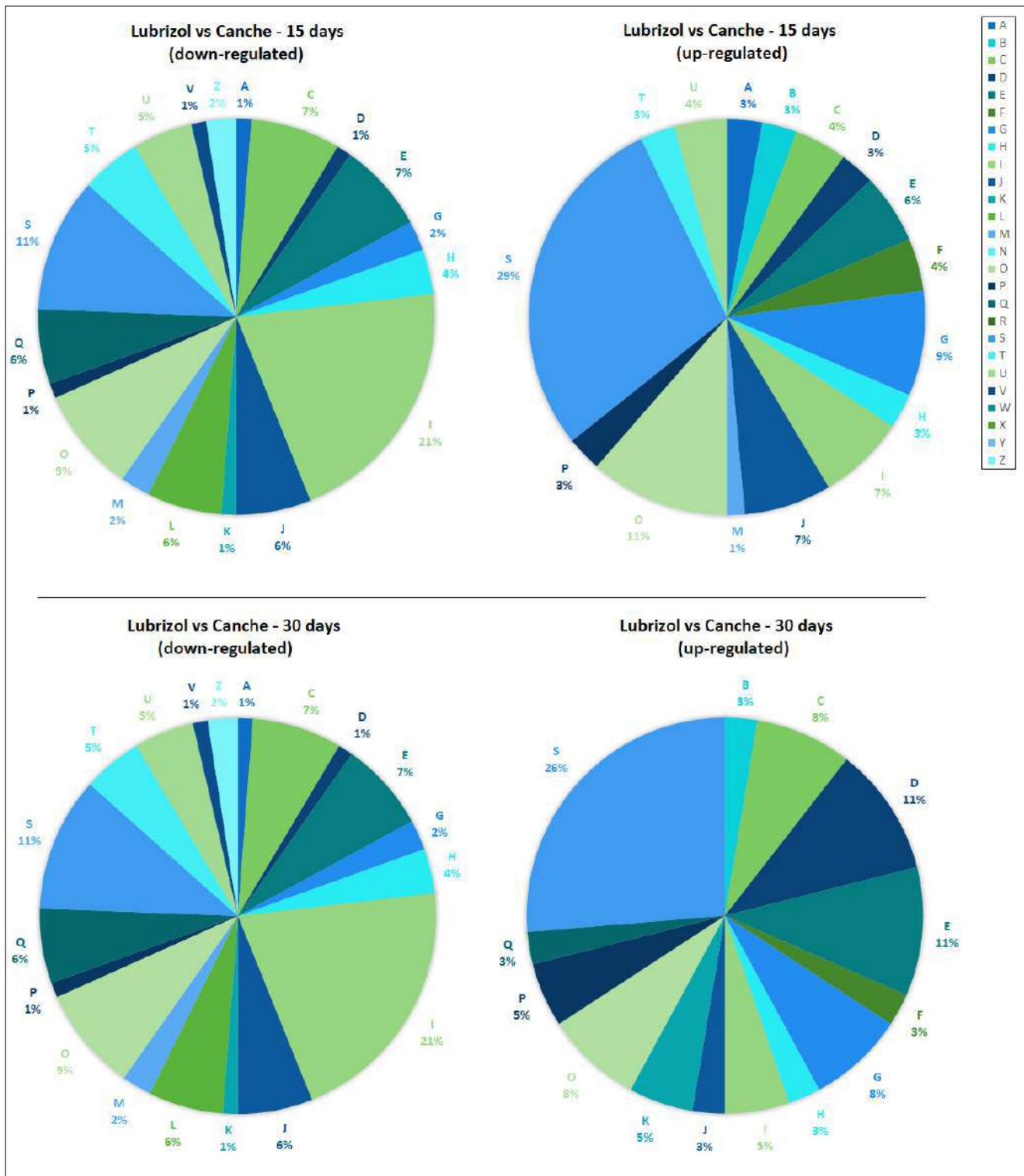


Figure S1.

Figure S1. Pie charts representing the main Clusters of Orthologous Group (COG) categories that are up-regulated and down-regulated in livers of *P. flesus* sampled in Seine estuary (Rouen) after Lubrizon and NORMANDIE-Logistique fire compared to the Canche estuary. (A) RNA processing and modification; (B) Chromatin Structure and dynamics; (C) Energy production and conversion; (D) Cell cycle control and mitosis; (E) Amino Acid metabolism and transport; (F) Nucleotide metabolism and transport; (G) Carbohydrate metabolism and transport; (H) Coenzyme metabolism; (I) Lipid metabolism; (J) Translation; (K) Transcription; (L) Replication and repair; (M) Cell wall/membrane/envelop biogenesis; (N) Cell motility; (O) Post-translational modification, protein turnover, chaperone functions; (P) Inorganic ion transport and metabolism; (Q) Secondary Structure; (R) General Functional Prediction only; (S)Function Unknown ; (T) Signal Transduction; (U) Intracellular trafficking and secretion; (Y) Nuclear structure; (Z) Cytoskeleton.

5. Références

- Amara R., Laroche J., Couteau J., Xuereb B., Pichereau V., Diop M. (2020). Biomonitoring actif (engagement de flets et de crevettes) pour le suivi de l'impact de l'incendie du 26 septembre 2019 des installations « Lubrizol / NL Logistique ». *Rapport de recherche réalisé pour le GIP Seine-Aval*, 34
- Ahmadian, M., Suh, J. M., Hah, N., Liddle, C., Atkins, A. R., Downes, M., & Evans, R. M. (2013). PPAR γ signaling and metabolism: the good, the bad and the future. *Nature medicine*, 19(5), 557-566. <https://doi.org/10.1038/nm.3159>
- Barber, T. R., Chappie, D. J., Duda, D. J., Fuchsman, P. C., & Finley, B. L. (1998). Using a spiked sediment bioassay to establish a no-effect concentration for dioxin exposure to the amphipod *Ampelisca abdita*. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 17(3), 420-424. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170311>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133760>
- Bouillon, C., & Adam, D. (2020). Rapport d'information sur l'incendie d'un site industriel à Rouen. Rapport N°2689 de l'Assemblée Nationale.
- Desvergne, B., Feige, J. N., & Casals-Casas, C. (2009). PPAR-mediated activity of phthalates: a link to the obesity epidemic?. *Molecular and cellular endocrinology*, 304(1-2), 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2009.02.017>
- Feige, J. N., Gelman, L., Rossi, D., Zoete, V., Métivier, R., Tudor, C., Anghel, S. I., Grosdidier, A., Lathion, C., Engelborghs, Y., Michielin, O., Wahli, W. & Desvergne, B. (2007). The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulator that promotes adipogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 282(26), 19152-19166. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702724200>
- Fisson, C., Aït-Aïssa, S., & Amara, R. (2020). Incendie du 26 septembre 2019 des installations «Lubrizol/NL-Logistique»: Quel impact sur la Seine. *Rapport d'étude réalisé par le GIP Seine-Aval*.
- Galland, C., Dupuy, C., Loizeau, V., Danion, M., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2015). Proteomic analysis of the European flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH-PCB contamination. *Marine pollution bulletin*, 95(2), 646-657. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.038>
- Gatehouse, R. (2004). Ecological Risk Assessment of Dioxins in Australia. *National Dioxins Program - Technical Report*, 11. ISBN 0 642 55003 4
- Girin, M., 2007. Ecological monitoring of accidental water pollution. *Operational Guide, Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution (Cedre)*, 37.
- Grün, F., Watanabe, H., Zamanian, Z., Maeda, L., Arima, K., Cubacha, R., Gardiner, D. M., Kanno, J., Iguchi, T., & Blumberg, B. (2006). Endocrine-disrupting organotin compounds are potent inducers of adipogenesis in vertebrates. *Molecular endocrinology*, 20(9), 2141-2155. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0367>
- Hanano, A., Almously, I., & Shaban, M. (2014). Phytotoxicity effects and biological responses of *Arabidopsis thaliana* to 2, 3, 7, 8-tetrachlorinated dibenzo-p-dioxin exposure. *Chemosphere*, 104, 76-84. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.060>
- Helal, M., Ghanem, S., & El-Sikaily, A. (2022). Impact of PCBs, Furan and Dioxin on Hepatocarcinogenesis. In Persistent Organic Pollutants (POPs)-Monitoring, Impact and Treatment. *IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101526>
- King-Heiden, T. C., Mehta, V., Xiong, K. M., Lanham, K. A., Antkiewicz, D. S., Ganser, A., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2012). Reproductive and developmental toxicity of dioxin in fish. *Molecular and cellular endocrinology*, 354(1-2), 121-138. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.027>
- Laurent, J., Lavergne, E., Couteau, J., le Floch, S., Ouddane, B., Cachot, J., Davail, B., Clérandeau, C., Devin, S., Fisson, C., Devaux, A., Amara, R., Diop, M., Pichereau, V., & Laroche, J. (2022). Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(39), 59751-59769. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20000-y>
- Laurent, J., Diop, M., Amara, R., Fisson, C., Armengaud, J., Labadie, P., Budzinski, H., Couteau, J., Maillet, G., Le Floch, S., Laroche, J., & Pichereau, V. (2024a). Relevance of flounder caging and proteomics to explore the impact of an industrial accident caused by fire on the Seine estuarine water quality: the case of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities.
- Lee, Y. S., Lim, J. E., Lee, S., & Moon, H. B. (2020). Phthalates and non-phthalate plasticizers in sediment from Korean coastal waters: Occurrence, spatial distribution, and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111119. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111119>

- Li, Q., Zhang, H., Zou, J., Mai, H., Su, D., Feng, X., & Feng, D. (2019). Bisphenol A exposure induces cholesterol synthesis and hepatic steatosis in C57BL/6 mice by down-regulating the DNA methylation levels of SREBP-2. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110786. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110786>
- Mahfouz, S., Mansour, G., Murphy, D. J., & Hanano, A. (2020). Dioxin impacts on lipid metabolism of soil microbes: towards effective detection and bioassessment strategies. *Bioresources and Bioprocessing*, 7(1), 1-17. <https://doi.org/10.1186/s40643-020-00347-1>
- Neuparth, T., Moreira, S. M., Santos, M. M., & Reis-Henriques, M. A. (2012). Review of oil and HNS accidental spills in Europe: identifying major environmental monitoring gaps and drawing priorities. *Marine Pollution Bulletin*, 64(6), 1085-1095. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.03.016>
- Price, E. R., Bonatesta, F., McGruer, V., Schlenk, D., Roberts, A. P., & Mager, E. M. (2022). Exposure of zebrafish larvae to water accommodated fractions of weathered crude oil alters steroid hormone concentrations with minimal effect on cholesterol. *Aquatic Toxicology*, 242, 106045. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106045>
- Reichelt-Brushett, A. (2023). *Marine Pollution in Context. Marine Pollution—Monitoring, Management and Mitigation*, 1-22. Cham: Springer Nature Switzerland.
- Rodríguez-Jorquera, I. A., Colli-Dula, R. C., Kroll, K., Jayasinghe, B. S., Parachu Marco, M. V., Silva-Sanchez, C., Toor, G. S., & Denslow, N. D. (2018). Blood transcriptomics analysis of fish exposed to perfluoro alkyls substances: assessment of a non-lethal sampling technique for advancing aquatic toxicology research. *Environmental science & technology*, 53(3), 1441-1452.
- Ruus, A., Berge, J.A., Bergstad, O.A., Knutsen, J.A., Hylland, K. (2006). Disposition of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in two Norwegian epibenthic marine food webs. *Chemosphere*, 62, 1856-1868.
- Santana, M. S., Sandrini-Neto, L., Neto, F. F., Ribeiro, C. A. O., Di Domenico, M., & Prodocimo, M. M. (2018). Biomarker responses in fish exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): systematic review and meta-analysis. *Environmental pollution*, 242, 449-461. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.004>
- Sengupta, B. (2004). Dioxin (PCDDs) And Furan (PCDFs). Central Pollution Control Board Ministry Of Environment & Forests, *Parivesh Newsletter*. www.cpcb.nic.in
- Sørhus, E., Incardona, J. P., Furmanek, T., Goetz, G. W., Scholz, N. L., Meier, S., Edvardsen, R. B. & Jentoft, S. (2017). Novel adverse outcome pathways revealed by chemical genetics in a developing marine fish. *elife*, 6, e20707. <https://doi.org/10.7554/eLife.20707>
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C.V., 2019. STRING v11:protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research*, 47 (D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
- Whyte, J. J., Jung, R. E., Schmitt, C. J., & Tillitt, D. E. (2000). Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical reviews in toxicology*, 30(4), 347-570. <https://doi.org/10.1080/10408440091159239>
- Xie, H. Q., Xu, T., Chen, Y., Li, Y., Xia, Y., Xu, S. L., Wang, L., Tsim, K. W. K. & Zhao, B. (2016). New perspectives for multi-level regulations of neuronal acetylcholinesterase by dioxins. *Chemico-biological interactions*, 259, 286-290. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.030>
- Xu, E. G., Khursigara, A. J., Li, S., Esbaugh, A. J., Dasgupta, S., Volz, D. C., & Schlenk, D. (2019). mRNA-miRNA-Seq reveals neuro-cardio mechanisms of crude oil toxicity in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Environmental science & technology*, 53(6), 3296-3305. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00150>
- Xu, E. G., Mager, E. M., Grosell, M., Pasparakis, C., Schlenker, L. S., Stieglitz, J. D., Benetti, D., Hazard, E.S., Courtney, S.M., Diamante, G., Freitas, J., Hardima, G. & Schlenk, D. (2016). Time-and oil-dependent transcriptomic and physiological responses to Deepwater Horizon oil in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) embryos and larvae. *Environmental Science & Technology*, 50(14), 7842-7851. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02205>
- Xu, H. M., Xie, H. Q., Tao, W. Q., Zhou, Z. G., Li, S. Z., & Zhao, B. (2014). Dioxin and dioxin-like compounds suppress acetylcholinesterase activity via transcriptional downregulations in vitro. *Journal of Molecular Neuroscience*, 53, 417-423. <https://doi.org/10.1007/s12031-013-0167-5>

CHAPITRE III

**Évaluation de la qualité
écologique des petits
estuaires bretons**

1. Introduction

Ce chapitre explore les **réponses** de populations de Flet Européen (*P. flesus*) face au **multistress** (pollutions chroniques, eutrophisation, réchauffement des eaux) dans les **petits systèmes estuariens**.

1.1. Les petits systèmes estuariens

Les **petits estuaires** sont caractérisés par leur taille réduite, de quelques dizaines de kilomètres seulement (Romana, 1994). En outre, Pye & Blott (2014) ont défini les petits estuaires comme des systèmes avec une zone de marée active, au-dessus de l'embouchure, inférieure à 50 km².

Les petits systèmes estuariens sont aussi caractérisés par une **faible hétérogénéité** environnementale (Vasconcelos *et al.*, 2015 ; Elliott, 2011) qui se traduit par une **faible variabilité** inter-individuelle dans la réponse du poisson à son environnement. Ils sont généralement nettement **moins anthropisés** relativement aux grands estuaires, car leur taille restreint l'implantation de zones industrielles et urbaines à proximité.

Les **caractéristiques** propres aux petits systèmes estuariens offrent donc plusieurs **avantages** pour des études en **écologie du stress**. Le nombre restreint de stressseurs les rend plus facilement identifiables, les cocktails de polluants sont moins complexes. En outre, la faible variabilité interindividuelle permet de prélever moins d'individus par estuaire pour obtenir une signature biologique fiable. Enfin, l'anthropisation relativement modérée dans les petits estuaires permet encore d'identifier des **estuaires de référence** peu soumis aux multistress (Cardoso, *et al.*, 2011). Tout cela nous permet de développer et d'explorer efficacement de nouvelles méthodologies d'analyses dans le cadre d'une approche multi-estuaire, pour approfondir le **diagnostic écologique** des eaux de transition.

Cependant, les **petits systèmes estuariens**, qui présentent moins d'enjeux économiques que les grands estuaires, sont **peu étudiés** (Callaway *et al.*, 2014).

La **qualité de l'eau** des petits systèmes peut être évaluée grâce à des analyses d'oxygène, de nutriments, de nitrites et de nitrates, de phosphore, de chlorophylle, de bactériologie (Yüksek *et al.*, 2006) ou encore selon la dynamique des éléments nutritifs et le fonctionnement hydro-morphologique (Taljaard *et al.*, 2017).

Des études ont également été menées afin d'évaluer l'**impact** des **activités anthropiques** présentes au niveau des petits estuaires et de leur bassin versant (BV). Des analyses ciblées ont ainsi révélé la présence de **polluants organiques** (PFAS et HAPs) et de **métaux** (Cu et Zn) dans différents petits estuaires (Lu *et al.*, 2022). Des mesures empiriques ont également révélé la présence de **pesticides**, tels que l'Atrazine et le Métolachlore (Lu *et al.*, 2022 ; McCarthy *et al.*, 2007).

Cependant, très peu d'études en **écologie du stress** ont été menées sur les systèmes estuariens de petite taille. De ce fait, il est nécessaire de développer des **méthodes multidisciplinaires** de **biosurveillance** pour acquérir des connaissances sur les estuaires de petite taille.

Ainsi, dans le cadre de cette thèse, il nous est apparu particulièrement pertinent d'étudier les **petits systèmes estuariens** localisés dans une même région pour optimiser les méthodes d'évaluation de

la qualité des eaux estuariennes, par le développement d'approches intégratives couplant des approches directes (dosage de polluants, de nitrites et de nitrates, ...) et indirectes (omiques et biomarqueurs sur le poisson) afin (1) d'établir la **typologie** de petits des fleuves côtiers pour identifier (i) les principaux **facteurs de stress** spécifiques de chaque estuaire et (ii) un **système de référence** peu impacté par les stressseurs, puis (2) intégrer les réponses d'expression des **gènes** et des **protéines** chez le Flet pour mener une évaluation globale de l'**état écologique** de ces petits estuaires.

Pour ce faire, une **approche multi-biomarqueurs** a été développée afin de caractériser l'**état physiologique** de Flets juvéniles capturés dans différents petits estuaires. Par ailleurs, les teneurs en **polluants organiques** et en **éléments traces** ont été mesurées dans les poissons et les sédiments. L'ensemble de ces données ont été couplées avec des données **hydrobiologiques** et des **métriques géographiques** sur les **bassins versants**, afin de définir un estuaire de référence. Le **transcriptome** et le **protéome** du foie de flet ont été ensuite analysés sans *a priori* afin d'évaluer l'expression différentielle des gènes et des protéines dans les milieux anthropisés vs de référence. Le but final de ces travaux est alors de caractériser les différents stressseurs propres à chaque système estuarien, et de faire un premier bilan sur l'état écologique des hydrosystèmes.

Dans cette optique, nous avons mené à bien deux études, dans le cadre des **projets "OFB - POPEST"** et **"AELB - ECOEST"**, présentés ci-dessous.

1.2. Présentation du projet OFB - POPEST

Le **projet "OFB - POPEST"** mené de 2018 à 2020 (Figure 25), a été financé par l'Office Français de la Biodiversité (OFB).

L'**OFB**, créé au 1er janvier 2020, est un établissement public dédié à la protection et la restauration de la biodiversité des milieux aquatiques, terrestres et marins. L'OFB vise à limiter les diverses pollutions, la surexploitation des ressources naturelles, l'introduction d'espèces exotiques envahissantes ou encore la destruction et la fragmentation des milieux naturels.

Le projet POPEST, basé sur le Flet, a été développé afin d'explorer le potentiel de nouvelles **méthodologies moléculaires** de type **"-omiques"** pour rechercher de nouveaux gènes et protéines candidats, et ainsi déterminer le niveau de **vulnérabilité** des **populations naturelles** du Flet face aux multistress. Ce projet avait pour objectif (1) de caractériser les différents environnements estuariens de petites tailles, (2) d'identifier les stressseurs interagissant au sein de chaque système, (3) de mesurer l'impact du multistress sur la physiologie du poisson et (4) d'explorer par la biologie moléculaire de nouvelles voies métaboliques exprimées par le poisson pour répondre aux stress.

Les résultats du projet POPEST sont détaillés dans la sous-partie 2.1. ci-dessous. Ces résultats ont également fait l'objet d'un article (Laurent *et al.*, 2023), présenté dans la sous-partie 4.1. ci-dessous.

Le projet POPEST a également fait l'objet d'un rapport final mettant en évidence la pertinence des **outils moléculaires** couplés aux **approches multidisciplinaires** pour établir le **diagnostic écologique** des petits systèmes estuariens (Pichereau *et al.*, 2021).

1.3. Présentation du projet AELB - ECOEST

Le projet “**AELB - ECOEST**”, est la suite directe du projet “**OFB - POPEST**”. Le projet ECOEST, commencé en 2022, est actuellement financé par l’Agence de l’Eau Loire-Bretagne (AELB) et se terminera en 2024 (Figure 25).

Les **Agences de l’Eau** sont des établissements publics de l’État chargés de la politique de l’eau sur les grands bassins hydrographiques correspondant aux territoires des grands fleuves français. Les Agences de l’Eau ont pour objectif d’atteindre un bon état des eaux (en 2027), *i.e.* une eau en qualité et en quantité suffisante pour assurer un fonctionnement durable des écosystèmes naturels et satisfaire les usages humains.

L’**Agence de l’Eau Loire-Bretagne** (AELB) est donc en charge du bassin Loire-Bretagne, comprenant le bassin versant de la Loire et de ses affluents, les bassins de la Vilaine et des fleuves côtiers bretons, ainsi que les bassins côtiers vendéens et du marais poitevin. Le territoire naturel du bassin Loire-Bretagne s’étend sur 155 000 km² et occupe 28 % du territoire métropolitain, avec pas moins de 6 654 km de côtes, 135 000 km de cours d’eau et des nappes souterraines importantes.

Le projet ECOEST est une extension de l’approche **multi-estuariens** et **multidisciplinaire** mise en place au cours du projet POPEST pour caractériser l’**état écologique** de systèmes estuariens de petite taille. Ce projet a été développé pour **approfondir** nos recherches sur les estuaires au niveau de la région Bretagne.

Ce projet a pour objectif (1) d’approfondir le **fonctionnement écologique** des hydrosystèmes bretons par (i) le diagnostic des différents **stresseurs** et par (ii) l’estimation des **altérations biologiques** chez le Flet, et (2) de maintenir une collaboration forte entre les scientifiques, les SAGE et les collectivités en charge des BV, afin de partager et d’augmenter les connaissances sur l’occupation des sols et la gestion de l’eau.

Les résultats du projet ECOEST sont détaillés dans la sous-partie 2.2. ci-dessous. Ces résultats ont également fait l’objet d’un article en préparation (Laurent *et al.*, 2024b), présenté dans la sous-partie 4.2. ci-dessous.

La partie finale du projet ECOEST sera menée à partir de janvier 2024 et consistera à mener une **analyse statistique multi-marqueurs** couplant les données de géographie, d’hydrobiologie, de chimie, de biomarqueurs et de biologie moléculaire sur le Flet afin d’établir des **outils de diagnostic** pour les **gestionnaires** de l’environnement, pour le **monitoring** de la qualité écologique des écosystèmes estuariens et pour le suivi des opérations de **restauration**.

2. Résultats & Discussion

2.1. Première approche afin d'évaluer la qualité écologique des petits estuaires bretons : couplage des signatures environnementales et des réponses moléculaires chez le Flet

Dans cette **première étude**, nous nous sommes concentrés sur la comparaison de **cinq petits estuaires** situés en Bretagne, dont le BV est compris entre 69 et 379 km², et la Canche, un système de taille moyenne (1 400 m²) utilisé comme estuaire de référence dans des études antérieures (Laurent *et al.*, 2022 ; Borcier *et al.*, 2019). Ces **six systèmes** (Penzé, Horn, Aven, Scorff, Noyal et Canche) ont été sélectionnés pour leurs niveaux **contrastés** de stressors (polluants, eutrophisation, hypoxie...) liés aux activités anthropiques. Des Flets juvéniles ont donc été échantillonnés dans ces systèmes à la fin de l'été 2018.

Les **métriques géographiques** (SIG) ont permis de déterminer les **usages des sols** de tous les BV étudiés, mettant en avant la **pression agricole**, la **pression urbaine** et le **bon état écologique**.

La géographie a mis en évidence que l'Horn est le BV le plus agricole, avec les indices les plus élevés pour le bétail, les traitements phytosanitaires et les surfaces agricoles (légumes). La Canche présente également une surface agricole très importante, mais centrée sur la production céréalière intensive. La Penzé présente également une pression d'élevage assez élevée. Noyal présentait les plus forts niveaux de densité de population, de zones urbanisées et d'industrialisation. Concernant l'état écologique, les plus importantes proportions de surfaces naturelles ont été observées pour le Scorff, les plus fortes densités de haies ont été observées pour les BV de l'Aven et de la Penzé, et enfin les plus importantes ripisylves ont été enregistrées pour la Penzé, le Scorff et Noyal.

Les concentrations les plus élevées de **nitrites** et de **nitrites** ont été observées dans l'Horn, résultant principalement de la fertilisation importante des sols en zone légumière. Noyal présentait également de fortes teneurs en nitrites et en ammonium, potentiellement liées aux activités industrielles et au dysfonctionnement des STEP.

Les **polluants organiques** mesurés dans les tissus des poissons ont révélé que seuls les individus capturés dans le système de Noyal présentait des niveaux élevés de HAPs et de PCBs, engendrés par l'industrialisation, la forte densité de population et le trafic routier, qui caractérisent ce système.

Les **éléments traces métalliques** (As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, V et Zn) ont aussi été dosés dans le muscle des flets. Les différences significatives les plus importantes ont été observées pour l'As, avec les concentrations les plus élevées mesurées dans les poissons de la Canche, de Noyal et de l'Aven. La Canche présentait également de fortes concentrations pour tous les autres métaux analysés, probablement induites par le flux côtier provenant de l'estuaire de la Seine, dû aux vents dominants du Sud-Ouest et à la dérive Nord-Est en Manche (Brylinski *et al.*, 1991).

Les **dommages à l'ADN**, déterminés par le test des comètes, étaient significativement plus élevés dans les flets de la Canche et plus faibles dans ceux du Scorff. Cette **génotoxicité** pourrait être liée à l'exposition aux métaux (Kousar & Javed, 2015 ; Naz & Javed, 2013) ou aux xénobiotiques organiques (Frenzilli *et al.*, 2009).

Les analyses d'**éléments traces** dans les otolithes ont révélé que deux éléments discriminaient fortement les estuaires étudiés, à savoir le Sr et le Mn.

Le **ratio Sr:Ca** dans les otolithes, utilisé comme proxy de la salinité (Condini *et al.*, 2019 ; Panfili *et al.*, 2015), a révélé que les poissons de l'Aven vivaient dans des conditions plus salées, tandis que les flets de la Canche vivaient dans des conditions oligohalines.

Le **ratio Mn:Ca**, considéré comme indicateur de l'hypoxie (Limburg *et al.*, 2015 ; Thorrold & Shuttleworth, 2011), indique une hypoxie marquée pour le Scorff et Noyal, mais modérée pour la Penzé.

Les autres mesures d'éléments traces (Cu, Fe, Li, Va) suggèrent une **multi-contamination métallique** chronique pour le Scorff.

Les analyses d'**isotopes stables** dans les otolithes ont mis en évidence une forte **signature $\delta^{18}\text{O}$** pour les poissons de l'Aven, caractéristique d'un environnement marin, contrairement à la Canche qui a montré une faible signature $\delta^{18}\text{O}$, confirmant les résultats obtenus par le Sr.

Les **signatures $\delta^{13}\text{C}$** les plus négatives dans les otolithes des flets de Noyal et du Scorff ont révélé un taux élevé d'activité métabolique induit par les facteurs de stress, forçant les poissons à augmenter leur taux métabolique pour maintenir l'homéostasie et réparer les dommages (Sokolova, 2013). *A contrario*, les niveaux moins négatifs de $\delta^{13}\text{C}$ détectés dans les flets de l'Aven pourraient être liés à un taux métabolique réduit, suggérant un environnement modérément stressé.

L'**intégration des signatures environnementales**, obtenues grâce à la géographie, l'hydrobiologie, la chimie des polluants et les biomarqueurs ciblés sur les poissons, suggère que le BV de l'Aven est le système le moins impacté par les activités anthropiques. Nous avons donc décidé de considérer l'Aven comme le **système de référence** pour les analyses moléculaires.

Les approches de **transcriptomique** et de **protéomique** ont permis d'identifier plus précisément les différences physiologiques entre les flets échantillonnés dans les différents estuaires.

Les signatures -omiques ont révélé une surexpression des gènes et des protéines de presque toutes les voies de **détoxification des xénobiotiques** (GO:0009410) pour les flets de l'Horn et de Noyal. Plus précisément, nous avons observé une accumulation de protéines associées à la **phase I**, telles que la NADPH-cytochrome P450 réductase, dix isoformes de la CYP450, la diméthylaniline monooxygénase, ou encore l'époxyde hydrolase. Nous avons également remarqué une accumulation de protéines associées à la **phase II**, comme la GST et l'UDP-glucuronosyltransférases. Le **cycle de la méthionine** était également nettement dérégulé chez les flets de Noyal, de l'Horn et du Scorff. La dérégulation négative de la BHMT, des SAM synthétases et de l'adénylhomocystéinase, ainsi que la dérégulation positive de la méthionine synthase, suggèrent que la synthèse de la méthionine est privilégiée aux dépens de l'homocystéine, en réponse aux xénobiotiques (Vandeghechuchte & Janssen, 2011).

Toutes ces données mettent en évidence que Noyal contient très probablement des quantités élevées de polluants organiques associés à la densité de population et à l'activité industrielle élevées. Concernant l'Horn, la dérégulation des systèmes de détoxification est probablement liée à l'utilisation importante de traitements phytosanitaires pour la production intensive de légumes.

Les approches moléculaires ont aussi mis en évidence une exposition des poissons de l'Aven à l'**arsenic**. En effet, nous avons observé la sous-expression systématique de l'**arsenite méthyltransférase** dans tous les hydrosystèmes relativement à l'Aven, indiquant que cette protéine était en fait accumulée dans le foie des poissons capturés dans l'estuaire de référence. Or, les concentrations d'arsenic sont également apparues élevées dans la Canche et Noyal, sans pour autant qu'on y détecte l'arsenite méthyltransférase.

Ces résultats suggèrent que l'Aven contiendrait plus d'arsenic inorganique que les deux autres estuaires. En effet, l'arsénite méthyltransférase catalyse la biométhylation de l'arsénite (As(III)) en ses métabolites méthylés moins toxiques MMA et DMA (Cui *et al.*, 2021). La contamination par l'arsenic pourrait être due à l'épandage de boues algales résultant de l'exploitation des algues, qui concentrent naturellement l'arsenic (Wahbeh *et al.*, 1985).

Les -omiques ont aussi mis en évidence la dérégulation d'un autre métabolisme d'intérêt, le **cycle de l'urée** (GO:0000050). Effectivement, pas moins de sept gènes et protéines impliqués dans cette voie ont été surexprimés chez les flets capturés dans l'Horn : l'argininosuccinate lyase, la carbamoyl phosphate synthétase, l'argininosuccinate synthétase, l'ornithine carbamoyltransférase, et le transporteur de citrulline/ornithine. Le cycle de l'urée convertit l'excès d'azote systémique dérivé de la dégradation des métabolites contenant de l'azote, tels que les protéines, les acides aminés ou l'ammoniac lui-même, en urée, un composé azoté facile à excréter (Mew *et al.*, 2017).

Nous suggérons donc que la dérégulation du cycle de l'urée peut être associée à l'activité agricole intensive dans le BV de l'Horn et à une importante activité bactérienne réductrice de nitrates en nitrites et en ammonium sur le fond (Corriveau, 2009). En outre, chez la plupart des poissons, les déchets azotés sont excrétés par les branchies sous forme d'ammoniac (faible coût métabolique) (Wood, 2022), or lors d'un excès d'ammonium à l'interface eau-sédiment, le Flet pourrait convertir l'ammoniac en urée par le cycle de l'urée dans le foie, un processus métaboliquement coûteux.

La transcriptomique a mis en évidence une dérégulation des marqueurs associés à la réponse à l'**hypoxie** dans les estuaires de la Penzé et du Scorff. En effet nous avons observé une sous-expression du régulateur transcriptionnel de l'HIF1a et de l'inhibiteur de HIF1a pour les flets du Scorff. L'HIF1a, qui régit la réponse cellulaire à l'hypoxie, régule des gènes responsables de l'angiogenèse et la synthèse des globules rouges. Une analyse approfondie a révélé une sous-expression du gène VEGF et une surexpression du gène de l'érythropoïèse pour le Scorff et la Penzé. En outre, les analyses microchimiques des otolithes des poissons du Scorff et de la Penzé ont révélé des niveaux élevés de Mn, suggérant une **exposition chronique** au stress hypoxique.

Les signatures moléculaires ont aussi mis en avant une dérégulation des **hormones stéroïdiennes** dans le foie des poissons du Scorff et de Noyal. En effet, les premières analyses de réseaux ont révélé un enrichissement significatif de la biosynthèse des hormones stéroïdiennes (dre00140), des voies cataboliques des acides gras (dre00071) et des acides aminés à chaîne ramifiée (dre00280).

Plus particulièrement, la voie de **synthèse du cholestérol** a montré l'induction de 23 gènes pour le Scorff et de 19 pour Noyal, tels que la 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-Coenzyme A réductase ou l'hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase, couvrant toutes les étapes de cette voie métabolique. D'autres gènes et protéines surexprimés chez les poissons du Scorff sont impliqués dans la **biotransformation** du **cholestérol** en hormones stéroïdiennes, telles que la 3-oxo-5-alpha-stéroïde 4-déshydrogénase et la 3-keto-steroid reductase.

La dérégulation de la synthèse du cholestérol peut résulter d'une exposition à des contaminants environnementaux, comme les HAPs (Sørhus *et al.*, 2017), le Bisphénol A (Li *et al.*, 2019), les PFAS (Rebholz *et al.*, 2016) ou les phtalates (Lee *et al.*, 2020).

Les signatures environnementales (géographie, hydrobiologie, chimie, biomarqueurs ciblés) sur les BV et les Flets ont été combinées avec les résultats de la -omique pour définir précisément la **typologie** des cinq petits estuaires bretons étudiés.

L'**Aven** présente la plus forte densité bocagère et une pression agricole assez modérée, orientée vers la production de légumes en conserve, ce qui pourrait expliquer les charges réduites en azote dans ce système. Le BV de l'Aven présentait également une faible densité de population et de faibles charges en polluants organiques et en métaux, à l'exception de l'**arsenic** qui a entraîné une induction de l'arsenate méthyltransférase. L'Aven semble être le moins impacté par rapport aux quatre autres hydrosystèmes étudiés, ce qui confirme qu'il pourrait être considéré comme une **référence** pertinente pour les approches -omiques sur le Flet.

L'**Horn** est caractérisé par une très forte **pression agricole**, avec une production intensive de légumes dans de petites parcelles (pommes de terre, carottes, échalotes...) et une grande densité d'élevages de porcs hors-sol (Canévet, 1992). Ces types de cultures et d'élevages entraînent une utilisation massive de **pesticides** et de **déchets azotés** (Crisan, 2020 ; Pujol, 2015 ; Sebilo *et al.*, 2013). De plus, les poissons échantillonnés dans l'Horn présentaient des signatures -omiques de détoxification des xénobiotiques, probablement liées à l'exposition aux pesticides, et une forte dérégulation du cycle de l'urée, liée à la charge azotée très élevée dans l'estuaire.

La **Penzé** partage plusieurs caractéristiques avec l'hydrosystème de l'Horn, telles que les cultures légumières et les élevages porcins, mais avec une **pression agricole moins marquée**. De plus, les poissons de la Penzé ont des réponses moléculaires différentes de l'Horn, avec des signatures liées à l'**hypoxie**, mais pas de signature liée à la détoxification des xénobiotiques ni à l'exposition à l'azote. Cela pourrait s'expliquer par une meilleure préservation des haies, de la ripisylve et des bandes enherbées sur le BV, qui interceptent les excès en nutriments (Viaud & Thomas, 2019), en nitrates (Grimaldi *et al.*, 2012), en pesticides et en phosphore (Carluer *et al.*, 2017 ; Catalogne & Hénaff, 2016), avant qu'ils n'atteignent les eaux de surface (Reichenberger *et al.*, 2007). La préservation du **bocage** dans le BV de la Penzé joue probablement un rôle majeur dans la qualité globale des eaux estuariennes.

Le **Scorff** présente une **pollution chronique** par les **métaux**, malgré une proportion relativement élevée d'**habitats naturels**. Cette contamination n'est probablement pas liée aux activités sur le BV, mais plutôt aux activités portuaires de la rade de Lorient, en aval de l'estuaire (De los Ríos *et al.*, 2016 ; Greenfield *et al.*, 2011). Les analyses d'éléments traces ont également révélé de fortes teneurs en Mn dans les otolithes des flets du Scorff, suggérant des **événements hypoxiques** fréquents possiblement liés aux effluents laitiers dans l'estuaire.

Le système de **Noyal** est le plus **urbanisé**, avec une forte densité de population, une forte pression touristique estivale et un pourcentage élevé de terres artificialisées, ce qui peut entraîner une surcharge et un **dysfonctionnement des stations d'épuration** (Terrier *et al.*, 2005). Les rejets de sources industrielles et domestiques, probablement importants dans l'estuaire, pourraient expliquer les concentrations élevées en nitrites, en HAPs et en PCBs, ainsi que les signatures -omiques d'une exposition aux xénobiotiques organiques.

2.2. Optimisation des méthodes développées pour évaluer la qualité écologique des petits estuaires bretons : couplage des signatures environnementales et des réponses moléculaires chez le Flet

Dans cette **seconde étude**, nous nous sommes concentrés sur la comparaison de **sept petits estuaires** également localisés en Bretagne (Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven), dont le bassin versant total est compris entre 70 et 450 km².

Les bassins versants associés à ces estuaires sont essentiellement caractérisés par une pression plus ou moins importante de l'agriculture - l'élevage hors sol - la pisciculture, dans un contexte typiquement breton. Par ailleurs, quatre bassins versants sur sept sont mitoyens.

En outre, nous avons conservé dans cette nouvelle étude l'Aven, pour confirmer ou pas le statut de référence de cet hydrosystème (Laurent *et al.*, 2023). Des Flets juvéniles ont donc été échantillonnés dans ces systèmes à la fin de l'été 2020.

Différentes **métriques géographiques** (SIG) ont été estimées pour explorer les différents **usages des sols** dans l'ensemble des bassins versants étudiés. La géographie a mis en évidence un premier groupe de bassins (Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec et Aber Wrac'h) caractérisés par une pression agricole élevée, qui s'accompagne de nombreux traitements phytosanitaires. Cependant, l'Aber Wrac'h et le Quillimadec se distinguent par une densité de population plus élevée, associée à davantage de zones urbanisées. Par ailleurs, l'Aven et la Douffine présentent les plus fortes proportions d'espaces naturels préservés et de ripisylves, qui pourraient conduire à un bon état écologique de ces hydrosystèmes. Cependant, nous avons remarqué pour la Douffine une grosse activité piscicole qui pourrait se traduire par une forte eutrophisation du système. Enfin, le Gouessant est défini par une forte pression d'élevage porcin et une faible densité de haies, principalement à cause d'importantes cultures de maïs. Le cours d'eau du Gouessant présente par ailleurs deux barrages successifs, immédiatement en amont de l'estuaire

Les concentrations les plus élevées en **nitrites**, **nitrites** et **ammonium** ont été observées pour le Guillec, et sont liées à une importante fertilisation des petites parcelles consacrées à la production maraîchère intensive (pommes de terre, carottes et échalotes). Les estuaires de la Flèche, du Quillimadec et de l'Aber Wrac'h présentaient aussi des charges élevées en nitrates, également liées à la pression agricole. En revanche, les concentrations en azote dans l'Aven étaient faibles, confirmant une pression agricole modérée (légumes en conserve) et une bonne conservation du bocage limitant les flux d'azote.

Les **polluants organiques** mesurés dans les sédiments ont mis en évidence des concentrations élevées en HAPs dans l'Aven, liées au port de plaisance sur le site de prélèvement et au parking situé à proximité, très fréquenté par les touristes en période estivale. Les sédiments de la Flèche, du Quillimadec, de l'Aber Wrac'h et la Douffine présentaient des valeurs moyennes de HAPs probablement liés au trafic routier dans ces BV. Les dosages en PCBs dans les sédiments étaient inférieurs aux limites de détection dans les sept estuaires, ce qui révèle un impact limité des effluents industriels dans ces bassins versants, à dominante agricole.

Les **éléments traces métalliques** (As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, V et Zn), dosés dans les **sédiments**, ont mis en évidence une multi-contamination prononcée dans l'estuaire de la Douffine liée à d'anciennes activités minières. Ces analyses ont aussi révélé des taux élevés d'As dans les sédiments de l'Aber Wrac'h et de l'Aven.

Les **éléments traces métalliques**, dosés dans les **muscles** des flets, n'ont pas reflété la multi-contamination observée dans les sédiments de la Douffine. La relation entre les éléments traces mesurés dans les sédiments vs poissons est faible, à l'exception des concentrations en As dans l'Aven et l'Aber Wrac'h.

Les analyses d'**éléments traces** dans les otolithes ont révélé que deux éléments se distinguaient nettement entre les estuaires étudiés, à savoir le strontium (Sr) et le manganèse (Mn).

Le **ratio Sr:Ca** dans les otolithes, considéré comme un proxy de la salinité (Condini *et al.*, 2019 ; Panfili *et al.*, 2015), a mis en avant que les poissons de l'Aven vivaient dans un environnement polyhalin, tandis que les individus du Gouessant, du Guillec, de la Flèche et de la Douffine vivaient dans un environnement oligohalin.

Le **ratio Mn:Ca**, utilisé comme indicateur de l'hypoxie (Limburg *et al.*, 2015 ; Thorrold & Shuttleworth, 2011), indique une hypoxie marquée pour le Gouessant et la Douffine.

Les analyses d'**isotopes stables** dans les otolithes, et plus particulièrement le $\delta^{18}\text{O}$ - utilisé comme indicateur de la salinité et de la température de l'eau (Reis-Santos *et al.*, 2023), et le $\delta^{13}\text{C}$ - considéré comme un indicateur du taux métabolique (Chung *et al.*, 2019), ont permis de caractériser l'environnement des flets.

Les fortes **signatures $\delta^{18}\text{O}$** observées chez les poissons de l'Aven sont caractéristiques d'un environnement marin.

Les **signatures $\delta^{13}\text{C}$** les plus négatives observées pour l'estuaire de la Flèche pourraient être liées à une augmentation du métabolisme des poissons, afin de répondre au coût énergétique croissant dans des environnements stressés (Sokolova, 2013).

L'**intégration des signatures environnementales**, comprenant des données de géographie, d'hydrobiologie, de chimie, et de biomarqueurs spécifiques chez les flets, confirme que le BV de l'Aven reste dans cette nouvelle étude un système relativement peu exposé au multistress. En conséquence, nous avons choisi de maintenir l'Aven comme **système de référence** pour les analyses moléculaires. L'utilisation des approches de **protéomique hépatique** nous a ensuite permis d'identifier de manière précise les dérégulations moléculaires associées à chaque hydrosystème.

Les signatures moléculaires ont mis en évidence une surexpression des protéines associées aux mécanismes de **biotransformation des xénobiotiques** (GO:0009410) dans le foie des flets de tous les estuaires étudiés, avec cependant une détoxification des polluants organiques nettement moins marquée pour l'Aber Wrac'h.

Les protéines de la **Phase I**, et plus particulièrement les cytochromes P450, étaient significativement accumulées dans les poissons de la Douffine, de l'Aber Wrac'h et du Guillec, et sont impliquées dans la détoxification hépatique des polluants organiques. Cependant, la sous-expression de plusieurs autres protéines CYP450 suggère des niveaux d'exposition plus faibles chez les poissons issus du Quillimadec et de la Flèche, par rapport à ceux de l'Aven. Aucune CYP450 n'a été dérégulée dans le Gouessant.

Les protéines de la **Phase II** étaient surtout accumulées dans le foie des flets du Gouessant, telles que la glutathion synthétase, la glutathion peroxydase et la glutathion S-transférase thêta-1.

Un enrichissement du métabolisme de la **cystéine** et de la **méthionine** (*i.e.* BHMT, SAM et adénosyl homocystéinase), a également été mis en avant par la -omique. Plusieurs protéines de ce cycle étaient négativement régulées dans le foie des poissons ; neuf chez les individus de la Flèche, six chez les poissons de la Douffine et cinq chez les flets du Guillec. Cette dérégulation suggère une préférence pour la synthèse de la méthionine par rapport à l'homocystéine.

Les approches de protéomique ont aussi révélé une légère induction du métabolisme du **cycle de l'urée** (GO:0000050) dans les flets du Gouessant, du Quillimadec et de la Douffine.

Les individus du Gouessant ont accumulé l'aspartate aminotransférase mitochondriale et l'aspartate-ARNt ligase cytoplasmique, les poissons de la Douffine ont accumulé l'argininosuccinate lyase et la CAD, tandis que les flets du Quillimadec n'ont surexprimé que l'argininosuccinate synthase. De manière surprenante, aucune protéine associée au cycle de l'urée n'a été dérégulée dans les foies des poissons de l'estuaire du Guillec, malgré la présence de nitrites et d'ammonium. Notre précédente étude (Laurent *et al.*, 2023) a mis en avant un lien potentiel entre la dérégulation du cycle de l'urée et l'exposition aux nitrates/nitrites, comme conséquence de l'élevage et de la production intensive de légumes.

Les dérégulations observées pour le Gouessant pourraient s'expliquer par les teneurs élevées en ammonium, nitrates et nitrites, issues des élevages porcins et de grandes surfaces cultivées en maïs. Dans l'estuaire du Quillimadec, la culture maraîchère intensive et la contamination par le fumier de porc, contribuent probablement à la dérégulation du cycle de l'urée. Enfin, la Douffine abrite trois grandes fermes piscicoles pouvant entraîner d'importantes charges en azote dans l'hydrosystème (Helal *et al.*, 2017 ; Schenone *et al.*, 2011), et donc conduire à une dérégulation du cycle de l'urée chez le poisson.

Les signatures moléculaires ont mis en évidence une altération de plusieurs protéines associées à la réponse au **stress thermique** (GO:0009408), chez les flets du Gouessant et du Quillimadec. Cette dérégulation portait essentiellement sur plusieurs protéines de choc thermique (HSP) et sur des protéines de liaison aux HSP.

Le plus grand nombre de protéines dérégulées a été observé chez les poissons capturés dans l'estuaire du Gouessant, elles étaient au nombre de six, et parmi elles il y avait la protéine 14-3-3 isoforme X1 de l'épsilon, la HSP 60 kDa ou encore la Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase. Les poissons du Quillimadec présentaient quatre protéines dérégulées dont trois accumulées, la DNAJ homolog subfamily C member 3, la HSP 70 kDa protein 4L et la HSP mitochondriale de 75 kDa.

Les poissons expriment des HSP lorsqu'ils sont exposés à des fluctuations thermiques, qu'il s'agisse d'une augmentation ou d'une diminution de la température. L'expression des HSP peut donc être utilisée comme indicateur pour la surveillance environnementale (Roberts *et al.*, 2010).

Le cours d'eau du Gouessant présente deux barrages successifs qui créent des réservoirs où l'eau peut se réchauffer très significativement en période estivale et soumettre les flets en aval des barrages à un stress thermique (Poole & Berman, 2001). La retenue d'eau immédiatement en amont de l'estuaire du Quillimadec pourrait aussi expliquer le stress thermique détecté en aval chez les flets de cet estuaire.

La protéomique a aussi révélé des signatures d'**hypoxie** (GO:0001666) chez les flets du Gouessant. En effet, les poissons présentaient une sur-activation de l'homologue de l'alpha-1-antitrypsine, de l'isoforme X1 de la Prohibitine-2 et de la NDRG1. À l'inverse, la L-lactate déshydrogénase A et la protéine-tyrosine kinase 2-bêta étaient sous-exprimées. Cependant, les analyses moléculaires n'ont pas réussi à détecter de protéines plus directement associées à la réponse à l'hypoxie, telles que le facteur 1 alpha inductible par l'hypoxie (HIF1a), le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), l'angiopoïétine ou l'hémoglobine. Or, le ratio Mn:Ca élevé dans les otolithes des individus capturés dans le Gouessant suggère clairement une exposition chronique à l'hypoxie.

Dans notre précédente étude portant sur d'autres petits estuaires de Bretagne (Laurent *et al.*, 2023), ces marqueurs moléculaires étaient nettement dérégulés dans plusieurs estuaires exposés à des événements hypoxiques. Cependant, cette étude utilisait des méthodes de transcriptomique pour

identifier les gènes mentionnés, en réponse à l'hypoxie. Ainsi, soit les épisodes hypoxiques dans cette nouvelle étude ont été moins sévères que ceux observés dans notre premier travail (Laurent *et al.*, 2023), soit la protéomique est moins efficace pour révéler les réponses du poisson aux événements hypoxiques.

Les approches moléculaires ont aussi mis en avant une dérégulation des protéines associées au **métabolisme des acides gras** (GO:0006631) pour la plupart des estuaires étudiés, et plus particulièrement une dégradation des acides gras.

En effet, de nombreuses protéines impliquées dans la **bêta-oxydation** des acides gras (GO:0019395) étaient accumulées dans le foie des poissons de tous les estuaires étudiés. Parmi ces protéines, plusieurs isoformes d'acyl-CoA synthétases, d'acyl-CoA et d'hydroxyacyl-CoA déshydrogénases, de bêta-cétothiolase, ainsi que la 2,4 diénoyl-CoA réductase, sont impliquées dans la dégradation des acides gras insaturés.

La bêta-oxydation des acides gras constitue le métabolisme énergétique le plus efficace chez les animaux, et sa stimulation dans le foie des poissons de presque tous les estuaires répond probablement à une demande énergétique accrue.

Les analyses de protéomique ont révélé une dérégulation significative des protéines associées au **système immunitaire**, notamment celles liées au système du **complément** (GO:0006955 et GO:0006956), particulièrement chez les flets du Gouessant.

Les poissons du Gouessant présentaient une surexpression de protéines liées à « l'infection à Salmonella » (voie KEGG dre05132). En outre, le plus grand nombre de protéines dérégulées étaient associées au système du complément, avec 12 protéines régulées positivement et 3 protéines régulées négativement.

Les protéines du complément correspondent à l'ensemble des enzymes impliquées dans la défense immunitaire de l'organisme. Le système du complément sert de pont entre l'immunité innée et acquise, facilitant l'amélioration des réponses en anticorps, la mémoire immunologique, la lyse des cellules étrangères et l'élimination des complexes antigène-anticorps et des cellules apoptotiques (Lubbers *et al.*, 2017).

De nouveau, les signatures environnementales (géographie, hydrobiologie, chimie, biomarqueurs ciblés) sur les BV et les flets ont été combinées avec les résultats de la -omique pour définir précisément la **typologie** de ces sept petits estuaires bretons.

Le BV de l'**Aven** apparaît toujours comme le système le moins impacté par les activités humaines. Ces résultats confirment que l'Aven est un hydrosystème qui pourrait être considéré comme un système de référence pertinent pour la région Bretagne, pour les futures approches ciblant la qualité écologique des estuaires, et intégrant signatures environnementales et protéomique sur le poisson. On observe cependant une différence notable au niveau des signatures moléculaires des flets de l'Aven mesurées en 2020 vs 2018. En outre, aucune induction de l'arseniate méthyltransferase n'a été observée chez les individus capturés lors de cette seconde campagne d'échantillonnages, contrairement à notre première étude (Laurent *et al.*, 2023).

A l'inverse, l'hydrosystème du **Gouessant** ressort comme le plus anthropisé et le plus stressé des systèmes étudiés. Ce BV est caractérisé par une forte pression agricole, avec des charges élevées en nitrates et nitrites, dues à l'élevage porcin intensif et aux cultures de maïs impliquant aussi un usage important des pesticides. Par ailleurs, ce bassin présente une faible densité de haies caractérisant un bocage dégradé. Le cours d'eau est fragmenté par deux barrages qui pourraient réduire le transfert des pesticides vers l'aval, et favoriser leur dégradation dans les réservoirs associés à ces barrages. Nous émettons donc l'hypothèse que la surexpression des protéines de détoxification de

phase II pourrait être liée à la défense anti-oxydante mise en place par les poissons, après une exposition à des cyanobactéries (Paulino *et al.*, 2020). Les cyanobactéries se développeraient dans les réservoirs chauds et eutrophisés du Gouessant, puis seraient transférées vers l'estuaire. De plus, les flets ont montré une induction des protéines associées au cycle de l'urée liée à l'excès d'azote, au stress thermique et à l'hypoxie. Enfin, la forte dérégulation des protéines liées au système immunitaire chez les flets du Gouessant pourrait être aussi une réponse à l'exposition aux cyanobactéries (Falfushynska *et al.*, 2023).

Les quatre bassins versants adjacents, **Guillec**, **Flèche**, **Quillimadec** et **Aber Wrac'h**, présentent une forte pression agricole liée à la culture maraîchère, caractérisée par des apports élevés en azote et en pesticides (Crisan M., 2020). Ces systèmes, similaires en première approche, ont cependant été différenciés de manière significative par la protéomique.

Les individus du **Guillec** étaient caractérisés par une suraccumulation de protéines de la Phase I (CYP450 1A1) et des protéines associées à la réponse à l'hypoxie, probablement liée à la culture maraîchère, aux traitements phytosanitaires et aux charges en azote qui en résultent.

Les poissons de la **Flèche** ont également montré une dérégulation des protéines associées à la détoxification des xénobiotiques, et plus particulièrement une sous-expression des protéines impliquées dans le métabolisme de la cystéine et de la méthionine. Ainsi, le cocktail de polluants est probablement différent entre la Flèche et le Guillec. Rappelons par ailleurs que la Flèche présente la plus forte densité d'élevages. Les poissons de la Flèche ont aussi montré une augmentation particulière de leur taux d'activité métabolique ; leurs besoins énergétiques accrus pourraient être alimentés par la bêta-oxydation des acides gras. Nous avons aussi observé une forte dérégulation des protéines liées au système immunitaire.

Les flets du **Quillimadec** étaient aussi caractérisés par des protéines de réponse à la détoxification des xénobiotiques et à l'hypoxie. Les individus capturés dans le Quillimadec se différencient aussi par une légère induction des protéines du cycle de l'urée. Ces réponses pourraient être liées aux activités agricoles et à la forte densité de population. Enfin, les poissons présentent une accumulation des protéines associées à la réponse au stress thermique, à mettre probablement en relation avec la présence d'une retenue d'eau localisée immédiatement en amont de l'estuaire.

L'hydrosystème de l'**Aber Wrac'h** apparaît comme le moins impacté de ces quatre BV agricoles adjacents, à l'exception de la contamination par l'arsenic. La protéomique n'a révélé aucune activité évidente de détoxification des polluants organiques dans cet hydrosystème.

Le système **Douffine** se démarque des autres systèmes étudiés par une contamination multi-métallique liée à une activité minière passée. Les rejets d'une activité industrielle actuelle et des eaux usées d'un village, évacués immédiatement en amont de l'estuaire pourraient expliquer la dérégulation des protéines de détoxification des polluants organiques (Phase I et métabolisme de la cystéine et de la méthionine). Le BV de la Douffine est également caractérisé par une activité piscicole intense, qui induit des charges élevées en azote et donc une eutrophisation, pouvant expliquer la dérégulation du cycle de l'urée observée en protéomique. Enfin, les poissons de la Douffine ont montré une dérégulation de la dégradation du métabolisme des acides gras insaturés, probablement liée aux rejets des piscicultures.

3. Conclusion

Dans le domaine de l'écologie du stress, l'évaluation de la **qualité écologique** des estuaires reste encore un **exercice très difficile**. Les petits estuaires sont encore très peu étudiés au niveau national, aussi nous avons exploré la qualité écologique des fleuves côtiers bretons, en menant une approche comparative sur onze hydrosystèmes.

Au travers de nos deux études, nous avons mené une **approche intégrative** sur différentes signatures environnementales : **géographie** des bassins versants, **hydrobiologie** des cours d'eau, **chimie des polluants**. En effet, nous avons mesuré de nombreuses réponses biologiques chez le Flet grâce aux biomarqueurs et aux signatures moléculaires. En procédant ainsi, nous avons pu rassembler des informations se rapportant à différentes **échelles spatiales et temporelles**.

La géographie donne une vue globale à grande échelle sur les bassins versants, permettant de caractériser les différentes formes d'anthropisation et les **usages des sols à long terme**. Les biomarqueurs apportent des informations concernant les **réponses physiologiques** du poisson à **moyen terme**, suite à une exposition à différents stressseurs. Enfin, les approches moléculaires donnent un aperçu de l'ensemble des **activités métaboliques** du foie de Flet, qui sont principalement influencées par les changements à **court terme** de la qualité de l'eau estuarienne.

Notre objectif était de pouvoir établir un **diagnostic** sur de la **qualité écologique** des estuaires. Les différentes approches ont donné des **résultats complémentaires** et ont permis d'établir une **typologie précise** des estuaires étudiés.

Nous avons ainsi observé dans le cadre de notre première étude (POPEST) que deux estuaires voisins l'Horn et la Penzé nous paraissaient très similaires de par leurs caractéristiques agricoles. L'approche moléculaire a permis cependant de clairement différencier les deux hydrosystèmes. Les flets de l'Horn présentant des signatures nettement plus fortes de réponse aux polluants organiques et aux engrais azotés, relativement aux poissons de la Penzé. Nous pensons que cette différence est liée principalement à l'état du bocage, relativement bien conservé dans le BV de la Penzé, qui joue un rôle majeur pour réduire les flux de nutriments et polluants de la terre à l'estuaire.

Dans le cadre de notre seconde étude (ECOEST), les hydrosystèmes étudiés étaient principalement eutrophisés par l'agriculture. Là encore, la protéomique a permis de différencier et de hiérarchiser les stressseurs au sein de ces systèmes, à première vue semblables. Nous avons pu ségréger quatre hydrosystèmes adjacents, en prenant en compte les variations sur les possibles réponses du poisson aux stressseurs (voies de détoxification, réponse à l'hypoxie, modulation du taux d'activité métabolique, réponse immunitaire, altération du cycle de l'urée, réponse au stress thermique).

A notre connaissance, aucun **diagnostic** aussi complet n'avait été réalisé sur les 11 estuaires étudiés. Ainsi, nous pensons que nos résultats ont le potentiel d'orienter les futures stratégies de **gestion** et de **restauration** de ces écosystèmes. Dans ce contexte, nous travaillons actuellement avec les **acteurs locaux** des bassins versants et de la gestion de l'eau, tels que les Syndicats d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SAGE), afin d'identifier en collaboration étroite avec eux les marqueurs les plus pertinents pour estimer la qualité écologique des hydrosystèmes bretons.

4. Articles

4.1. Intégration des signatures environnementales et des approches omiques sur le Flet pour aider à l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes estuariens en Bretagne

Ci-dessous l'article, "Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France", publié dans "Science of the Total Environment" (Figure 28).

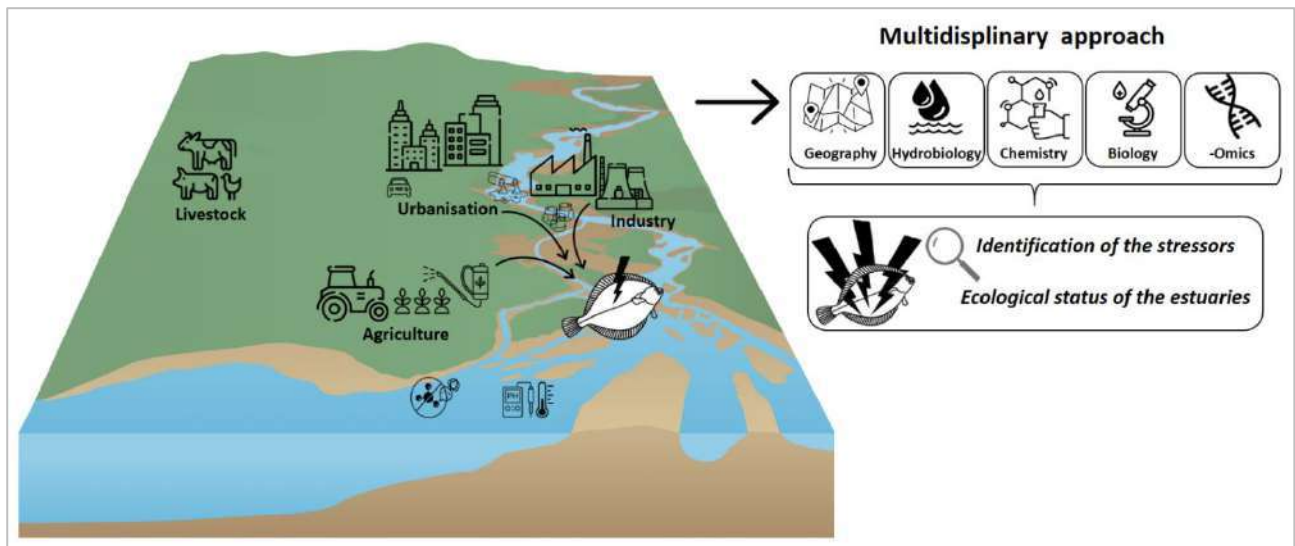
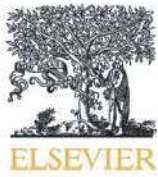
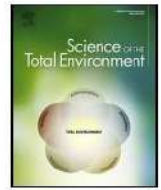


Figure 28. Résumé graphique de l'article "Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France". © Laurent *et al.* (2023)



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv

Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France



Jennifer Laurent^{a,b,*}, Iwan Le Berre^c, Jean Armengaud^d, Senthilkumar Kailasam^{e,f}, Jérôme Couteau^g, Matthieu Waeles^a, Stéphane Le Floch^b, Jean Laroche^a, Vianney Pichereau^{a,*}

^a LEMAR UMR 6539 CNRS/UBO/IRD/Ifremer, IUEM-Université de Bretagne Occidentale, Rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

^b CEDRE, 715 rue Alain Colas, 29200 Brest, France

^c LETG-Brest GEOMER, UMR 6554 CNRS, IUEM-Université de Bretagne Occidentale, Rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

^d Laboratoire Innovations Technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRAe, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

^e Canadian Centre for Computational Genomics, McGill University, Montreal, Quebec H3A 0G1, Canada

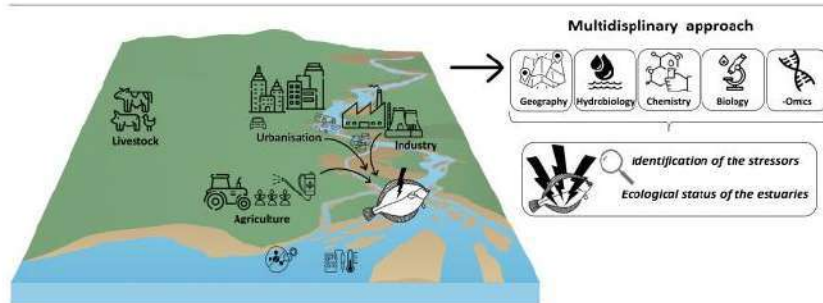
^f Department of Human Genetics, McGill University, Montréal, Québec, Canada

^g TOXEM, 12 rue des 4 saisons, 76290 Montivilliers, France

HIGHLIGHTS

- Multidisciplinary approach to assess the ecological status of six estuaries
- Biomarkers assessed in flounders caught in estuaries showing contrasted stressors.
- Transcriptomics and proteomics highlighted the deregulation of proteins and genes.
- Xenobiotic detoxification, hypoxia, urea cycle, metabolic activity are deregulated.
- Identification of the main environmental stressors within each hydrosystem

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Editor: Daniel Wunderlin

Keywords

Land use
Estuarine water quality
Hypoxia
Pollutants
Transcriptomics and shotgun proteomics
Platichthys flesus

ABSTRACT

This study aimed to develop a multidisciplinary approach to assess the ecological status of six moderate-sized French estuaries. For each estuary, we gathered geographical information, hydrobiological data, chemistry of pollutants and fish biology, including integration of proteomics and transcriptomics data. This integrative study covered the entire hydrological system studied, from the watershed to the estuary, and considered all the anthropogenic factors that can impact this environment.

To reach this goal, European flounder (*Platichthys flesus*) were collected from six estuaries in September, which ensures a minimum residence time of five months within an estuary. Geographical metrics are used to characterize land use in each watershed. The concentrations of nitrite, nitrate, organic pollutants, and trace elements were measured in water, sediments and biota. All of these environmental parameters allowed to set up a typology of estuaries.

Classical fish biomarkers, coupled with molecular data from transcriptomics and shotgun proteomics, highlighted the flounder's responses to stressors in its environment. We analysed the protein abundances and gene expression levels in the liver of fish from the different estuaries. We showed clear positive deregulation of proteins associated with xenobiotic detoxification in a system characterized by a large population density and industrial activity, as well as in a predominantly agricultural catchment area (mostly cultures of vegetables and pig breeding) mainly impacted by pesticides. Fish from the latter estuary also displayed strong deregulation of the urea cycle, most probably related to high nitrogen load. Proteomic and transcriptomic data also revealed a deregulation of proteins and genes related to

* Corresponding authors.

E-mail addresses: jennifer.laurent@univ-brest.fr (J. Laurent), vianney.pichereau@univ-brest.fr (V. Pichereau).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163195>

Received 24 January 2023; Received in revised form 21 March 2023; Accepted 27 March 2023

Available online 31 March 2023

0048-9697/© 2023 Elsevier B.V. All rights reserved.

the response to hypoxia, and a probable endocrine disruption in some estuaries. Coupling these data allowed the precise identification of the main stressors interacting within each hydrosystem.

1. Introduction

Estuaries are highly vulnerable ecosystems exposed to endogenic- and exogenic- pressures (Elliott, 2011). The endogenic pressures originating within the estuary are related to demography, urbanisation, industry, or agriculture. In contrast, exogenic pressures depend on external factors outside of the estuary. These pressures are related to global change and result in alterations in thermal, salinity, or flow regimes. These endogenic and exogenic pressures strongly influence estuarine health through a loss in biodiversity (Elliott, 2011) and a general decrease in transitional water quality (e.g. eutrophication, pollution).

Assessing the health of estuaries is made difficult by the intrinsic heterogeneity and by the multiple pressures these ecosystems have to face. Both of these factors are related to the size of estuaries. Indeed, small estuaries are less subjected to human alterations due to the construction of harbours, dikes, dredging or channelization, for example, which can cause habitat loss. Thus, small estuary alteration is mainly due to water quality degradation resulting from human activities in the surrounding watersheds. Therefore, in small estuaries, the level of anthropization can be efficiently measured by assessing the impact of eutrophication and pollution in water, sediments, and biota.

Environmental heterogeneity is reduced in small systems, relative to large ones, because environmental gradients are limited (Elliott, 2011; Vasconcelos et al., 2015). Small estuaries within a given region are comparable except their stressors that may be specific, which should facilitate the comparison of biota responses in these different systems. Furthermore, intra-estuarine and inter-individual variability in fish response to its environment is significantly lower in small estuaries than in larger ones; the diversity of microhabitats for juvenile fish is more reduced in small systems (Doubleday et al., 2015). This smaller inter-individual variability therefore allows: (1) to implement the new omics-based tools efficiently on fewer individuals per estuary and (2) to develop the omics-based approach in multi-estuary systems at a reduced cost.

In the present study, we focused on the comparison of five small estuaries located in Brittany (France), with a total catchment area between 69 and 379 km². We also included a medium-sized system, Canche, which has been used as a reference estuary in previous studies conducted over the English Channel (Laurent et al., 2022; Borcier et al., 2019). The six systems selected for this survey showed contrasting levels of stressors (pollutants, eutrophication, hypoxia, etc...) related to anthropogenic activities and land use.

The responses of the European flounder (*Platichthys flesus*) to stressors were the core of this study. For the last two decades, *P. flesus* has become a major sentinel species to assess the ecological quality of European estuaries (Amara et al., 2009; Marchand et al., 2003, 2004; Laroche et al., 2002) because of its estuarine life cycle (Dando, 2011). The flounder feeds on benthic fauna (Schückel et al., 2013; Aarnio, 2000; Aarnio et al., 1996) and lives close to the bottom sediments, where many pollutants are available (Chiffolleau, 2017; Williams et al., 2014). The flounder is also exposed to contaminants coming from water runoff over agricultural areas (Polard et al., 2011; Moreira et al., 2010), which may carry high loads of pesticides. In addition, urban effluents represent a source of environmental contamination to estuarine systems (Defo et al., 2021; Tetreault et al., 2021; Vincze et al., 2015). In the last decade, many studies in the field of stress ecology have been conducted on flounder to assess the quality of transitional waters (Laurent et al., 2022; Borcier et al., 2020; Dabrowska et al., 2017; Galland et al., 2013; Kerambrun et al., 2013; Henry et al., 2012; Evrard et al., 2010; Leaver et al., 2010; Lyons et al., 2010). In this study, juvenile flounders (young of the year, 0+ cohort) were chosen as the study model. These juveniles were sampled in October and usually recruited in May in the meso-oligohaline part of the estuary have spent five months in the estuarine

system. During this long summer period of intensive growth (total length from 3 to 9 cm), the high metabolic activity of these fish is susceptible to be altered by multiple stressors.

A deep reprogramming of gene expression and protein abundance is observed in organisms subjected to stress. Identifying these molecular alterations can provide: (i) a clear understanding of how organisms modulate their metabolism to cope with the harmful effects of stress, and (ii) information regarding the environmental conditions of the stressed organism. In the present study, we performed both transcriptomic and proteomic-based approaches on the flounder animal model, to gather information on the six estuaries studied. Omics-based approaches are used to identify the molecular effects of the whole range of environmental stressors by pinpointing disrupted molecular, biochemical or biological pathways. Shotgun proteomics allows the identification and quantification of thousands of proteins at the biochemical, physiological and organisational levels, reflecting the overall physiological state of organisms and the various stressors present in the environment (Borcier et al., 2019; Gouveia et al., 2019). Global gene expression changes can be identified by transcriptomics, highlighting mechanisms of toxic effects of contaminants (Geng et al., 2019). These approaches constitute valuable tools for the development of new reliable biomarkers for the characterization of environmental stressors (ECETOC, 2010). Finally, -omics enable a passive biomonitoring of the environment in order to raise the ecological status of ecosystems. Interpretation of omics data in real-world exposure scenarios should efficiently explore the molecular responses of fish to environmental multi-stress (Jeffrey et al., 2019; Martyniuk, 2018; Bahamonde et al., 2016), as well as to potentially identify new stressors.

The first objective of this study was to establish a precise typology of the five small estuaries through the analysis of different environmental parameters such as anthropogenic land cover, hydrobiology, sediment quality, fish chemical contamination, and fish biomarkers. This typology will allow us to identify: (i) the main stressors specific to each estuary, and (ii) a reference system less impacted than the others. The second objective was to integrate the genes and proteins expression responses of the flounder into the assessment of the health status of small estuaries, by comparing the different estuaries to a reference. With this end in view, we performed deep sequencing of RNA and released a high-quality transcriptome assembly of the flounder, and compared the differential genes expression and proteins accumulation in the livers of fish from the different estuaries. The obtained proteomic and transcriptomic data were further combined with geographic and targeted markers data, thus resulting in a very precise typology of each estuary.

2. Materials and methods

2.1. Study sites and geographical metrics

The study includes six estuaries and their watersheds (Fig. 1; Table S1). Five estuaries are located in Brittany along the French Atlantic- and the Western Channel- coasts (Penzé, Horn, Aven, Scorff, Noyal); the last one (Canche) is located in Nord-Pas-de-Calais, along the French eastern Channel coast (Fig. 1).

Eight geographic metrics were produced using reference geographic information (Table 1). Three metrics characterize the agricultural pressure. The first metric quantifies the livestock per watershed based on the livestock unit total alimentation index. This index, provided by the database Agreste maintained by the Ministry of Agriculture, allows the comparison of different livestock species based on the number of rations they consume. The second one (Agricultural surfaces) evaluates the part of the catchment area covered by agricultural activities from the 2019 edition of Theia-land

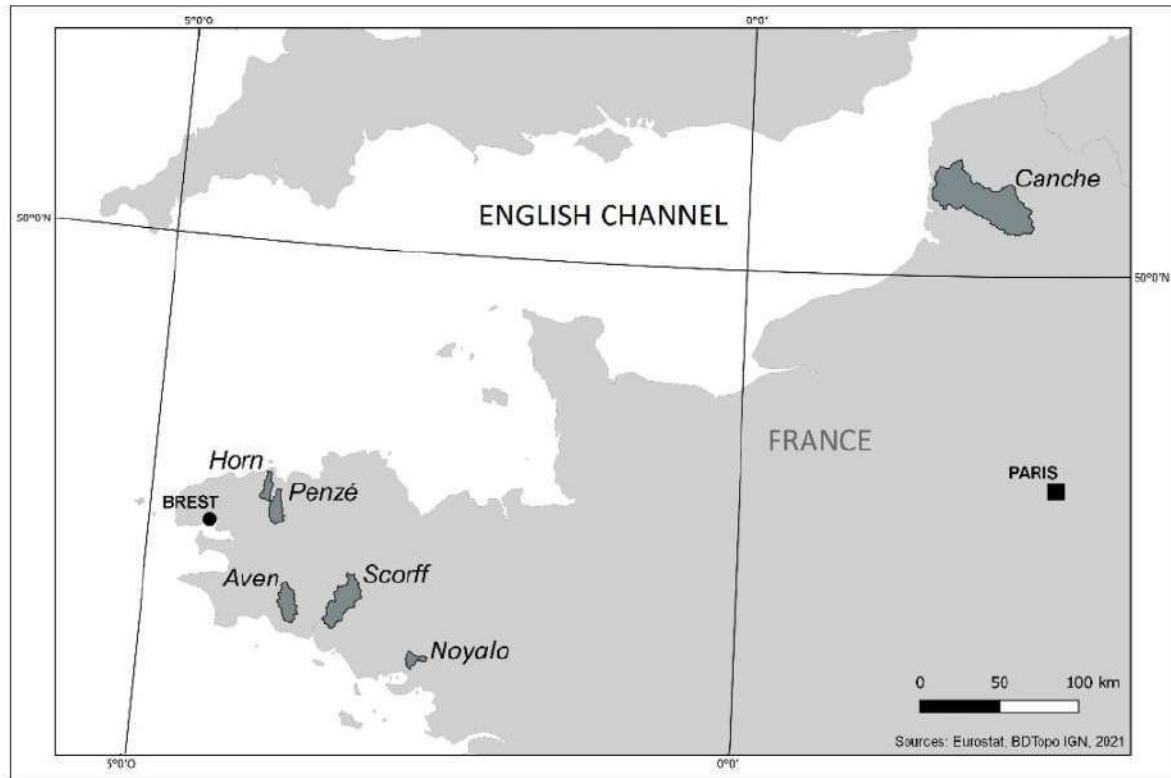


Fig. 1. Location of the studied catchments and sampled estuaries (Canche, Penzé, Horn, Aven, Scorff and Noyal) and main cities (Brest and Paris).

land use mapping from the DataTerra research infrastructure. The third (Phytosanitary treatment) provided by Agreste (Crisan, 2020; Pujol, 2015), is calculated from the annual declarations of cultivated plots to the European Union and highlights the number and the amount of phytosanitary products applied per watershed based on the Treatment Frequency Index (IFT). This metric indicates the number of doses of phytosanitary products applied per hectare during a crop year, a dose corresponding to the recommended amount to be applied during a treatment.

Urban pressure is evaluated by using two indicators (Table 1), the population density, based on INSEE Census data, and the proportion of artificial surfaces per watershed (Urbanised surfaces), based on Theia Land data.

Finally, three indicators to characterize the good ecological status of the watersheds were developed (Table 1). The first is the percentage of natural surfaces, such as forest, based on Theia-Land 2019 database. The second is the density of hedges, obtained from the OFB/IGN layer from the 2021 edition of the BDTopo database. Lastly, the percentage of riparian vegetation is calculated from the CBNB Map of major vegetation types of Brittany.

2.2. Environmental fish sampling and tissues collection

Juvenile flounders (total length range 9–11 cm) were caught between mid-September and mid-October 2018 in each system. Batches of 20 flounders were collected by electrofishing in the upstream part of the five small estuaries from Brittany, or beam trawl in the Canche. In order to avoid as much as possible an impact of the fishing technique on the subsequent analyses, the fish were sacrificed immediately after fishing, and dissected to collect the livers. Livers were immediately flash-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Fish otoliths were also collected, stripped of their membranous labyrinths and kept dry in Eppendorf tubes.

2.3. Chemical analysis

2.3.1. Nitrate and nitrite analyses

Water samples were collected at the fishing station just before fish sampling. About 15 mL of water was filtered (0.2 µm) and frozen at -20 °C until analysis. Nitrate and nitrite concentrations were determined by the

Table 1
Geographical metrics from Canche, Penzé, Horn, Aven, Scorff and Noyal estuaries.

Geographical metrics	Canche	Penze	Horn	Aven	Scorff	Noyal
Catchment area (km ²)	1399.8	76.2	146.04	193.7	378.8	69.7
Livestock (UGBTA.ha ⁻¹) ^a	51.7	285.2	362.5	187.9	144.5	93.6
Agricultural surfaces (% of catchment)	79.9	66.0	73.5	70.3	58.7	50.5
Phytosanitary treatment (IFT.catchment ⁻¹)	3.5	2.2	4.2	2.1	2.2	1.8
Population density (inhab.km ⁻²)	66.3	53.1	86.4	77.8	45.4	175.5
Urbanised surfaces (% of catchment)	7.3	8.5	18.3	10.9	7.6	19.5
Number of industrial jobs (per km ²)	6.2	5.2	6.7	8.1	3.4	51.8
Natural surfaces (% of catchment)	12.8	25.5	8.1	18.8	33.8	29.9
Hedges density (m.km ⁻²)	2237	8951	6919	9838	4999	5512
Riparian vegetation (%100 m river band)	12.4	37.4	17.7	25.4	36.7	33.3

^a UGBTA correspond to the total feed intake of the livestock, i.e. the number of animals based on their complete feed intake.

methods described by Aminot and Kérouel (2007), using a Bran + Luebbe AAIII auto-analyser.

2.3.2. Organic pollutants in sediment and fish tissue

The concentrations of 7 PBDEs, 24 PAHs and 26 PCBs were quantified in sediments and flounder tissue by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) employing a method adapted from Lacroix et al. (2014). Succinctly, for each sample, 100 mg wet weight (w.w.) of tissue was digested by saponification. Then, analytes were extracted for 16 h at 700 rpm using polydimethylsiloxane stir-bars (Twister 20 mm \times 0.5 mm, Gerstel). Bars were thereafter analysed using a gas chromatography system Agilent 7890A coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) and equipped with a Thermal Desorption Unit (TDU) combined with a Cooled Injection System (Gerstel). The GC column is a Restek Rxi-5ms (30 m, 0.25 mm, 0.25 μ m).

Analytes were assessed relative to deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 30 ng per bar. Samples were dried at 50 $^{\circ}$ C until the mass remained constant, to remove water from the tissue. Thus, results are expressed as μ g of analytes/kg dry weight (d.w.). Limits of quantification (LOQ) were calculated by the calibration curve method (Shrivastava and Gupta, 2011) and limits of detection (LOD) were estimated by dividing LOQ by three. Analytical quality control was made using the Standard Reference Materials 1974c "Organics in Mussel Tissue (*Mytilus edulis*)" provided by the National Institute of Standards (SRM) and Technology (NIST, Gaithersburg, USA).

2.3.3. Trace elements in fish muscle

Muscle samples from 10 individuals were oven-dried at 60 $^{\circ}$ C for 12 h and reduced in powder in an agate mortar. Then, approximately 50 mg of powdered material was digested for 4 h at 105 $^{\circ}$ C in closed 15-mL Teflon screw-cap vials (Savillex, Minnetonka, MN, USA) with 2 mL suprapur 65 % nitric acid (Merck, Darmstadt, Germany) and 500 μ L suprapur 30 % hydrogen peroxide (Merck, Darmstadt, Germany). Diluted mixtures (2.5 % nitric acid) were used for measurements of As and of several trace metals including Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, V and Zn, using an ICP-quadrupole mass spectrometer (X-series II, Thermo Scientific) operated at the Pole Spectrometry Ocean Brest (PSO, Brest, France). All concentrations shown in the present study were well above quantification limits while digestion blanks were below detection limits. Three certified reference materials from the National Research Council of Canada (Ottawa, ON, Canada) were used for the assessment of the method's accuracy. Reference materials included fish protein (DORM-3), dogfish liver (DOLT-5), and lobster hepatopancreas (TORT-3).

2.4. Comet assays

The comet assay was conducted on blood samples collected in 2019 for all the studied sites, except for Noyal Estuary. Assays were performed on flounder erythrocytes following the protocol detailed by Singh et al. (1988) with modifications (Laurent et al., 2022). Briefly, 10 μ L of heparinized blood was added to 1 mL of cryopreservation medium (250 mmol.L⁻¹ sucrose, 40 mmol.L⁻¹ trisodium citrate, 5 % DMSO, pH 7.6) in a cryogenic tube and immediately frozen in liquid nitrogen. Then, 10 μ L of cell suspension was mixed with 0.7 % low melting point agarose in a 1:10 (v:v) ratio and layered on pre-coated slides. Cells were lysed with a lysing solution (100 mmol.L⁻¹ EDTA, 2.5 mmol.L⁻¹ NaCl, 1 % N-Lauroylsarcosine, 10 mmol.L⁻¹ Tris, 10 % DMSO, 1 % Triton-100 \times). Electrophoresis was then conducted at 300 mA and 23 V (ca. 0.8 V.cm⁻¹) for 20 min using a cold alkaline solution (300 mmol.L⁻¹ NaOH, 1 mmol.L⁻¹ Na₂ EDTA, pH > 13). Slides were stained with SYBR[®] Gold (Invitrogen). Finally, comet cells were scored under a CellInsight CX5 HCS[®] System (Thermo) which automatically provides a standardized percent of total cellular DNA in the tail (% DNA Tail).

2.5. Trace elements in otoliths

Otoliths from five fish per estuary were used for trace elements analysis. This analysis was done on the whole otolith, corresponding to an average signature of the full life of each fish. The otoliths were extracted and cleared of their membranous labyrinth. Then, the otoliths were rinsed with milliQ water and placed in milliQ water inside an Eppendorf tube, previously treated with 10 % nitric acid. The samples were then exposed to an ultrasound bath for 5 min, transferred in a new Eppendorf tube, dried under a hood for 48 h and finally stored in a drying cabinet. Each otolith was weighed using a Mettler Toledo MX5 balance and transferred in a Teflon tube. The Teflon tubes were previously cleaned in a clean room; three times with ultrapure water and once in a 50 % ultrapure nitric acid bath for 24 h at 80 $^{\circ}$ C, and then dried in an oven for 24 h. In the clean room, 2 mL of 2.5 % ultrapure nitric acid enriched with 0.863810 ppb indium (internal standard of the samples) was added to each Teflon tube. The exact amount of acid added was measured on an accurate balance at 0.1 mg (2.16 \pm 0.06 g). Indium, chosen because not present in the carbonate pieces (otoliths), was used as an internal standard to correct for signal drift during ICP-MS analysis. A standard sample was also prepared (FEBS-1) and regularly analysed to check the accuracy of the method. For this, 11.33 mg of sagittal otolith powder from Northern red snapper (*Lutjanus campechanus*) was added to 22.24 g of nitric acid. The elemental analysis was performed using a sector field ICP-MS (Thermo Element XR), in low and medium resolution depending on the selected isotopes. In low resolution, were measured ⁷Li, ¹¹B, ⁹⁷Mo, ¹¹¹Cd, ¹¹⁸Sn, ¹²¹Sb, ¹³⁵Ba, ¹³⁸Ba, ²⁰⁸Pb and ²³⁸U. In average resolution were investigated ²⁵Mg, ⁵¹V, ⁵²Cr, ⁵⁵Mn, ⁵⁶Fe, ⁵⁹Co, ⁶⁰Ni, ⁶³Cu, ⁶⁶Zn, ⁸⁶Sr, ¹³⁸Ba and ⁷⁵As. Limits of quantification were calculated for each of the analysed isotopes based on 10 times the standard deviation of the blanks.

2.6. Isotopes in otoliths

Otoliths from ten flounders per system were used to determine the oxygen and carbon stable isotopes ratios. The otoliths were collected and stripped of their membranous labyrinth. The otoliths were then crushed in powder in an agate mortar. Next, between 50 and 200 μ g of powdered otoliths were weighed and placed in a specific glass vial for isotopic analyses. Isotopic analyses were performed using a MAT-253 (Thermo Scientific) stable isotope ratio mass spectrometer coupled with a KIEL IV Carbonate Device (Thermo Scientific). The standard deviation was calculated using an in-house homogeneous carbonate standard. It was \pm 0.03 ‰ for δ^{18} O and \pm 0.02 ‰ for δ^{13} C for this range of masses (50–170 μ g). To formulate the values in the V-PDB scale, all samples were calibrated using two international carbonate standards: NBS-19 (δ^{18} O = -2.20 ‰ and δ^{13} C = +1.95 ‰) and NBS-18 (δ^{18} O = -23.20 ‰ and δ^{13} C = -5.01 ‰).

2.7. Shotgun proteomics

2.7.1. Total protein extraction, trypsinolysis and peptides analysis by tandem mass spectrometry

Total proteins from five fish livers per estuary were analysed. A volume of 30 μ L of NuPAGE LDS 1 \times sample buffer (Invitrogen) supplemented with β -mercaptoethanol (final concentration of 2.5 %) was added to each protein extract (20 μ L). Then, each sample was diluted with water and NuPAGE LDS 3 \times (Invitrogen) depending on its protein concentration to obtain a concentration of total proteins of 1 μ g per μ L in LDS 1 \times . The samples were then heated at 99 $^{\circ}$ C for 5 min. For each sample, 30 μ g of proteins was deposited onto a NuPAGE 4–12 % gradient gel and subjected to SDS-PAGE in MES SDS running buffer (50 mmol.L⁻¹ MES (2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid), 50 mmol.L⁻¹ Tris Base, 0.1 % SDS, 1 mmol.L⁻¹ EDTA, pH 7.3) for 5 min. Each proteome was extracted as a single polyacrylamide band and processed for trypsin proteolysis as previously described (Hartmann et al., 2014), resulting in a peptides sample of 50 μ L. One-fifth of this volume was injected in a nanoscale C18 PepMap[™] 100 capillary column (LC Packings) and resolved with a 120-min gradient of

CH₃CN, 0.1 % formic acid, at a flow rate of 0.2 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Data-dependent acquisition analysis of the peptides eluting from the column was performed with a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo) operated essentially as described (Klein et al., 2016). Each full scan of peptide ions in the Orbitrap analyser was acquired from m/z 350 to 1800 at a resolution of 60,000 and with a dynamic exclusion of 10 s. Each MS scan was followed by high-energy collisional dissociation and MS/MS scans on the 20 most abundant precursor ions.

2.7.2. Proteomic data interpretation

MS/MS spectra were assigned to peptide sequences by the MASCOT Daemon 2.3.2 search engine (Matrix Science) using the *Paralichthys olivaceus* full annotated proteome database as previously described (Borcier et al., 2019). A protein was considered validated when at least two different peptides (p -value below 0.05) were detected, resulting in a protein identification false discovery rate below 1 % as verified with a reverse decoy database search. The abundance of the proteins in each condition was assessed by their spectral counts (number of MS/MS spectra per protein).

2.7.3. Proteomics data deposition

The mass spectrometry and proteomics dataset are available through the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>), under dataset identifiers PXD030900 and <https://doi.org/10.6019/PXD030900>. [The reviewers may access the currently private dataset using reviewer_pxd030900@ebi.ac.uk as Username and 2RumxXjzas as Password].

2.8. Transcriptomics

2.8.1. RNA extraction & library preparation and sequencing

Total RNA was extracted from hepatic tissue using an RNeasy extraction kit from QIAGEN®30 with a DNase cleaning step according to the manufacturer's instructions. RNA quality was measured using Nanodrop, Qubit 2.0 fluorimeter and Bioanalyzer 2100 instruments. Thirty libraries (5 replicates per group) were constructed from 1.0 μL of total RNA using the KAPA Stranded RNA-Seq kit with RiboErase from KapaBiosystems®. Ribosomal RNA was removed by depletion by DNA primer hybridization followed by treatment with RNase and DNase according to the manufacturer's instructions. The fragmentation cycle was adjusted to 10 cycles of amplification at 94 °C for 5 min to obtain fragments between 100 and 2100 bp in length. Each library was enriched with Illumina® TruSeq Index Adapters (250 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) for multiplex sequencing. Library quality was evaluated using a Qubit 2.0 fluorimeter and an Agilent Bioanalyzer 2100; good quality libraries were paired-end (PE) sequenced on an Illumina HiSeq, 4000 at Genome Quebec, Canada.

2.8.2. RNAseq assembly processing

RNA de novo assembly was carried out using the GenPipes pipeline (Bourgey et al., 2019). The paired-end reads were clipped of adaptor, trimmed for minimum quality (Q30). Trinity package was used for de novo assembly into contigs and transcripts. High quality contigs based on values in Trinotate annotations was retained. There were 115,577 unique transcripts identified. Sequence similarity searches were performed using local BLAST programs against sequences in the NCBI non-redundant (nr) protein database and the SWISS-PROT database (E -value $\leq 1\text{E-}5$). Unigenes were tentatively identified according to top hits against known sequences. The resulting unigenes were used as references for the determination of the GO term using Trinotate. Transcriptome Assembly Quality was assessed by calculating read representation on the Trinity Assembly sequence. The sample read alignment done using Bowtie2 were between 89.4 % and 92.3 %. Differential expression analysis was done using edgeR (Robinson et al., 2010) to identify differences in expression levels between the groups. Nominal p -values were corrected for multiple testing using the Benjamini and Hochberg (1995) method.

2.8.3. RNAseq data availability

The datasets generated in the current research, and RNAseq data of *P. flesus* were deposited at NCBI under BioProject accession number PRJNA799325.

2.9. Functional analysis

For each estuary, proteomic and transcriptomic datasets were subjected to a functional analysis involving a comprehensive COG (Cluster of orthologous group) classification coupled with GO (Gene Ontology) and KEGG enrichment experiments, as well as molecular network analysis using STRING v11.0 (Szklarczyk et al., 2019). These approaches aim to identify differentially regulated metabolic pathways in the different estuaries.

2.10. Statistical analysis

Statistical tests were performed in R. Normality and homoscedasticity of variances were controlled with a Shapiro-Wilk test and a Bartlett test, respectively. Since data were not normally distributed, a non-parametric Kruskal-Wallis test followed by a post-hoc Dunn test (for multiple comparisons) were applied to compare means over all the conditions. A p -value lower than 0.05 was considered as a significant difference. Data integration was performed by principal component analyses (PCA) conducted using the FactorMineR package with default settings.

3. Results & discussion

3.1. Land use in river basins

The characterization of estuarine water quality is made difficult by the diversity of inputs, whether due to human activity in the watersheds or to external factors including global changes, but also by the intrinsic heterogeneity of these systems (Elliott, 2011). One of the objectives of this work was to detect the levels of the main stressors in estuaries. We focused on five small estuaries, which are by nature less heterogeneous than the large estuaries on which we previously worked (Borcier et al., 2019; Galland et al., 2013; Pédrón et al., 2017). The five estuaries selected for this study are all located in the Brittany region, France. They display catchment areas ranging from 69 to 378 km^2 . We also included the Canche Estuary, a larger system (1400 km^2), because we systematically used it as the control (reference system) estuary in previous studies (Laurent et al., 2022; Borcier et al., 2019; Pédrón et al., 2017; Galland et al., 2013).

All the river basins were first analysed by a geographic information system (GIS) to assess their anthropogenic land use (Table 1). The Horn system is by far the most agricultural catchment, both regarding livestock (362 UGBTA. ha^{-1}) and agricultural surfaces (73.5 %) mainly devoted to an intensive production of vegetables. This catchment is also the one that is most exposed to phytosanitary treatments (4.2 IFT.catchment $^{-1}$), which is almost twice as for the other small estuaries. The Canche basin is also displaying a very high surface used for agriculture (≈ 80 %) but focused on intensive production of cereals. The agricultural surface is rather moderate in Penzé (66 %), but the breeding pressure is high in this system (285 UGBTA. ha^{-1}).

Data on population density, levels of urbanisation and industrialisation in the different catchments were also collected. The highest population density was observed in Noyal, with 175 inhabitants per km^2 . This population density is more than twice as high as that observed for Horn and Aven (86 and 77, respectively), and 2.5- to 3-times as high as those observed for Penzé and Scorff (53 and 45, respectively). This relatively high population density appeared associated with the highest occurrence of urbanised areas (19.5 % in Noyal), and a level of industrialisation that is much higher than in all the other watersheds analysed. Indeed, the average number of employees in the industrial sector is 51.8 per km^2 in the Noyal catchment, whereas this number is <10 in all other catchments studied.

Finally, several geographical metrics were collected to characterize the ecological status of the studied hydro-systems, i.e. the natural surfaces, the density of hedgerows and the riparian vegetation. Scorff is the catchment area with the highest ratio of preserved natural areas (33.7 %), followed by Noyalò (30 %), in sharp contrast to the situation observed in Horn (8.1 %). The highest hedge densities were observed for the Aven and Penzé watersheds, with almost 10 and 9 km of hedges per km² of catchment area, respectively, which is much higher than the values observed for Noyalò (5.5 km), Scorff (5 km) and especially Canche (2.2 km). The presence of riparian vegetation improves water quality and maintains ecological corridors. The highest riparian strip was recorded for Penzé (37.5 %), Scorff (36.7 %) and Noyalò (33.3 %), while the lowest ratios were found for Horn (17.7 %) and Canche (12.4 %), a catchment characterized by an open field agricultural landscape.

To better characterize these small hydrosystems, we conducted a sampling program at the limit of the upstream part of each estuary, during which we measured physico-chemical parameters of the water and fished juveniles of the European flounder. The fish condition index ($K = 100 \times (W / L^3)$ where W is the fish weight in g, and L is the total length in cm did not show significant differences between the fish populations in the six estuaries (Table S1). To improve the assessment of fish status in the different estuaries, fish molecular responses to their environments were analysed by both targeted and non-targeted (-omics) approaches taking liver as the key organ to monitor.

3.2. Chemical parameters

Ecotoxicological assessment of estuarine waters often involves the determination of chemical contaminants in water, sediments and/or in the tissues of indicator organisms. In this study, we focused chemical analyses on nitrates and nitrites, which are nitrogenous fertilizers that mainly come from agricultural activities, on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs), which generally indicate pollution of industrial origin, and on metals and metalloids, which are also often associated with human activities.

3.2.1. Nitrate, nitrite, and ammonium in estuarine water

Nitrate and nitrite concentrations in the French rivers are closely monitored by governmental authorities and we thus examined the data gathered in 2018 by DREAL Bretagne (regional office for the environment), which collects samples monthly in all the studied rivers. It is worth noting that the water samples we collected at the exact site and day of the fish capture (Table 2) displayed concentrations very close to the annual averages from the DREAL data, showing a certain stability of these concentrations over time. The highest concentrations of nitrates and nitrites were observed in Horn (59.6 mg.L⁻¹ for nitrate, and 0.49 mg.L⁻¹ for nitrite). Nitrate concentrations in Horn were 1.75-fold higher than that assayed in Penzé, >2.5-fold higher than those assayed in Aven and Scorff, and no <8.4-fold higher than the concentrations observed in Noyalò. A similar trend was observed for nitrites with 3- to 18-fold higher concentrations in Horn, as compared to Penzé, Scorff and Aven, but only 1.6-fold that observed in the Noyalò Estuary.

Nitrates and nitrites are characteristic of agricultural pressure in the watersheds, mostly resulting from soil fertilization. In such a context, it was justified to also analyse ammonium (Table 2), which displayed a rather similar pattern, i.e. concentrations 3 to 12-times higher in Horn (0.24 mg.L⁻¹) than in Penzé, Scorff and Aven (0.02 to 0.08 mg.L⁻¹). However, the Noyalò Estuary showed the highest ammonium concentrations (0.49 mg.L⁻¹). We suggest that the high concentrations of nitrite and ammonium detected particularly in the Noyalò system could be related to industrial activities and/or to the dysfunction of the water treatment plant.

3.2.2. Organic pollutants in fish tissue and sediments

The ecotoxicological assessment of estuarine water quality often involves evaluating the contamination by PAH- and PCB-type organic pollutants. We thus assayed these two families of compounds in sediments collected in each estuary at the site and the day of fish capture. However, all the collected sediment samples showed PAHs and PCBs concentrations below the limits of detection.

As these hydrophobic compounds can accumulate in organisms, we also assayed them in fish individuals' tissue. PAHs levels in flounder tissue

Table 2

Mean and standard error of chemical and biological analysis realised on samples from Canche, Penzé, Horn, Scorff and Noyalò estuaries, in 2018. (a) Nitrites, nitrates, and ammonium concentrations in water samples. (b) Organic pollutants concentrations in *P. flesus* tissue. (c) Trace elements concentrations in *P. flesus* muscle. (d) Trace elements concentrations in *P. flesus* otoliths. (e) Genotoxicity levels (Comet assay) in *P. flesus* blood cells (Statistics: Kruskal-Wallis test: p-value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries).

Chemical analysis		Canche	Penze	Horn	Aven	Scorff	Noyalò
Nitrogen concentrations (mg.L ⁻¹) in water samples*	NO3 ⁻	25.8 ± 2.3 ^(ac) (25.9) ^{**}	34.1 ± 2.9 ^(a) (39.8) ^{**}	59.6 ± 3.7 ^(b) (58.4) ^{**}	24.0 ± 4.1 ^(ac) (22.2) ^{**}	19.7 ± 1.71 ^(c) (18.2) ^{**}	7.1 ± 9.3 ^(c) (10.8) ^{**}
	NO2 ⁻	0.12 ± 0.02 ^(a) (0.10) ^{**}	0.16 ± 0.15 ^(ac) (0.17) ^{**}	0.5 ± 0.2 ^(a) (0.47) ^{**}	0.03 ± 0.01 ^(b) (0.01) ^{**}	0.03 ± 0.01 ^(bc) (0.02) ^{**}	0.31 ± 0.32 ^(a) (0.31) ^{**}
	NH4 ⁺	0.83 ± 0.03 ^(a)	0.09 ± 0.07 ^(b)	0.24 ± 0.09 ^(c)	0.03 ± 0.02 ^(ac)	0.02 ± 0.01 ^(d)	0.49 ± 0.46 ^(ac)
Organic pollutants' concentrations (ng.g ⁻¹ DW) in fish tissues	PAHs	5.04 ± 5.04 ^(ab)	ND ^(a) ^{***}	6.8 ± 6.8 ^(ab)	11.9 ± 11.9 ^(ab)	51.7 ± 37.9 ^(ab)	1130.5 ± 1091 ^(b)
	PCBs	14.4 ± 14.4 ^(ab)	457.1 ± 46.8 ^(a)	ND ^(b)	ND ^(b)	ND ^(b)	482.1 ± 148.0 ^(a)
Trace elements' concentrations (µg.g ⁻¹ DW) in fish muscle	Arsenic	11.6 ± 1.7 ^(a)	3.1 ± 0.3 ^(b)	3.5 ± 0.3 ^(bc)	5.5 ± 0.3 ^(ac)	0.8 ± 0.1 ^(d)	5.5 ± 1.9 ^(b)
	Cadmium	0.01 ± 0.005 ^(a)	0.01 ± 0.001 ^(a)	0.01 ± 0.003 ^(a)	ND ^(b)	0.01 ± 0.001 ^(a)	ND ^(b)
	Copper	1.5 ± 0.09 ^(a)	1.2 ± 0.04 ^(bc)	1.1 ± 0.04 ^(b)	1.3 ± 0.06 ^(ab)	1.2 ± 0.07 ^(b)	1.2 ± 0.2 ^(ac)
	Lead	0.03 ± 0.01 ^(a)	ND ^(b)	0.04 ± 0.02 ^(a)	0.01 ± 0.008 ^(ab)	ND ^(b)	0.1 ± 0.07 ^(a)
	Zinc	55.7 ± 2.2 ^(a)	38.1 ± 1.1 ^(b)	42.5 ± 4.0 ^(bc)	40.1 ± 0.8 ^(bc)	38.3 ± 1.8 ^(b)	45.8 ± 3.2 ^(c)
Genotoxicity level (% DNA Tail)	Comet	54.4 ± 1.5 ^(a)	39.2 ± 1.2 ^(b)	38.9 ± 1.1 ^(b)	40.8 ± 1.7 ^(b)	32.3 ± 1.5 ^(c)	NA
Trace elements' concentrations (µmol.mol ⁻¹ Ca) in fish otoliths	Manganese	2.51 ± 0.46 ^(a)	7.55 ± 0.96 ^(bc)	4.02 ± 0.79 ^(ab)	2.13 ± 0.29 ^(a)	26.83 ± 4.28 ^(c)	21.14 ± 5.98 ^(c)
	Strontium	320.7 ± 50 ^(a)	1121 ± 35 ^(bc)	950.8 ± 57 ^(bcd)	1875 ± 69 ^(b)	817.7 ± 50 ^(ac)	487.4 ± 43 ^(cd)
	Copper	0.31 ± 0.06 ^(ab)	0.59 ± 0.11 ^(ac)	0.36 ± 0.08 ^(abc)	0.16 ± 0.03 ^(b)	0.71 ± 0.15 ^(c)	0.55 ± 0.08 ^(ac)
	Zinc	1.12 ± 0.27 ^(a)	5.9 ± 0.35 ^(bc)	16.3 ± 2.9 ^(b)	11.77 ± 0.5 ^(b)	6.03 ± 1.66 ^(bc)	2.42 ± 0.29 ^(ac)
	Iron	16.78 ± 8.2 ^(ac)	1.54 ± 0.29 ^(ab)	2.34 ± 0.26 ^(abc)	1.31 ± 0.08 ^(b)	10.88 ± 5.1 ^(c)	10.61 ± 7.1 ^(c)
	Lithium	0.54 ± 0.11 ^(a)	0.69 ± 0.02 ^(bd)	1.19 ± 0.07 ^(bc)	2.51 ± 1.17 ^(c)	1.32 ± 0.22 ^(bc)	0.59 ± 0.03 ^(ad)
	Molybdenum	0.13 ± 0.06 ^(ac)	ND ^(b)	0.01 ± 0.002 ^(ab)	ND ^(b)	0.17 ± 0.11 ^(c)	0.02 ± 0.01 ^(abc)
Vanadium	0.61 ± 0.31 ^(a)	0.01 ± 0.002 ^(b)	0.03 ± 0.01 ^(ab)	0.02 ± 0 ^(bc)	1.05 ± 0.69 ^(a)	0.06 ± 0.004 ^(ac)	

* Data provided by the Regional Directorate for the Environment, Development and Housing (DREAL) of Rennes for 2018 water samples, except for Aven (2016).

** Additional values in brackets correspond to nitrites and nitrates concentrations measured the sampling day in 2018.

*** ND, not detectable.

(Table 2) revealed no significant difference between fish from the different estuaries, except for Noyalò fish that displayed higher accumulation of these compounds ($1130 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$). Similarly, measurements of PCBs in flounder tissue (Table 2) revealed significantly higher PCBs concentrations in fish from Noyalò ($482 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$) and Penzé ($457 \text{ ng.g}^{-1} \text{ DW}$), as compared to the four other estuaries. Canche is known to exhibit low levels of pesticides and organic pollutants (Belles et al., 2019). The high levels of organic pollutants measured in the Noyalò Estuary could be related to the industrialisation characterizing this system. This pollution level could also be related to a high population density coupled with heavy road traffic.

3.2.3. Trace elements in fish muscle

As an attempt to evaluate trace elements exposure, the concentrations of As, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, V and Zn were assayed by ICP-MS in the muscle of at least 10 juvenile flounders per estuary (Table 2). The greater significant differences were observed for As, with higher concentrations in fish from Canche ($11.6 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ DW}$) and Noyalò and Aven ($\approx 5.5 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ DW}$), as compared to the other small estuaries. For most of the other assayed trace elements, the Canche Estuary showed higher concentrations. For example, Cu and Zn concentrations in fish from Canche were 1.5 and $55.7 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ DW}$, respectively, i.e. about 20 % higher than the higher concentration recorded in fish from the other estuaries ($1.3 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ DW}$ for Cu in Aven, and $45.8 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1} \text{ DW}$ for Zn in Noyalò). By contrast, no clear discrimination between the small estuaries was found, but it should be noted that some of the recorded values were very low (sometimes below the detection limit).

Trace metal contaminations have already been described in Canche, likely induced by the coastal flow from the Seine Estuary due to prevailing south-west winds and north-east drift of marine waters in the English Channel (Brylinski et al., 1991). The contamination in the Seine has historically been linked to industrial discharges, domestic waste and the discharge of dredging sludge (Fisson et al., 2020; Tappin and Millward, 2015). The biogeochemical reactivity of As (Vandenhecke et al., 2010; Waeles et al., 2013) and other elements including Cd (Waeles et al., 2005b) and Cu (Waeles et al., 2005a) has been studied in the Penzé estuary. According to these studies, the Penzé system is not subject to pronounced trace elements contaminations in line with what we observed here in fish tissues. In contrast to the survey by Hauser-Davis et al. (2019) of *Dilex auriga* exposed to Fe, Zn, Cu, Mn, Cd, and Ag in Guanabara Bay, Brazil, no liver metallothionein was detected in the livers of the flounders analysed in our study.

3.3. Targeted biomarkers analyses

Fish biomarkers are commonly used to assess pollution levels in aquatic ecosystems (Amiard-Triquet and Berthet, 2015). Several targeted biomarkers were assayed in this study, such as comet assays to assess genotoxicity, and trace elements and stable isotopes on fish otoliths.

3.3.1. Comet assay

Comet assay is an efficient tool to assess genotoxic impact in aquatic environments (Frenzilli et al., 2009), by highlighting strand breaks following in vitro, in vivo and in situ exposures (Ohe et al., 2004). DNA damage was assessed in the flounder blood cells by using the comet assay (Table 2). Results were expressed as % of DNA tail. DNA damage were significantly higher in Canche (54.4 %) and lower in Scorff (32.3 %). A medium group, composed by Aven (40.8 %), Penzé (39.2 %) and Horn (38.9 %), were also significantly different from the two previously cited estuaries. Genotoxic effects can be induced by heat stress (Amiard-Triquet and Berthet, 2015; Borcier et al., 2019), metal exposure (Kousar and Javed, 2015; Naz and Javed, 2013) or organic xenobiotics exposure (Frenzilli et al., 2009). Our results thus suggest that genotoxic stress is lower in the four small Brittany estuaries, as compared to Canche.

3.3.2. Trace elements and isotopes in fish otolith

Trace elements and isotopic analyses were performed on the otoliths of ten fish per estuary. The signatures were measured in the whole otolith to integrate the full life of the animal, from its birth to its capture.

Fish otoliths can incorporate many trace elements such as Li, Sr, Ba, Mn, rare earth elements (REE), and heavy elements including Hg or Pb (Hüssy et al., 2021). Trace elements allow tracing of environmental changes and sometimes exposure to pollutants (Halden and Friedrich, 2008). Trace element analyses revealed that two elements strongly discriminated the studied estuaries, i.e. Sr and Mn.

The highest levels of Sr (Table 2) were observed in fish from Aven ($1875 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$) and the lowest for Canche ($320.7 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$). The Sr:Ca ratio in otoliths is often used as a proxy for water salinity (Panfili et al., 2015; Condini et al., 2019; Zimmerman, 2011). Our results thus indicate that flounders lived in oligohaline conditions in Canche, and in mesohaline conditions in Penzé, Horn, Scorff and Noyalò estuaries; fish from Aven showing the more salty conditions.

The highest Mn:Ca ratios (Table 2) were observed in Scorff ($26.8 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$) and Noyalò ($21.1 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$), while the lowest were found in Horn ($4.0 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$), Canche ($2.5 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$), and Aven ($2.1 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$). The Mn:Ca ratio in fish otoliths is considered as a very relevant indicator of hypoxia in water masses (Thorrold and Shuttleworth, 2011; Limburg et al., 2015). Mn levels thus indicate a well marked hypoxia for Scorff and Noyalò, a moderate one for Penzé; the other systems (Canche, Horn and Aven) could show lower frequencies of hypoxia events.

Several other trace elements were determined in the otoliths. The results for Scorff suggest a chronic metallic multi-contamination, considering Cu ($0.71 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$), Fe ($10.88 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$), Li ($1.32 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$), and Va ($1.05 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$). Zn contents in Horn ($16.3 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$) and Aven ($11.77 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$) were 14.5 times higher than in Canche ($1.12 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$). For Fe, the highest otolith level was measured in Canche ($16.78 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$), with a significant difference from Aven ($1.31 \text{ } \mu\text{mol.mol}^{-1} \text{ Ca}$).

Isotopic analyses (Fig. 2) were also performed on flounder otoliths, providing their $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ composition. Stable isotope analyses allow to determine the origin of food sources and trophic level (Peterson and Fry, 2003; Post et al., 2007), and to characterize habitat-related effects (Blazer et al., 2014). The $\delta^{18}\text{O}$ in otolith is commonly used as a proxy for water salinity. It can be used to trace fish movements by discriminating the salinity of water masses, by determining the salinity associated with migration (Elsdon and Gillanders, 2011; Kerr et al., 2007). The $\delta^{18}\text{O}$ has also been associated with the Sr:Ca ratio. Concordantly, the $\delta^{18}\text{O}$ signatures confirmed the results obtained with Strontium. Indeed, the Aven fish habitat showed a strong $\delta^{18}\text{O}$ signature, characteristic of a saltwater environment, unlike the Canche habitat which displayed a weak $\delta^{18}\text{O}$ signature, indicating a flounder desalinated environment.

The $\delta^{13}\text{C}$ in fish otoliths is also considered as a relevant proxy of the field metabolic rate (Chung et al., 2019). High metabolism is associated with high respiration and thus incorporation of higher metabolic carbon in fish biomineral showing more negative $\delta^{13}\text{C}$ values (Martino et al., 2019). In the present study, the $\delta^{13}\text{C}$ primarily reflects metabolic activity because juvenile flounders fed on essentially the same trophic level and the same prey in the different estuaries. We suggest that the most negative $\delta^{13}\text{C}$ signatures in otoliths (between -15 and -12.5), particularly detected in the Noyalò and Scorff flounder populations (Fig. 2), reveal a high rate of metabolic activity induced by the local stressors in these estuaries; the maintenance cost could be high in stressed environments and may force fish to increase their metabolic rate to maintain homeostasis and repair the damages (Sokolova, 2013). On the other hand, the less negative levels of $\delta^{13}\text{C}$ (between -7 and -5) detected in the Aven population could be related to a reduced metabolic rate, suggesting a moderately stressed environment.

3.4. Integration of the environmental signatures (geography, hydrobiology, chemistry of pollutants, fish targeted biomarkers): identification of the reference system

A principal component analysis was carried out to integrate the environmental signatures (geography, hydrobiology, chemistry of pollutants, fish

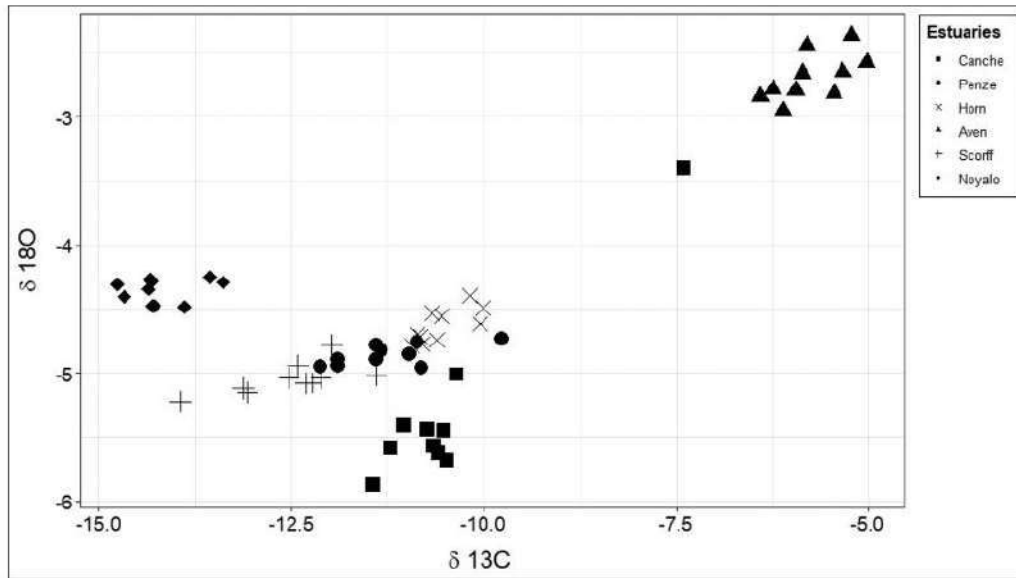


Fig. 2. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) isotopes in *P. flesus* otoliths from Canche, Penzé, Horn, Aven, Scorff and Noyalò estuaries.

targeted biomarkers) measured in the six estuaries (Fig. 3). The Horn and Canche systems were relatively close in the second quarter of the factorial plan, displaying high agriculture pressure characterized by elevated inputs of nitrogen and pesticides. More specifically, important levels of metals were detected in the Canche flounder muscle. The Noyalò basin is isolated

in the third quarter of the factorial plan; this system is impacted by industry and urbanisation producing high loads of organic pollutants and leading to hypoxia. The fourth and first quarters of the factorial plan displayed less stressed hydrosystems (Scorff, Penzé, Aven) with a higher proportion of natural habitats in these watersheds; however, the Scorff Estuary displayed

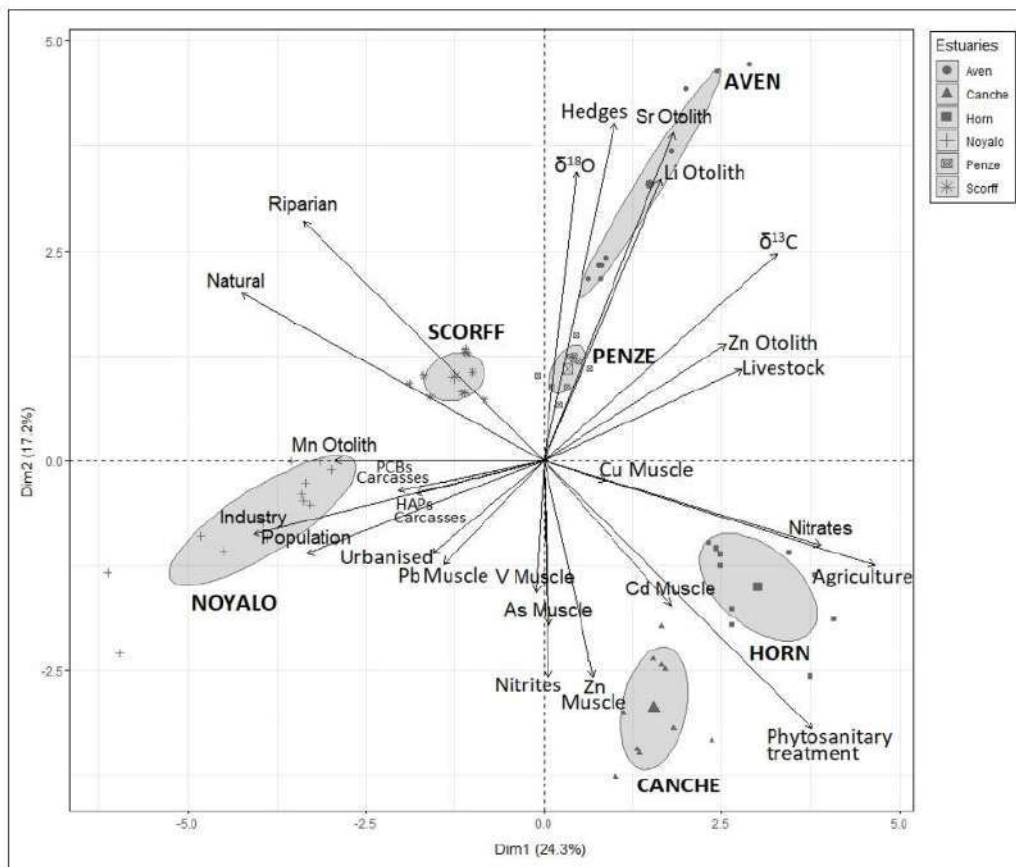


Fig. 3. Principal component analysis (axes 1 and 2). Distribution of 26 variables on the correlation circle and individuals on the factorial plan in Canche, Penzé, Horn, Aven, Scorff and Noyalò flounder population.

a significant hypoxia while the Penzé basin showed high breeding pressure. The Aven basin was located in the upper part of the factorial plan and did not seem to be affected by the previous stressors (high loads of nitrogen and pesticides, breeding pressure, metallic contamination, hypoxia, industry and urbanisation). These results suggested that Aven watershed was the less impacted of our estuaries, and we thus decided to consider it as the reference system in the omics analysis presented in the next section of the present study.

3.5. Omics analyses

3.5.1. Transcriptome analysis

We first took advantage of the exceptional capabilities of Next Generation of DNA Sequencing to perform a deep sequencing of mRNAs extracted from the livers of fish collected in each of the estuaries. More than 2.8 billion reads were sequenced, and we performed a high-quality assembly giving 303,152 contigs (N50 = 1889 bp, GC % = 46.85). After filtering, we obtained a database of 50,728 transcripts (N50 = 2658 bp, GC % = 49.17). The quality of this database was further assessed by re-aligning the 30 read libraries (5 libraries per estuary) to this database, giving alignments ranging from 89 % to 92.3 %, and its completeness was evaluated to 98.8 % by BUSCO (Simão et al., 2015).

The differential analysis was performed against the database annotated with both the non-redundant swissprot/uniprot database and the complete genome of the flatfish *Paralichthys olivaceus* (Shao et al., 2015). Considering the previous results, the data obtained for the fish caught in the Aven Estuary were used as the reference. Furthermore, the expression threshold retained was 2 fold-change and the significance threshold was 0.05.

In total, the smallest differences were observed between fish sampled from Canche Estuary, as compared to those coming from Aven, with 152 upregulated- and 113 downregulated- transcripts (Table 3). Note that Canche is the estuary we previously used as a reference (Laurent et al., 2022; Borcier et al., 2019; Galland et al., 2013). The differences are more marked for the other estuaries, with 175, 230, 239 and 236 upregulated transcripts, and 234, 258, 510 and 419 downregulated transcripts in Penzé, Horn, Noyalo and Scorff, respectively (Table 3).

3.5.2. Shotgun proteomics

In parallel to transcriptomics, we developed a global shotgun proteomics approach to identify differences between the fish sampled in the different estuaries, at the protein level. In total, >1 million (1,084,380) MS/MS spectra were recorded, which allowed identifying and monitor 2313 proteins in all samples. The comparative statistical analysis was carried out using the PatternLab software, and here again the Aven Estuary was used as the reference. We applied a *p*-value of 0.05, and an amplification (or reduction) factor (Tfold) of 1.5 as the thresholds of significance.

As for transcriptomics, the proteomic comparisons showed a smaller difference between the liver proteomes of fish from Canche and Aven, as compared to the four other estuaries (Table 3). Thirty-nine proteins were shown to be over-accumulated, and 65 were down-accumulated, in the liver of Canche fish. Larger differences were found in the other estuaries, with 118, 201, 313, 367 and 154 proteins accumulated, and 125, 104, 103 and 83 proteins with reduced abundances as compared to fish from Aven, Penzé, Horn, Noyalo and Scorff, respectively (Table 3).

Table 3

Number of deregulated proteins and genes in *P. flesus* liver from Canche, Penzé, Horn, Scorff and Noyalo estuaries.

		Canche	Penze	Horn	Scorff	Noyalo
Proteomics	Up-regulated	39	118	201	154	313
	Down-regulated	65	125	104	83	103
Transcriptomics	Up-regulated	152	175	230	286	239
	Down-regulated	113	234	258	419	510
Proteomics and transcriptomics	Up-regulated	0	1	3	9	22
	Down-regulated	2	3	5	3	14

This is not easy to interpret these differences in the number of deregulated proteins and transcripts between the different estuaries. Indeed, one could argue that these numbers should be proportional to the intensity of the stresses experienced by the organisms; such an interpretation would be valid if we had an unstressed control but seems irrelevant in our conditions where all fish were collected *in natura* (implying that even the reference fish were subjected to stress). Therefore, this is better to wait for the qualitative functional analysis of the differentially accumulated proteins and transcripts to draw conclusions.

3.5.3. Functional re-annotation and COG classification

Organisms continually adapt their functioning according to the environmental conditions. This means that conversely, the metabolic modifications observed in an organism reflect the nature of its environment. Functional analysis makes it possible to determine the main metabolism modifications in fish sampled in the different estuaries. To this end, the sequences of all of the deregulated proteins and transcripts were retrieved, and were re-annotated using Blast2GO and EggNOG (Conesa et al., 2005; Powell et al., 2014), followed by a careful manual re-examination.

A first functional analysis based on COGs (Clusters of Orthologous Groups) (Fig. S1) classification showed that most of the deregulated transcripts are implied in signal transduction mechanisms (COG category T). Indeed, these transcripts represented 17.7 % to 43.3 % of the subsets of downregulated transcripts, and 19.3 to 29.6 % of the upregulated ones, whatever the estuary from which fish originated. Only the K (Transcription) category appeared significantly enriched (15.1 %) in the downregulated transcripts in Scorff fish. Only small differences were observed between the other categories at this step.

As for transcriptomics, we performed a COGs-based functional analysis of the different subsets of proteins (Fig. S2). This study revealed more functional diversity than the transcriptomics one. In Canche, we showed the dominance of categories O (18 %, proteins modifications/turnover) and G (15.4 %, carbohydrates transport and metabolism) among the accumulated proteins, while category E (18.5 %, amino acids transport and metabolism) strongly dominated the down-regulated proteins. In fish from Penzé, there was no marked trend in accumulated proteins, with three categories (A, C, O) ranging from 10.2 to 11.9 % of the proteins, but a significant fraction of the down-regulated proteins belonged to categories U (19.2 %, intracellular trafficking) and O (16.8 %). In fish from Horn, we observed that the dominant proteins (15.4 %) belonged to category C (Energy production and conversion), while category T (signal transduction) dominated (also 15.4 %) the down-regulated proteins. Finally, a clear dominance of proteins belonging to the category I (lipid transport and metabolism) was observed in the proteins accumulated in fish sampled in Noyalo (18.8 %) and Scorff (20.9 %), while among the proteins under accumulated in fish from Noyalo, we did not see a clear trend (the 3 categories E, O and G were at around 10 %). The situation was quite different in the proteins in Scorff fish livers, in which the O category appeared enriched (14.6 %).

3.5.4. Network and enrichment analyses

To identify more precisely the metabolic changes in fish recovered from each estuary, we performed STRING network and KEGG enrichment analyses on each of the up and down subsets, derived from proteomics and transcriptomics (Table S2), giving a truly integrated analysis of molecular metabolic moves in the livers of fish from each estuary. Following STRING analysis, all the identified genes and proteins were subjected to functional reannotation by using EGGNOG, Gene Ontology (GO)-based analysis, and careful manual examination. These efforts allowed to further characterize the deregulation of certain metabolisms.

3.5.4.1. Omics signatures reveal fish exposure to xenobiotics in the Horn and Noyalo estuaries. Most molecular biomarkers used in ecotoxicology rely on detoxification mechanisms set up by organisms in response to xenobiotic compounds especially exacerbated in liver. These biotransformation processes are generally classified into two phases (Hassan et al., 2015). The Phase I mechanisms mainly involve Mixed Function Oxidases (MFOs),

Table 4

List of the deregulated proteins related to the xenobiotics detoxification in *P. flesus* liver from Canche, Penzé, Horn, Scorff and Noyalò estuaries.

GO:0009410	Accession	Name	GO term	Canche	Penzé	Horn	Scorff	Noyalò
Phase I xenobiotics detoxification processes	XP_019950625.1	NADPH-cytochrome P450 reductase	x	-	-	2.95	-	3.58
	XP_019935791.1	Cytochrome P450 1A1	-	-	2.47	2.40	-	7.00
	XP_019951492.1	Cytochrome P450 3A40-like	x	-	-	2.35	1.90	3.05
	XP_019957767.1	Cytochrome P450 2B4-like isoform X1	-	-	-	1.55	-	1.59
	XP_019957775.1	Cytochrome P450 2F2-like	-	-	-	2.17	-	-
	XP_019943606.1	Cytochrome P450 2G1-like	-	-	-2.08	2.08	-1.92	-
	XP_019936473.1	Cytochrome P450 2J2-like	-	-	-	1.67	-	-
	XP_019936553.1	Cytochrome P450 2J5-like	-	-	-	3.16	1.84	2.58
	XP_019936176.1	Cytochrome P450 2J6-like	-	-	-	2.18	-	2.73
	XP_019963410.1	Cytochrome P450 2K1-like	-	-	-	1.50	-	2.03
	XP_019962049.1	Cytochrome P450 4V2	-	-	-	2.76	2.16	3.08
	XP_019936740.1	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5-like	x	-	-	2.50	2.25	2.89
	XP_019947084.1	Epoxide hydrolase 1	x	-	-	2.08	1.50	1.96
	Phase II xenobiotics detoxification processes	XP_019947438.1	Glutathione S-transferase A4-like	x	1.59	-	-	-
XP_019945879.1		Glutathione S-transferase A-like	-	-	-	-	-	1.99
XP_019954821.1		UDP-glucuronosyltransferase 2A2-like	x	-	-	1.90	1.50	2.70
XP_019952519.1		UDP-glucuronosyltransferase 2C1-like isoform X1	-	-	-	3.38	-	3.00
XP_019945518.1		UDP-glucuronosyltransferase-like	x	-	-	1.68	1.51	1.70
XP_019941573.1		Glutathione reductase, mitochondrial isoform X1	-	-	-	2.00	-	-
Methionine cycle	XP_019937145.1	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1-like	-	-	-	-	-	-1.72
	XP_019954766.1	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1-like	-	-	-1.65	-1.78	-2.38	-4.46
	XP_019967225.1	Adenosylhomocysteinase	-	-	-	-	-1.59	-2.19
	XP_019965459.1	S-adenosylmethionine synthase	-	-	-	-1.60	-	-1.95
	XP_019956582.1	S-adenosylmethionine synthase isoform X1	-	-	-	2.00	2.30	3.20
	XP_019953264.1	S-adenosylmethionine synthase-like	-	-1.67	-	-2.12	-	-1.70
Other metabolisms	XP_019938370.1	Methionine synthase	-	-	1.54	1.92	-	2.31
	XP_019958526.1	4-Aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	x	-2.06	-	-1.64	-1.50	-2.00
	XP_019938010.1	5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit alpha-1	x	-1.55	-	-	-	-
	XP_019937416.1	78 kDa glucose-regulated protein	x	-	-1.55	-	-	-
	XP_019965324.1	Arginase, hepatic-like	x	-1.67	-	-	-	-
	XP_019952912.1	Argininosuccinate lyase isoform X1	x	-	-	2.18	-	1.65
	XP_019939330.1	Arsenite methyltransferase	x	-1.84	-1.51	-1.62	-1.58	-1.55
	XP_019944660.1	Canalicular multispecific organic anion transporter 1	x	-	-	-	-	2.00
	XP_019967817.1	Canalicular multispecific organic anion transporter 1-like, partial	x	-	-	-	-	1.58
	XP_019960875.1	Casein kinase 1 isoform X1	x	-	-1.64	-	-	-
	XP_019945788.1	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase	x	-	-	-1.69	2.67	2.89
	XP_019965504.1	Dihydropyrimidinase-related protein 2	x	-	1.58	-	-	-
	XP_019950038.1	Dynamin-2 isoform X1	x	-	-2.00	-1.89	-	-
	XP_019951003.1	Fibrinogen alpha chain	x	-	-	1.61	-	-
	XP_019947301.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	x	-	-	-2.00	-	-
	XP_019955942.1	Long-chain-fatty-acid-coa ligase 1-like isoform X1	x	-	-	-	-	1.50
	XP_019954909.1	Proliferating cell nuclear antigen	x	-1.93	-	-2.25	-	-
	XP_019950071.1	Signal transducer and activator of transcription 5B-like	x	-	-1.52	-1.52	-1.67	-2.19
	XP_019956747.1	S-methyl-5'-thioadenosine phosphorylase	-	-	-	-	-	-1.5
	XP_019958119.1	Valacyclovir hydrolase	x	-	-	-1.69	-2.08	-2.08
XP_019937714.1	Vitamin K-dependent gamma-carboxylase isoform X1	x	-	-	3.17	-	-	

which require the coordinated action of a cytochrome P450 protein, together with a NADPH-Cytochrome P450 Reductase (Livingstone, 1998). MFOs activity is a well-recognized biomarker of the presence of pollutants such as PAHs, PCBs and dioxins (Porte et al., 2000; Van der Oost et al., 2003).

By examining more precisely the nature of the deregulated genes and proteins (Table 4), the livers of fish caught in Noyalò and in Horn showed a clear positive deregulation of almost all xenobiotic detoxification pathways (GO:0009410) including NADPH-cytochrome P450 reductase, and the category 'drug metabolism-cytP450' (dre00982) appeared also significantly enriched in the livers of Noyalò fish. One NADPH-Cytochrome P450 Reductase appeared significantly positively deregulated in fish from Horn and Noyalò (almost 3- and 3.6-fold, respectively), as well as ten different isoforms of Cytochrome P450, which showed induction factors that could reach seven-fold for CYP1A1 in Noyalò. Four cytochrome P450 proteins were deregulated in fish from Scorff, only two in Penzé, and none in Canche.

A similar trend was observed with dimethylaniline monooxygenase (often called flavin-containing monooxygenase, FMO, in an ecotoxicological context) and epoxide hydrolase, two other Phase I detoxification proteins (Peters et al., 1995; Schlenk, 1998), which were also deregulated in fish from Horn and Noyalò, as well as proteins belonging to Phase II

detoxification systems (Table 4). Indeed, a glutathione S-transferase and three UDP-glucuronosyltransferases were significantly positively deregulated in Horn and Noyalò. Collectively, these data show that Noyalò most probably contains high amounts of organic xenobiotics (Persistent Organic Pollutants-type), which correlate with the higher population density in this watershed, as compared to the others. There is also a strong correlation with the higher industrial activity of the Noyalò watershed. For Horn, the deregulation of these detoxification systems most probably correlates with the big use of phytosanitary treatments for the intensive production of vegetables.

Another interesting protein is valacyclovir hydrolase, a biphenyl hydrolase-like protein (BPHL), which can convert the prodrug valacyclovir to acyclovir, but may have a broader specificity (Kim et al., 2004) and may also be involved in xenobiotic biotransformation in the liver. Of note, this protein has been shown to have a homocysteine thiolactonase activity (Marsillach et al., 2014), and thus prevent homocysteinylation of lysine residues in proteins. It could also, through its impact on homocysteine, influence the methionine cycle, which is also of particular interest in this specific context.

The methionine cycle has often been shown to be deregulated in the liver of fish exposed to xenobiotics (Galland et al., 2015). In our study, we showed a clear deregulation of this metabolism in fish from Noyalò,

Horn and Scorff (Table 4). Indeed, seven proteins involved in this cycle, i.e. two isoforms of betaine homocysteine methyl-transferase (BHMT), three isoforms of S-adenosylmethionine synthase, adenosyl homocysteinease and methionine synthase, were deregulated in fish from Noyal, five of them in those from Horn, and three in Scorff. This trend seems to follow that observed for xenobiotic detoxification enzymes, similar to what we previously observed in flounder experimentally exposed to xenobiotics (Galland et al., 2015). However, we previously showed a positive deregulation of the cycle, thus suggesting a pivotal role for homocysteine in exposed fish. In the present study, the negative deregulation of BHMT, two of the SAM synthetases and adenosylhomocysteinease, together with the positive deregulation of methionine synthase, suggest that the synthesis of methionine is there privileged at the expense of homocysteine. Methylation processes are extremely important in the cell, impacting in particular epigenetic issues that are known to be important for the response to xenobiotics (Vandegheuchte and Janssen, 2011).

3.5.4.2. Omics signatures revealed fish exposure to arsenic in the Aven Estuary. Because toxic elements can bio-accumulate in organisms, we measured the concentrations of arsenic and eight trace metals in the muscles of the flounders. Only arsenic concentrations allowed to clearly discriminate the fish coming from the different estuaries. Indeed, the concentrations of arsenic appeared to be high in Canche, Aven and Scorff, while lower concentrations were found in Horn, Penzé and Scorff. We did not find clear molecular signatures of metal exposure in the livers of fish (such as metallothionein, for example). However, one protein, the arsenite methyltransferase, was under-accumulated in all our comparative analyses. This systematic decrease indicated that the protein is in fact accumulated in the liver of fish caught in our reference estuary, Aven.

Arsenic is a highly toxic element, frequently found in aquatic environments, and poses a major public health concern (Du et al., 2015). Arsenic can be present as different chemical species in the environment, including arsenite (As(III)), arsenate (As(V)), monomethylarsonic acid (MMA), and dimethylarsinic acid (DMA) (Francesconi, 1994). The biological availability and toxicological effects of arsenic depend on its chemical forms. Inorganic arsenic has a high toxicity level, whereas methylated forms of arsenic, such as MMA and DMA, are significantly less toxic (Nordstrom, 2002). Toxicity of As(III) is about 60 times higher than that of As(V), but As(V) is more bioavailable, can be biotransformed (reduced) to As(III) that bioaccumulates in fish (Du et al., 2015). Arsenite methyltransferase plays a major role in arsenic detoxification by catalyzing the biomethylation of arsenite (As(III)) to its less toxic methylated metabolites MMA and DMA, that can be further transformed to the non-toxic arsenocholine and arsenobetaine (Cui et al., 2021).

The abundance of an enzyme is often correlated with the concentration of its substrate in the environment, as well as the expression level of its corresponding gene. Therefore, our results on toxic element bioaccumulation and molecular responses in liver suggest that the arsenic present in Aven, Canche or Noyal is under different chemical species, i.e. the waters of Aven would contain more inorganic arsenic than the two other estuaries, or that Aven would be subjected to a more recent contamination than in Canche and Noyal.

The presence of arsenic may have natural origins (volcanism, weathering of rocks) or be related to numerous anthropogenic activities including mining, metallurgy, treatment of lumber or in agriculture for the treatment of grapevines and fruit trees (a use that was banned in France some 20 years ago). Most of these activities are banned or finely controlled today, and two national geological surveys dedicated to the hydrogeochemical background in Brittany, carried out in 2007 and 2017 (Brenot et al., 2007; Devau et al., 2017), aiming to assess the chemical risks in groundwater in Brittany, pointed to contamination in some sectors, but did not show any particular risk in the Aven watershed. Further research will be needed to better understand these results. Arsenic contamination could be caused by the spreading of algal sludge as a result of seaweeds exploitation. Macroalgae are used as a raw material in the food and cosmetology industries (Piwowar and Harasym, 2020). Once exploited, algal sludge is used as

fertilizer to enrich fields (Stephenson, 1968). Algae naturally concentrate arsenic and a range of metals that are incorporated into enzymes, proteins and vitamins (Wahbeh et al., 1985). Thus, seaweed exploitation could lead to arsenic or metal contamination, with transfer from algae to culture (Greger et al., 2007).

3.5.4.3. The induction of urea cycle correlates with high agricultural nitrogen load in the Horn Estuary. Note that another metabolism of interest, the urea cycle (GO:0000050), displayed strong differences among estuaries (Table 5). Indeed, no <7 proteins and genes implied in this pathway were positively deregulated in the fish caught in Horn: argininosuccinate lyase, carbamoyl phosphate synthetase (2 isoforms), argininosuccinate synthetase, ornithine carbamoyltransferase, and the citrulline/ornithine transporter. Four of these proteins were also found in the Noyal Estuary, two in Scorff and one in Penzé.

The urea cycle (UC) converts excess systemic nitrogen derived from the breakdown of nitrogen-containing metabolites, such as proteins, amino acids or ammonia itself, into urea, a disposable nitrogenous compound (Mew et al., 2017). This biochemical cycle takes place in the liver, and involves a limited number of proteins to transform excess ammonia into urea. The first two reactions take place in the mitochondria and involve carbamoyl phosphate synthetase I and ornithine carbamoyltransferase, which allows the synthesis of citrulline. It should be noted that the transcriptomic analysis showed that the genes encoding these proteins were induced 4.1 and 2.8-fold, specifically in the livers of fish collected in Horn, as well as the mitochondrial ornithine transporter (FC = 1.6). Other proteins involved in this cycle are argininosuccinate synthase, argininosuccinate lyase, and arginase. The first two proteins were also found positively deregulated in Horn (with FCs of 2.5 and 2.2, respectively). Among all these proteins, only argininosuccinate lyase was found accumulated in fish from Noyal (FC = 1.7), while arginase was found down-accumulated (FC = -1.7) in fish from Canche.

Interestingly, two isoforms of the CAD protein were found to be positively deregulated in all estuaries except Canche. CAD means Carbamoyl phosphate synthetase II, Aspartate transcarbamylase and Dihydroorotase; this protein is a trifunctional multi-domain enzyme, involved in the first three steps of pyrimidine metabolism. CAD is not strictly involved in the UC but can be activated because of UC dysregulation (Lee et al., 2018) or maybe due to UC saturation (diversion of UC intermediates). Functional classification such as Gene Ontology assigned it the GO:000050.

The physiological impact of acute exposure to nitrate/nitrite in fish is their effect on methemoglobin production (Fan et al., 1987), but there is nothing in our results to suggest such an effect in fish from the Horn. Nevertheless, the reduction of nitrate and nitrite to ammonia is a metabolism that does not exist in animals, and the link between nitrate/nitrite and animal nitrogen metabolism (in particular the urea cycle) is far from clear. However, it has been proposed that deregulation of the urea cycle may be due to nitrite exposure in *Penaeus* (Cheng and Chen, 2001). This effect is unlikely to be direct, but high levels of nitrate in the environment are likely to be associated with high concentrations of other nitrogen forms (due to NO_x reduction by plants and microorganisms), and our study suggests that urea cycling deregulation may be associated with the intensive agricultural activity (large off-ground breeding of pigs, intensive vegetable production) in the Horn Estuary. Furthermore, in this intensively cropped Horn watershed, we put forward that an active bacterial nitrate reduction activity in the sediment (Corriveau, 2009) could submit the benthic fauna of the estuary to high fluxes of nitrites and ammonium. In most fish, the great majority of N-waste is produced and excreted across the gills as ammonia, the metabolic cost of ammonia excretion being negligible (Wood, 2022). Exposed to a possible excess of ammonium at the interface water-sediment, the Horn flounder might convert most of the ammonia into urea by the urea cycle in the liver, a metabolically costly process, before excretion through the kidney.

3.5.4.4. Fish from the Penzé and Scorff estuaries display molecular signatures of hypoxia. The physico-chemical parameters measured on the same day of the

Table 5

List of the deregulated proteins and genes related to the urea cycle in *P. flesus* liver from Canche, Penzé, Horn, Scorff and Noyalo estuaries.

GO:000005	Accession	Name	Proteomics or transcriptomics	Canche	Penzé	Horn	Scorff	Noyalo
Urea cycle	XP_019937290.1	Argininosuccinate synthase	T	-	-	2.50	-	-
	XP_019941797.1	Mitochondrial ornithine transporter 1-like	T	-	-	1.59	-	-
	XP_019945179.1	Ornithine carbamoyltransferase, mitochondrial	T	-	-	2.81	-	-
	XP_019945290.1	Carbamoyl-phosphate synthetase I	T	-	-	4.06	-	-
	XP_019952912.1	Argininosuccinate lyase isoform X1	P	-	-	2.18	-	1.65
	XP_019965324.1	Arginase, hepatic-like	P	-1.67	-	-	-	-
	XP_019966168.1	CAD protein, partial	P	-	2.49	2.53	2.71	4.35
	XP_019969096.1	CAD protein-like	P	-	-	-	-	2.07
	XP_019944335.1	5-Aminolevulinatase synthase, erythroid-specific, mitochondrial-like	T	-1.61	-	-	-	-
	XP_019966936.1	CCAAT/enhancer-binding protein alpha	T	-	-	-	2.47	-
	Ammonia assimilation	XP_019959576.1	Glutamine synthetase	P	-	-	-	-
XP_019938702.1		Glutamate dehydrogenase, mitochondrial	T	2.32	3.02	-1.58	2.68	-

fishing in the estuaries showed an average temperature of 14.6 °C ± 1 °C, and an oxygen concentration ranging from 7.9 to 12 mg.L⁻¹, which is much higher than the hypoxia threshold classically retained for benthic marine organisms, i.e. 2 mg O₂.L⁻¹ (Vaquer-Sunyer and Duarte, 2008).

While no clear evidence of heat stress to the organisms in our transcriptomic and proteomic results, we clearly observed a deregulation of molecular markers associated with the response to hypoxia in some estuaries. Indeed, transcriptomic analysis revealed a negative modulation of the Hypoxia Inducible Factor 1 alpha (HIF1a) transcriptional regulator, as well as of the inhibitor of HIF1a (Table 6), in the livers of Scorff fish (with underexpression factors of 3.1 and 3.5, respectively, as compared to Aven fish). HIF1a is a central regulator governing the cellular response to hypoxia. Under normal conditions (normoxia), the HIF1a gene is constitutively expressed, but the HIF1a protein is continuously hydroxylated, ubiquitinated, and addressed to the proteasome for degradation (Kaelin and Ratcliffe, 2008). Following hypoxia, HIF1a is no more hydroxylated, accumulates and can then play its role in transcriptional regulation. The HIF1a regulon includes metabolic genes leading to a switch to fermentation, as well as genes controlling mechanisms to adapt to low oxygen concentrations, e.g. by increasing the organism vascularization (angiogenesis) and red blood cell synthesis (erythropoiesis).

HIF1a activity is mainly regulated post-transcriptionally, but several studies have suggested that a transcriptional component would be important in fish. For example, Li et al. (2017) showed that the expression levels of HIF1a and its inhibitor in tilapia were extremely low in the liver compared to the brain, gill, heart and spleen. They further showed that for the longest times of exposure to hypoxia, the expression level of HIF1a was in some tissues higher in normoxia as compared to hypoxia. Another study (Rimoldi et al., 2012) on *Perca fluviatilis* showed that HIF1a expression, although strongly induced in the liver following acute exposure, was not significantly altered (or even decreased) during chronic hypoxia exposure. It should be recalled that microchemistry analyses of otoliths from fish caught in the Scorff, Penzé and Noyalo rivers showed high levels of Mn, suggesting chronic exposure to hypoxic stress. Oxygen measurements

in the water at the time of sampling showed normal oxygen concentrations in water, but the molecular changes observed in the livers of fish from these two estuaries could reflect such a chronic exposure to hypoxia. We thus examined the metabolic pathways and genes known to be regulated by the HIF1a transcription factor.

HIF1a controls angiogenesis by regulating the genes encoding Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and angiopoietin. The VEGF gene was found to be highly under-expressed in fish from the Scorff (32 fold), Penzé (3.9 fold), Noyalo (19 fold) and Canche rivers (12 fold). For angiopoietin, a contrasting situation was found with isoform 4 under-expressed in Scorff and Penzé, but more expressed in Noyalo (9 fold more than in fish from Aven), and isoform 7 which is more expressed in fish from Scorff and Penzé. Erythropoiesis is an important biological function of the liver organ, which is also regulated by HIF1a in response to hypoxia. By contrast with angiogenesis genes, erythropoietin is 5.7- and 4.2-fold more expressed in the Penzé and Scorff fish, as compared to the Aven fish. Hemoglobin is also one of the most overexpressed genes in Noyalo fish, with a 36-fold induction factor, and was also found to be over-accumulated in the proteomic analysis of Penzé fish (2.7 fold). Regarding energy metabolism, both proteomic and transcriptomic results suggested an increase in glycolytic flux in the fish from Penzé, resulting from the over-representation of glucose transport, glycerate kinase, phosphoglycerate mutase, GAPDH and glycerol 3 phosphate kinase. This orientation of metabolism, that seems specific to Penzé, could also be related to chronic hypoxia.

3.5.4.5. Major metabolic changes in fish livers reveal steroid hormones dysregulation in Scorff and Noyalo. Overall, the first network analyses revealed major changes in the metabolism of fish from Horn, Noyalo, Penzé and Scorff with a highly significant enrichment of the KEGG category 'metabolic pathways' (KEGG pathway dre01100, Table S2). Specifically, the most striking results from our first analysis showed a positive deregulation of respiratory metabolism (oxidative phosphorylation, dre00190) in Horn, and a decreased synthesis of some amino acids (A,D, E - dre00250, and G, S, T

Table 6

List of the deregulated proteins and genes related to the hypoxia in *P. flesus* liver from Canche, Penzé, Horn, Scorff and Noyalo estuaries.

	Accession	Name	Proteomics or transcriptomics	Canche	Penzé	Horn	Scorff	Noyalo
VEGF	XP_019940388.1	Vascular endothelial growth factor A-like	T	-3.59	-1.95	-	-5.03	-4.31
Angiopoietin	XP_019953953.1	Angiopoietin-related protein 3 isoform X2	T	-2.90	-	-	-	-
	XP_019953953.1	Angiopoietin-related protein 3 isoform X2	T	-3.00	-	-	-	-
	XP_019953098.1	Angiopoietin-related protein 7-like	T	-	2.90	-	3.51	-
	XP_019966323.1	Angiopoietin-related protein 4	T	-	-	-	-	3.17
	XP_019953829.1	Angiopoietin-related protein 4-like	T	-	-2.87	-	-2.87	-
	XP_019953953.1	Angiopoietin-related protein 3 isoform X2	P	-	-	-3.38	-	-
	XP_019953953.1	Angiopoietin-related protein 3 isoform X3	P	-	-	-3.89	-	-
EPO	XP_019958856.1	Erythropoietin	T	-	2.52	-	2.07	-
HIFa	XP_019953767.1	Hypoxia-inducible factor 1-alpha inhibitor	T	-	-	-	-1.80	-
	XP_019959544.1	Hypoxia-inducible factor 1-alpha-like, partial	T	-	-	-	-1.64	-
Hemoglobin	XP_019938475.1	Hemoglobin subunit beta-like	T	-	-	-	-	5.18
	XP_019938475.1	Hemoglobin subunit beta-like	P	-	2.7	-	-	-

- dre00260), and steroid hormone synthesis (dre00140). By contrast, in Noyalo and Scorff, steroid biosynthesis appeared increased, as well as the catabolic pathways of fatty acids (dre00071) and of branched-chain amino acids (V, L and I, dre00280).

Looking more precisely at the Noyalo and Scorff results, we noticed that the genes showing the highest induction factors are related to the synthesis of cholesterol (Table 7). Indeed, no <23 genes in Scorff, and 19 in Noyalo were induced, covering all the steps of this metabolic pathway, i.e. the synthesis of mevalonate, condensation of isoprene residues, cyclization of squalene to give lanosterol and its transformation into cholesterol. It is noteworthy that the major regulatory point of this pathway, i.e. the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase, displayed the highest level of induction in our transcriptomic results on Scorff (LogFC = 6.8, which corresponds to a 111-fold induction) and Noyalo (LogFC = 8, i.e. 250-fold as compared to Aven) fish. Although this protein was not detected in our proteomic analyses, 14 proteins of the metabolic pathway were also found in the Noyalo samples, and four in the Scorff samples. In the proteomics results, the first enzyme of the pathway, hydroxymethylglutaryl-CoA synthase, which is also a major point of regulation, displayed one of the highest levels of accumulation (fold changes of 6.4 and 16 in the Scorff and Noyalo fish, respectively, as compared to the levels recorded in the Aven fish).

Cholesterol synthesis dysregulation can result from exposure to dietary and environmental contaminants. Indeed, previous studies showed that this pathway is induced following exposure to BisphenolA (Li et al., 2019) or

perfluorinated alkyl substances (PFAS) in mice (Rebholz et al., 2016), or following chronic exposure to phthalates (Lee et al., 2020) in cell cultures, and may be mediated by the action of these molecules on the SREBP protein (Yan et al., 2015). In fish, upregulation of cholesterol synthesis was shown following exposure to crude oil, which contains polycyclic aryl hydrocarbons (PAHs). This was shown by transcriptomics in the early life stages of Atlantic haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) (Sørhus et al., 2017), red drum (*Sciaenops ocellatus*) (Xu et al., 2019) and mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) (Xu et al., 2016). Interestingly, exposure of the zebrafish (*Danio rerio*) also led to an increase in the cholesterol biosynthetic pathway, but resulted in a change in the concentrations of steroid hormones, i.e. androgens and oestrogens (Price et al., 2022). By fact, it should be noted that among the genes and proteins positively deregulated in our study, several are involved in the biotransformation of cholesterol to steroid hormones. For example, the gene encoding 3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase is expressed 2.9 times more in the liver of Scorff fish than in Aven ones. The corresponding protein converts testosterone into 5-alpha-dihydrotestosterone, and progesterone or corticosterone into their corresponding 5-alpha-3-oxosteroids. This protein plays a central role in sexual differentiation and androgen physiology. Another example is the gene encoding 3-keto-steroid reductase, which is also clearly linked to steroid hormone synthesis. Two isoforms of this gene were overexpressed 20.6- and 4.6-fold in Scorff fish, and one was induced 3.8-fold in Noyalo fish. It is therefore likely that the fish undergo steroid hormone perturbations in these estuaries, a hypothesis also supported by the positive deregulation

Table 7

List of the deregulated proteins and genes related to the steroids in *P. flesus* liver from Scorff and Noyalo estuaries.

	Accession	Name	Proteomics or transcriptomics	Scorff	Noyalo	
Steroids	XP_019948086.1	Farnesyl pyrophosphate synthase isoform X2	T	4.08	3.10	
	XP_019945890.1	3-Oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase 1	T	1.55	-	
	XP_019952543.1	Lathosterol oxidase	T	3.84	-	
	XP_019953344.1	Squalene synthase	T	2.77	2.44	
	XP_019954236.1	Diphosphomevalonate decarboxylase	T	3.27	2.37	
	XP_019956660.1	Mevalonate kinase	T	2.40	-	
	XP_019956737.1	Methylsterol monoxygenase 1	T	5.17	6.71	
	XP_019959570.1	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase isoform X1	T	6.30	7.43	
	XP_019959573.1	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase isoform X3	T	6.80	7.97	
	XP_019965795.1	Lanosterol synthase	T	6.04	6.31	
	XP_019967852.1	Hydroxymethylglutaryl-coa synthase, cytoplasmic isoform X1	T	2.46	1.52	
	XP_019969413.1	3-Beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase	T	2.99	2.54	
	XP_019935180.1	7-Dehydrocholesterol reductase	T	2.31	2.02	
	XP_019935180.1	7-Dehydrocholesterol reductase	T	4.81	4.00	
	XP_019941117.1	Delta(14)-sterol reductase	T	2.31	1.99	
	XP_019936533.1	3-Keto-steroid reductase	T	4.37	-	
	XP_019943013.1	Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1 isoform X1	T	2.15	-	
	XP_019965279.1	3-Keto-steroid reductase-like	T	2.20	1.91	
	XP_019969465.1	Lanosterol 14-alpha demethylase, partial	T	6.66	-	
	XP_019952077.1	1,25-Dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase, mitochondrial	T	-4.84	-	
	XP_019952077.1	1,25-Dihydroxyvitamin D(3) 24-hydroxylase, mitochondrial	T	-4.71	-	
	XP_019947060.1	Thyroxine 5-deiodinase-like	T	-6.25	-	
	XP_019934099.1	Sterol 4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	T	-	4.94	
	XP_019946631.1	Squalene monoxygenase	T	-	4.95	
	XP_019952543.1	Lathosterol oxidase	T	-	4.50	
	XP_019940770.1	Probable ergosterol biosynthetic protein 28	T	-	2.11	
	XP_019961707.1	Oestrogen receptor beta-like	T	-	1.58	
	XP_019966712.1	Sterol regulatory element-binding protein 2-like, partial	T	-	2.01	
	Steroids	XP_019965795.1	Lanosterol synthase	P	2.80	12.5
		XP_019967852.1	Hydroxymethylglutaryl-coa synthase, cytoplasmic isoform X1	P	6.40	16.10
		XP_019969438.1	Hydroxymethylglutaryl-coa synthase, cytoplasmic-like	P	3.30	6.90
		XP_019958691.1	Oxysterol-binding protein 1-like isoform X1	P	1.83	-
		XP_019953344.1	Squalene synthase	P	-	8.10
XP_019954236.1		Diphosphomevalonate decarboxylase	P	-	4.00	
XP_019956660.1		Mevalonate kinase	P	-	1.50	
XP_019962537.1		Hydroxysteroid dehydrogenase-like protein 2	P	-	1.52	
XP_019947084.1		Epoxide hydrolase 1	P	-	1.96	
XP_019947087.1		Cholesterol 24-hydroxylase	P	-	2.64	
XP_019935179.1		7-Dehydrocholesterol reductase	P	-	2.50	
XP_019941117.1		Delta(14)-sterol reductase	P	-	2.10	
XP_019934099.1		Sterol 4-alpha-carboxylate 3-dehydrogenase, decarboxylating	P	-	6.10	
XP_019943013.1		Isopentenyl-diphosphate Delta-isomerase 1 isoform X1	P	-	2.20	
XP_019969465.1		Lanosterol 14-alpha demethylase, partial	P	-	7.20	

of an oestrogen receptor beta in the Noyal fish. Furthermore, fish may be also subject to other endocrine perturbations, as suggested by the strong under expression (76 fold) of a gene encoding a thyroxine 5-deiodinase in the livers of fish from Scorff.

3.6. Updating the typologies of the studied estuaries in the light of -omics

The previous principal component analysis (PCA) compiling the environmental signatures: geography, hydrobiology, chemistry of pollutants, fish targeted biomarkers (Fig. 3) was here combined with -omics results to precisely define the typology of five small Breton estuaries.

Among the five small Breton basins, **Aven** showed the highest hedge density, a mark of the good conservation of the bocage. Agricultural pressure in the catchment is quite moderate and mainly oriented towards the production of canned vegetables, which could explain the reduced loads of nitrogen in this system. In addition, the population density is low in the watershed and the environment seems relatively free of chemical contamination. Flounders sampled in this estuary showed the lowest levels of organic pollutants and metals in their tissues, except for the arsenic that was half the one measured in Canche fish, but significantly higher compared to the other small systems. The Aven basin seems to be the least impacted as compared to the four other hydrosystems studied, thus confirming that it could be considered as a relevant reference for the flounder -omics approaches. Interestingly, our proteome and transcriptome analyses revealed very few modifications specific to Aven, except the accumulation of arsenate methyltransferase.

The **Horn** hydrosystem is characterized by a very strong agricultural pressure. Hom catchment shows high nitrate and phytosanitary treatment loads, used in small parcels devoted to intensive vegetable production (potatoes, carrots, shallots...). A large part of this system is also dedicated to livestock production, with a big density of off-ground pig farms (Canévet, 1992). These types of crops and livestock result in the massive use of pesticides and nitrogenous waste (Coulter et al., 2004; Crisan, 2020; Pujol, 2015; Sebilo et al., 2013). Interestingly, the fish sampled in Horn displayed clear -omics signatures of xenobiotics detoxification, most probably linked to pesticides exposure, and a high deregulation of the urea cycle, most probably linked to the very high nitrogen load in the estuary.

Penzé shares several characteristics with the Horn system, i.e. same cultures and pig breeding, but an agricultural pressure less marked. However, Penzé watershed strongly differed from Horn in almost all of our analyses. Especially, the fish from Penzé did not display the molecular signatures of xenobiotics and nitrogen exposure that were highly deregulated in the Horn's fish. This could be explained by the lower population density and urbanised surfaces in Penzé (1.5- and 2.2-fold lower, respectively), and by its better preservation of natural surfaces over the basin (hedges density and riparian vegetation). Indeed, it is known that hedgerows, riparian vegetation, or grassy strips influence the fate of land spreading in fields before they reach surface waters (Reichenberger et al., 2007), by intercepting excess of nutrient inputs (Viaud and Thomas, 2019), nitrates (Grimaldi et al., 2012) as well as of pesticides and phosphorus (Carlier et al., 2017; Catalogne and Hénaff, 2016). It is thus probable that the greater preservation of bocage in Penzé plays a major role in the overall estuarine water quality.

The **Scorff** watershed displays a relatively high proportion of natural habitats (wetlands and bocage). However, significant concentrations of metal contaminants (copper, zinc, iron) were measured in flounder otoliths, revealing a chronic metal contamination in this watershed. This contamination is most probably not related to activities over the river basin, but rather related to harbour activities in the Lorient harbour, downstream the estuary (de los Ríos et al., 2016; Greenfield et al., 2011). The trace element analyses also revealed a high level of manganese in the otolith from flounder caught in Scorff, suggesting frequent hypoxic events possibly linked to dairy effluents in the estuary.

The **Noyal** basin is the most urbanised system in the present study and shows a high population density and a high percentage of artificialized land. Moreover, this region is very touristic in summer, which can lead to

an overload and a dysfunction of the wastewater treatment plants (Terrier et al., 2005). Discharges from industrial and domestic sources may therefore be elevated in the estuary; they could explain (1) the high concentrations of nitrites in water samples (sampling at the end of the summer), and (2) the elevated contamination of flounder tissue by PAHs and PCBs; fish from this estuary displaying clear omics signatures of organic xenobiotics exposure.

4. Conclusion

Estuarine health assessment remains a very difficult exercise in stress ecology. In this study we compared five small-size estuarine systems from Brittany, France with an integrative approach gathering data from the geography of watersheds, water chemistry, and many aspects of the biology of the estuarine flatfish *P. flesus*, including the sequencing and assembly of a reference transcriptome for this species, and both differential transcriptomics and shotgun proteomics studies. By proceeding in this way, we aimed at gathering information relying to different spatial and time scales. Geography give a global view of the larger scale, which is essentially based on the long-term land use. By contrast, global molecular approaches such as proteomics give a snapshot of the entire fish liver metabolism, which is mostly influenced by short/mid term changes in estuarine water composition. Our overall aim was to be able to establish a high quality diagnosis of the estuaries.

The different approaches gave some convergent results (for example, the chemical and the -omic approaches both revealed the presence of arsenic in the Aven estuary). However in most cases these approaches were very complementary and made it possible to set up a very precise typology of the studied estuaries. For example, in two estuaries that are similar in their agricultural use, i.e. the Horn and the Penzé, the liver metabolism of fish were very different. Indeed, flounder from the Horn displayed strong signatures of exposure to organic pollutants and to nitrogenous fertilizers. We believe that the difference comes from the good preservation of the bocage in the Penzé watershed, suggested by the high density of hedges, which most probably limits the arrival of chemicals in the estuarine water. To our knowledge, diagnosis had never been carried out in such a complete way on the five estuaries studied. We believe that our findings have the potential to guide future management and restoration strategies for these ecosystems. In this context, we are currently working with watershed and water management stakeholders (representing the French SAGEs, 'Syndicats d'Aménagement et de Gestion des Eaux') so that our results can help them in their missions.

CRediT authorship contribution statement

Jennifer Laurent: Methodology, Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – original draft, Visualization, Project administration. **Iwan Le Berre:** Methodology, Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Jean Armengaud:** Investigation, Formal analysis, Resources, Writing – review & editing. **Senthilkumar Kailasam:** Investigation, Formal analysis, Resources. **Jérôme Couteau:** Investigation. **Matthieu Waelles:** Investigation, Resources, Writing – review & editing. **Stéphane Le Floch:** Resources, Funding acquisition. **Jean Laroche:** Conceptualization, Methodology, Validation, Data curation, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition. **Vianney Pichereau:** Conceptualization, Methodology, Validation, Data curation, Writing – original draft, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Data availability

Data will be made available on request.

Declaration of competing interest

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests: Jean

J. Laurent et al.

Science of the Total Environment 878 (2023) 163195

Laroche reports financial support was provided by Office français de la biodiversité (OFB).

Acknowledgments

This work was funded by the “Office Français de la Biodiversité” (OFB, project POPEST) and the “LTSER Zone Atelier Brest-Iroise”, CNRS and AllEnv (Project STRESS). This project was also supported by ISblue project, Interdisciplinary graduate school for the blue planet ANR-17-EURE-0015 (Project ESTUARIES), and co-funded by a grant from the French government under the program “Investissements d’Avenir”.

Many thanks to J.-C. Gaillard, M. Gallinari, E. Dabas - A. Jolivet - F. Dewilde for help in proteomics, ions-, otolith trace elements- assays, respectively. Many thanks to M. Sahuquet and P. Mazari for valuable help in the geography part of the work.

We warmly thank Jill Sutton for rereading and correcting the final manuscript.

This work also benefited from the French GDR EA “Aquatic Ecotoxicology”, framework that aims at fostering scientific discussions and collaborations for more integrative approaches.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163195>.

References

- Aarnio, K., 2000. Experimental evidence of predation by juvenile flounder, *Platichthys flesus*, on a shallow water meiobenthic community. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 246 (1), 125–138. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(99\)00175-6](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(99)00175-6).
- Aarnio, K., Bonsdorff, E., Rosenback, N., 1996. Food and feeding habits of juvenile flounder *Platichthys flesus* (L.), and turbot *Scophthalmus maximus* L. in the Åland archipelago, northern Baltic Sea. *J. Sea Res.* 36 (3–4), 311–320. [https://doi.org/10.1016/S1385-1101\(96\)90798-4](https://doi.org/10.1016/S1385-1101(96)90798-4).
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., Minier, C., 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 627 (1), 87–98. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9717-9>.
- Amiard-Triquet, C., Berthet, B., 2015. Individual Biomarkers. *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*, pp. 153–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00007-3>.
- Aminot, A., Kérouel, R., 2007. Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu.
- Bahamonde, P.A., Feswick, A., Isaacs, M.A., Munkittrick, K.R., Martyniuk, C.J., 2016. Defining the role of omics in assessing ecosystem health: perspectives from the Canadian environmental monitoring program. *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (1), 20–35. <https://doi.org/10.1002/etc.3218>.
- Belles, A., Alary, C., Rivière, A., Guillon, S., Pataut, E., Flipo, N., Franke, C., 2019. Transfer pathways and fluxes of water-soluble pesticides in various compartments of the agricultural catchment of the Canche River (Northern France). *Water* 11 (7), 1428. <https://doi.org/10.3390/W11071428>.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57 (1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X>.
- Blazer, V.S., Hoffman, J., Walsh, H.L., Braham, R.P., Hahn, C., Collins, P., Jorgenson, Z., Ledder, T., 2014. Health of white sucker within the St. Louis river area of concern associated with habitat usage as assessed using stable isotopes. *Ecotoxicology* 23 (2), 236–251. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1167-5>.
- 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. *Sci. Total Environ.* 695. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133760>.
- Borcier, E., Charrier, G., Couteau, J., Maillet, G., le Grand, F., Bideau, A., Waeles, M., le Floch, S., Amara, R., Pichereau, V., Laroche, J., 2020. An integrated biomarker approach using flounder to improve chemical risk assessments in the heavily polluted seine estuary. *J. Xenobiotics* 10 (2), 14–35. <https://doi.org/10.3390/jx10020004>.
- Bougey, M., Dali, R., Eveleigh, R., Chen, K.C., Letourneau, L., Fillon, J., Mchaid, M., Caron, M., Sandoval, J., Lefebvre, F., Leveque, G., Mercier, E., Bujold, D., Marquis, P., van Patrick, T., de Lima Morais, D.A., Tremblay, J., Shao, X., Henrion, E., Gonzalez, E., Quirion, P., Caron, B., Bouque, G., 2019. GenPipes: an open-source framework for distributed and scalable genomic analyses. *GigaScience* 8 (6), 1–11. <https://doi.org/10.1093/GIGASCIENCE/GIZ037>.
- Brenot, A., Gourey, L., Allier, D., Mascare, C., Pons, A., Chery, L., Blum, A., 2007. Identification des zones à risque de fond géochimique élevé en éléments traces dans les cours d’eau et les eaux souterraines. Cinq volumes (Bassin Artois-Picardie, Bassin Rhin-Meuse, Bassin Seine-Normandie, Bassin Loire-Bretagne, Bassin Adour-Garonne). BRGM/RP-55346-FR 774 p.
- Brylinski, J.M., Lagadeuc, Y., Gentilhomme, V., Dupont, J.P., Lafite, R., Dupeuble, P.A., Huault, M.F., Auger, Y., 1991. Le fleuve côtier: Un phénomène hydrologique important en Manche orientale. Exemple du Pas-de-Calais. *Oceanologica Acta, Special Issue*. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00268/37874/>.
- Canévet, Corentin, 1992. Le modèle agricole breton: histoire et géographie d’une révolution agro-alimentaire, 397. <http://www.theses.fr/1992REN20005>.
- Carlier, N., Catalogne, C., Dagès, C., Tournebise, J., 2017. Aménager le territoire et gérer les aménagements: les zones tampons sèches et humides, les fossés pour lutter contre les pollutions diffuses par les produits phytosanitaires dans les aires de captage. *Innov. Agron.* 57, 117–139. <https://doi.org/10.15454/1.513722668081328E12>.
- Catalogne, C., Hénaff, G.J., 2016. Guide d’aide à l’implantation des zones tampons pour l’atténuation des transferts de contaminants d’origine agricole. 69. <https://hal.inrae.fr/hal-02604919>.
- Cheng, S.Y., Chen, J.C., 2001. The time-course change of nitrogenous excretion in the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure. *Aquat. Toxicol.* 51 (4), 443–454. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)00122-3).
- Chiffolleau, J.F., 2017. La contamination chimique sur le littoral Loire-Bretagne. Résultats de 35. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00405/51617/>.
- Chung, M.T., Trueman, C.N., Godiksen, J.A., Holmstrup, M.E., Grønkjær, P., 2019. Field metabolic rates of teleost fish are recorded in otolith carbonate. *Commun. Biol.* 2 (1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0266-5>.
- Coudini, M., Pereyra, P., García, A., Saint-pierre, T., Ceni, G., Lugo, R., Fontoura, N., Vieira, J., Albuquerque, C., 2019. Use of fresh water by an estuarine-resident marine catfish: evidence from gonadal and otolith chemistry analyses. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 99 (7), 1667–1674. <https://doi.org/10.1017/S0025315419000493>.
- Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J.M., Terol, J., Talón, M., Robles, M., 2005. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* 21 (18), 3674–3676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti510>.
- Corriveau, J., 2009. Etude des concentrations toxiques dans les cours d’eau d’un bassin versant agricole. Thèse de doctorat en Sciences de l’eau. Université du Québec 137 p.
- Coulter, C.B., Kolk, R.K., Thompson, J.A., 2004. Water quality in agricultural, urban, and mixed land use watersheds. *J. Am. Water Resour. Assoc.* 40 (6), 1593–1601. <https://doi.org/10.1111/j.1752-1688.2004.tb01608.x>.
- Crisan, M., 2020. Pratiques culturales en grandes cultures 2017, IFT et nombre de traitements, AgresteChiffres et Données.
- Cui, D., Zhang, P., Li, H., Zhang, Z., Song, Y., Yang, Z., 2021. The dynamic changes of arsenic biotransformation and bioaccumulation in muscle of freshwater food fish crucian carp during chronic dietborne exposure. *J. Environ. Sci.* 100, 74–81. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.07.005>.
- Dabrowska, H., Kopko, O., Lehtonen, K.K., Lang, T., Waszak, I., Balode, M., Strode, E., 2017. An integrated assessment of pollution and biological effects in flounder, mussels and sediment in the southern Baltic Sea coastal area. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (4), 3626–3639. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8117-8>.
- Dando, P.R., 2011. Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 430, 183–196. <https://doi.org/10.3354/MEPS09116>.
- de los Ríos, A., Pérez, L., Echavarrri-Erasun, B., Serrano, T., Barbero, M.C., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Juanes, J.A., Cajaraville, M.P., 2016. Measuring biological responses at different levels of organisation to assess the effects of diffuse contamination derived from harbour and industrial activities in estuarine areas. *Marine Pollution Bulletin* 103 (1–2), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.056>.
- Defo, M.A., Mercier, L., Beauvais, C., Brua, R.B., Têtreault, G., Fontaine, A., Couture, P., Verreault, J., Houde, M., 2021. Time-dependent biological responses of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) exposed in situ to a major urban effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112483>.
- Devau, N., Lions, J., Schomburgk, S., Bertin, C., Blanc, P., Mathurin, F., Thinon-Larminach, M., Lucassou, F., Le Guern, C., Tourlière, B., Doney, C., Salquebre, D., Chretien, P., Boisson, A., Sedan, O., Gourcy, L., 2017. Etude par approche globale des fonds hydrogéochimiques des eaux souterraines sur le bassin Loire-Bretagne. BRGM/RP-67573-FR. 192.
- Doubleday, Z.A., Izzo, C., Haddy, J.A., Lyle, J.M., Ye, Q., Gillanders, B.M., 2015. Long-term patterns in estuarine fish growth across two climatically divergent regions. *Oecologia* 179 (4), 1079–1090. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3411-6>.
- Du, M., Wei, D., Tan, Z., Lin, A., Du, Y., 2015. The potential risk assessment for different arsenic species in the aquatic environment. *J. Environ. Sci.* 27, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.03.006>.
- ECETO, 2010. European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. ‘Omics in (Eco)toxicology: Case Studies and Risk Assessment. Workshop Report, No. 19.
- Elliott, M., 2011. Marine science and management means tackling exogenic unmanaged pressures and endogenic managed pressures - a numbered guide. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (4), 651–655. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.11.033>.
- Elsdon, T.S., Gillanders, B.M., 2011. Interactive effects of temperature and salinity on otolith chemistry: challenges for determining environmental histories of fish. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59 (11), 1796–1808. <https://doi.org/10.1139/F02-154>.
- Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Rafini, K., Durand, G., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 152 (3), 321–331. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.05.009>.
- Fan, A.M., Willhite, C.C., Book, S.A., 1987. Evaluation of the nitrate drinking water standard with reference to infant methemoglobinemia and potential reproductive toxicity. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 7 (2), 135–148. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(87\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0273-2300(87)90024-9).
- Fisson, C., Ait-Aïssa, S., Amara, R., Couteau, J., Laroche, J., le Roux, J., Pichereau, V., Xureb, B., 2020. Incendie du 26 septembre 2019 des installations «Lubrizon/NL-Logistique»: Quel impact sur la Seine?

- Francesconi, K.A., 1994. Biotransformation of arsenic in the marine environment. *Adv. J. Environ. Sci. Technol.* 25, 221–261.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 681 (1), 80–92. <https://doi.org/10.1016/j.mrrrev.2008.03.001>.
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., Pichereau, V., 2013. Comparisons of liver proteomes in the european flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *J. Sea Res.* 75, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.05.009>.
- Galland, C., Dupuy, C., Loizeau, V., Danion, M., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., Pichereau, V., 2015. Proteomic analysis of the european flounder *Platichthys flesus* response to experimental PAH-PCB contamination. *Mar. Pollut. Bull.* 95 (2), 646–657. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.038>.
- Geng, N., Ren, X., Gong, Y., Zhang, H., Wang, F., Xing, L., Cao, R., Xu, J., Gao, Y., Giesy, J.P., Chen, J., 2019. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals short-chain chlorinated paraffin-induced hepatotoxicity in male Sprague-Dawley rat. *Environ. Int.* 133, 105231. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105231>.
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Giffard, O., Armengaud, J., 2019. Ecotoxicoproteomics: a decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *J. Proteome* 198, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jpro.2018.12.001>.
- Greenfield, R., Wepener, V., Degger, N., Brink, K., 2011. Richards Bay harbour: metal exposure monitoring over the last 34 years. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (8), 1926–1931. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.026>.
- Greger, M., Malm, T., Kautsky, L., 2007. Heavy metal transfer from composted macroalgae to crops. *Eur. J. Agron.* 26 (3), 257–265. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.10.003>.
- Grimaldi, C., Fossey, M., Thomas, Z., Fauvel, Y., Merot, P., 2012. Nitrate attenuation in soil and shallow groundwater under a bottomland hedgerow in a european farming landscape. *Hydrol. Process.* 26 (23), 3570–3578. <https://doi.org/10.1002/HYP.8441>.
- Halden, N.M., Friedrich, L.A., 2008. Trace-element distributions in fish otoliths: natural markers of life histories, environmental conditions and exposure to tailings effluence. *Mineral. Mag.* 72 (2), 593–605. <https://doi.org/10.1180/minmag.2008.072.2.593>.
- Hartmann, E.M., Allain, F., Gaillard, J.C., Pible, O., Armengaud, J., 2014. Taking the shortcut for high-throughput shotgun proteomic analysis of bacteria. Host-bacteria interactions: methods and protocols, pp. 275–285.
- Hassan, I., Jabir, N.R., Ahmad, S., Shah, A., Tabrez, S., 2015. Certain phase I and II enzymes as toxicity biomarker: an overview. *Water Air Soil Pollut.* 226 (5), 1–8. <https://doi.org/10.1007/bf02803638>.
- Hauser-Davis, R.A., Silva-Junior, D.R., Linde-Arias, A.R., Vianna, M., 2019. Hepatic metal and metallothionein levels in a potential sentinel teleost, *Dules auriga*, from a southeastern brazilian estuary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 103, 538–543. <https://doi.org/10.1007/s00128-019-02654-6>.
- Henry, F., Filipuci, I., Billon, G., Courcot, L., Kerambrun, E., Amara, R., 2012. Metal concentrations, growth and condition indices in european juvenile flounder (*Platichthys flesus*) relative to sediment contamination levels in four eastern English Channel estuaries. *J. Environ. Monit.* 14 (12), 3211–3219. <https://doi.org/10.1039/C2EM30755K>.
- Hüssy, K., Limburg, K.E., de Pontual, H., Thomas, O.R., Cook, P.K., Heimbrand, Y., Blass, M., Sturrock, A.M., 2021. Trace element patterns in otoliths: the role of biomimicrization. *Rev. Fish. Sci. Aquacult.* 29 (4), 445–477. <https://doi.org/10.1080/23308249.2020.1760204>.
- Jeffrey, J.D., Jeffries, K.M., Suski, C.D., 2019. Physiological status of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in the Illinois River: an assessment of fish at the leading edge of the invasion front. *Comp. Biochem. Physiol. Part D Genomics Proteomics* 32, 100614. <https://doi.org/10.1016/j.cbpd.2019.100614>.
- Kaelin Jr, W.G., Ratcliffe, P.J., 2008. Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30 (4), 393–402. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.04.009>.
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., Amara, R., 2013. A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile european flounder, *Platichthys flesus*, from european estuaries. *Chemosphere* 91 (4), 498–505. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.010>.
- Kerr, L.A., Secor, D.H., Kraus, R.T., 2007. Stable isotope ($\delta^{13}C$ and $\delta^{18}O$) and Sr/Ca composition of otoliths as proxies for environmental salinity experienced by an estuarine fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 349, 245–253. <https://doi.org/10.3354/MEPS07064>.
- Kim, I., Crippen, G.M., Amidon, G.L., 2004. Structure and specificity of a human valacyclovir activating enzyme: a homology model of BPHL. *Mol. Pharm.* 1 (6), 434–446. <https://doi.org/10.1021/mp049959>.
- Klein, G., Mathé, C., Biola-Clier, M., Devineau, S., Drouineau, E., Hatem, E., Marichal, L., Alonso, B., Gaillard, J.C., Lagniel, G., Armengaud, J., Carrière, M., Chédin, S., Boulard, Y., Pin, S., Renault, J.P., Aude, J.C., Labarre, J., 2016. RNA-binding proteins are a major target of silica nanoparticles in cell extracts. *Nanotoxicology* 10 (10), 1555–1564. <https://doi.org/10.1080/17435390.2016.1244299>.
- Kousar, S., Javed, M., 2015. Pakistan veterinary journal diagnosis of metals induced DNA damage in fish using comet assay. *Pak. Vet. J.* 35 (2), 168–172 WOS: 000353175600008 WOS:000353175600008.
- Lacroix, C., le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., Guyomarch, J., 2014. Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *J. Chromatogr. A* 1349, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.04.094>.
- Laroche, J., Quiniou, L., Juhel, G., Auffret, M., Moraga, D., 2002. Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (12), 2705–2712. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211225>.
- Laurent, J., Laverne, E., Couteau, J., le Floch, S., Ouddane, B., Cachot, J., Davail, B., Clérandeau, C., Devin, S., Fisson, C., Devaux, A., Amara, R., Diop, M., Pichereau, V., Laroche, J., 2022. Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised seine estuary (France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29 (39), 59751–59769. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20000-y>.
- Leaver, M.J., Diab, A., Boukouvala, E., Williams, T.D., Chipman, J.K., Moffat, C.F., Robinson, C.D., George, S.G., 2010. Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: absence of classical exposure ‘biomarker’ signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways. *Aquat. Toxicol.* 96 (3), 234–245. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2009.10.025>.
- Lee, J.S., Adler, L., Karathia, H., Carmel, N., Rabinovich, S., Auslander, N., Keshet, R., Stettner, N., Silberman, A., Agemy, L., Helbling, D., Eilam, R., Sun, Q., Brandis, A., Malitsky, S., Itkin, M., Weiss, H., Pinto, S., Kalaora, S., Levy, R., Barnea, E., Admon, A., Dimmock, D., Stern-Ginosar, N., Scherz, A., Nagamani, S.C.S., Unda, M., Wilson III, D.M., Elhasid, R., Carracedo, A., Samuels, Y., Hannehall, S., Ruppén, E., Erez, A., 2018. Urea cycle dysfunction generates clinically relevant genomic and biochemical signatures. *Cell* 174 (6), 1559–1570. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.07.019>.
- Lee, Y.S., Lim, J.E., Lee, S., Moon, H.B., 2020. Phthalates and non-phthalate plasticizers in sediment from korean coastal waters: occurrence, spatial distribution, and ecological risks. *Mar. Pollut. Bull.* 154, 111119. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.11.1119>.
- Li, H.L., Gu, X.H., Li, B.J., Chen, X., Lin, H.R., Xia, J.H., 2017. Characterization and functional analysis of hypoxia-inducible factor HIF1 α and its inhibitor HIF1cn in tilapia. *PLoS One* 12 (3), e0173478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173478>.
- Li, Q., Zhang, H., Zou, J., Mai, H., Su, D., Feng, X., Feng, D., 2019. Bisphenol A exposure induces cholesterol synthesis and hepatic steatosis in C57Bl/6 mice by down-regulating the DNA methylation levels of SREBP-2. *Food Chem. Toxicol.* 133, 110786. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110786>.
- Limburg, K.E., Walther, B.D., Lu, Z., Jackman, G., Mohan, J., Walther, Y., Nissling, A., Weber, P.K., Schmitt, A.K., 2015. In search of the dead zone: use of otoliths for tracking fish exposure to hypoxia. *J. Mar. Syst.* 141, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.02.014>.
- Livingstone, D.R., 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 120 (1), 43–49. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9).
- Lyons, B.P., Thain, J.E., Stentiford, G.D., Hylland, K., Davies, I.M., Vethaak, A.D., 2010. Using biological effects tools to define good environmental status under the European Union marine strategy framework directive. *Mar. Pollut. Bull.* 60 (10), 1647–1651. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2010.06.005>.
- Marchand, J., Tanguy, A., Laroche, J., Quiniou, L., Moraga, D., 2003. Responses of european flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 260, 273–284. <https://doi.org/10.3354/MEPS260273>.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.T., Laroche, J., 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the european flounder *Platichthys flesus*, along the french Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70 (4), 327–343. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.011>.
- Marsilach, J., Suzuki, S.M., Richter, R.J., McDonald, M.G., Rademacher, P.M., MacCoss, M.J., Hsieh, E.J., Rettie, A.E., Furlong, C.E., 2014. Human valacyclovir hydrolase/biphenyl hydrolase-like protein is a highly efficient homocysteine thiolactonase. *PLoS One* 9 (10), e110054. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110054>.
- Martino, J.C., Doubleday, Z.A., Gillanders, B.M., 2019. Metabolic effects on carbon isotope biomarkers in fish. *Ecol. Indic.* 97, 10–16. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLIND.2018.10.010>.
- Martyniuk, C.J., 2018. Are we closer to the vision? A proposed framework for incorporating omics into environmental assessments. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 59, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.005>.
- Mew, A., Simpson, K.L., Gropman, A.L., Lanpher, B.C., Chapman, K.A., Summar, M.L., 2017. Urea Cycle Disorders Overview.
- Moreira, S.M., Moreira-Santos, M., Rendón-von Osten, J., da Silva, E.M., Ribeiro, R., Guilhemino, L., Soares, A.M.V.M., 2010. Ecotoxicological tools for the tropics: sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73 (5), 893–899. <https://doi.org/10.1016/J.JECONV.2010.04.007>.
- Naz, S., Javed, M., 2013. Growth responses of fish during chronic exposure of metal mixture under laboratory conditions. *Pak. Vet. J.* 33 (3) WOS:000321701200019 WOS: 000321701200019.
- Nordstrom, D.K., 2002. Worldwide occurrences of arsenic in ground water. *Science* 296 (5576), 2143–2145. <https://doi.org/10.1126/science.1072375>.
- Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 567 (2–3), 109–149. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2004.08.003>.
- Panfilii, J., Darnaude, A.M., Vighioli, L., Jacquart, A., Labonne, M., Gilles, S., 2015. Experimental evidence of complex relationships between the ambient salinity and the strontium signature of fish otoliths. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 467, 65–70. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2015.03.007>.
- Pédon, N., Artigaud, S., Infante, J.L.Z., Le Bayon, N., Charrier, G., Pichereau, V., Laroche, J., 2017. Proteomic responses of european flounder to temperature and hypoxia as interacting stressors: differential sensitivities of populations. *Sci. Total Environ.* 586, 890–899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.068>.
- Peters, L.D., Livingstone, D.R., Shenin-Johnson, S., Hines, R.N., Schlenk, D., 1995. Characterization of hepatic flavin monooxygenase from the marine teleost turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Xenobiotica* 25 (2), 121–131. <https://doi.org/10.3109/00498259509061838>.
- Peterson, B.J., Fry, B., 2003. Stable Isotopes in Ecosystem Studies, pp. 293–320 <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ES.18.110187.001453>.
- Piwowar, A., Harasym, J., 2020. The importance and prospects of the use of algae in agrifood. *Sustainability* 12 (14), 5669. <https://doi.org/10.3390/su12145669>.
- Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplanche, C., Merlina, G., Sánchez-Pérez, J.M., Pinelli, E., 2011. Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-West

J. Laurent et al.

Science of the Total Environment 878 (2023) 163195

- France. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2010.09.014>.
- Porte, C., Escartín, E., García, L.M., Solé, M., Albaigés, J., 2000. Xenobiotic metabolising enzymes and antioxidant defences in deep-sea fish: relationship with contaminant body burden. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 192, 259–266. <https://doi.org/10.3354/meps192259>.
- Post, D.M., Layman, C.A., Arrington, D.A., Takimoto, G., Quattrochi, J., Montaña, C.G., 2007. Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia* 152 (1), 179–189. <https://doi.org/10.1007/S00442-006-0630-X>.
- Powell, S., Forslund, K., Szklarczyk, D., Trachana, K., Roth, A., Huerta-Cepas, J., Gabaldón, T., Rattei, T., Creevey, C., Kuhn, M., Jensen, L.J., von Mering, C., Bork, P., 2014. eggNOG v4.0: nested orthology inference across 3686 organisms. *Nucleic Acids Res.* 42 (D1), D231–D239. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1253>.
- Price, E.R., Bonatesta, F., McGruer, V., Schlenk, D., Roberts, A.P., Mager, E.M., 2022. Exposure of zebrafish larvae to water accommodated fractions of weathered crude oil alters steroid hormone concentrations with minimal effect on cholesterol. *Aquat. Toxicol.* 242, 106045. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.106045>.
- Pujol, J., 2015. Enquête: Pratiques culturelles sur les légumes 2013. Nombre de traitements phytosanitaires, Agreste Les Dossiers.
- Rebholz, S.L., Jones, T., Herrick, R.L., Xie, C., Calafat, A.M., Pinney, S.M., Woollett, L.A., 2016. Hypercholesterolemia with consumption of PFOA-laced Western diets is dependent on strain and sex of mice. *Toxicol. Rep.* 3, 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.004>.
- Reichenberger, S., Bach, M., Skitschak, A., Frede, H.G., 2007. Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; a review. *Sci. Total Environ.* 384 (1–3), 1–35. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2007.04.046>.
- Rimoldi, S., Terova, G., Cuccuzzi, P., Marelli, S., Antonini, M., Saroglia, M., 2012. HIF-1 α mRNA levels in eurasian perch (*Perca fluviatilis*) exposed to acute and chronic hypoxia. *Mol. Biol. Rep.* 39 (4), 4009–4015. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1181-8>.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2010. edgeR: a bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26 (1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP616>.
- Schlenk, D., 1998. Occurrence of flavin-containing monooxygenases in non-mammalian eukaryotic organisms. *Comp. Biochem. Physiol. C: Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 121 (1–3), 185–195. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10060-9](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10060-9).
- Schickel, S., Sell, A.F., Kihara, T.C., Koepfen, A., Kröncke, I., Reiss, H., 2013. Meiofauna as food source for small-sized demersal fish in the southern North Sea. *Helgol. Mar. Res.* 67 (2), 203–218. <https://doi.org/10.1007/S10152-012-0316-1/FIGURES/3>.
- Sebilo, M., Mayer, B., Nicolardot, B., Pinay, G., Mariotti, A., 2013. Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110 (45), 18185–18189. https://doi.org/10.1073/PNAS.1305372110/SUPPL_FILE/PNAS.201305372.SL.PDF.
- Shao, C., Niu, Y., Rastas, P., Liu, Y., Xie, Z., Li, H., Wang, L., Jiang, Y., Tai, S., Tian, Y., Sakamoto, T., Chen, S., 2015. Genome-wide SNP identification for the construction of a high-resolution genetic map of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*): applications to QTL mapping of vibrio anguillarum disease resistance and comparative genomic analysis. *DNA Res.* 22 (2), 161–170. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv001>.
- Shrivastava, A., Gupta, V., 2011. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. *Chronicles Young Sci.* 2 (1), 21. <https://doi.org/10.4103/2229-5186.79345>.
- Simão, F.A., Waterhouse, R.M., Ioannidis, P., Kriventseva, E.V., Zdobnov, E.M., 2015. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics* 31 (19), 3210–3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(88\)90265-0](https://doi.org/10.1016/0014-4827(88)90265-0).
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53 (4), 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>.
- Sørhus, E., Incardona, J.P., Furmanek, T., Goetz, G.W., Scholz, N.L., Meier, S., Edvardsen, R.B., Jentoft, S., 2017. Novel adverse outcome pathways revealed by chemical genetics in a developing marine fish. *elife* 6, e20707. <https://doi.org/10.7554/eLife.20707>.
- Stephenson, W.A., 1968. *Seaweed in Agriculture and Horticulture*.
- Szklarczyk, D., Gable, A.L., Lyon, D., Junge, A., Wyder, S., Huerta-Cepas, J., Simonovic, M., Doncheva, N.T., Morris, J.H., Bork, P., Jensen, L.J., Mering, C.V., 2019. STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Res.* 47 (D1), D607–D613. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>.
- Tappin, A.D., Millward, G.E., 2015. The English Channel: contamination status of its transitional and coastal waters. *Mar. Pollut. Bull.* 95 (2), 529–550. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2014.12.012>.
- Terrier, C., Sylvander, M., Khiati, A., Moncere, V., 2005. Population présente: méthodes de détermination à partir des enquêtes sur les touristes.
- Tetreault, G.R., Kleywegt, S., Marjan, P., Bragg, L., Arlos, M., Fuzzen, M., Smith, B., Moon, T., Massarsky, A., Metcalfe, C., Oakes, K., McMaster, M.E., Servos, M.R., 2021. Biological responses in fish exposed to municipal wastewater treatment plant effluent in situ. *Water Qual. Res. J.* 56 (2), 83–99. <https://doi.org/10.2166/WQRJ.2021.031>.
- Thorold, S.R., Shuttleworth, S., 2011. In situ analysis of trace elements and isotope ratios in fish otoliths using laser ablation sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57 (6), 1232–1242. <https://doi.org/10.1139/F00-054>.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13 (2), 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6).
- Vandegheuchte, M.B., Janssen, C.R., 2011. Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* 20 (3), 607–624. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0634-0>.
- Vandenhecke, J., Waeles, M., Cabon, J.Y., Garnier, C., Riso, R.D., 2010. Inorganic arsenic speciation in the waters of the Penzé estuary (NW France): seasonal variations and fluxes to the coastal area. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 90 (4), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.09.003>.
- Vaquer-Sunyer, R., Duarte, C.M., 2008. Thresholds of hypoxia for marine biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (40), 15452–15457. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803833105>.
- Vasconcelos, R.P., Henriques, S., França, S., Pasquaudo, S., Cardoso, I., Laborde, M., Cabral, H.N., 2015. Global patterns and predictors of fish species richness in estuaries. *J. Anim. Ecol.* 84 (5), 1331–1341. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12372>.
- Viaud, V., Thomas, Z., 2019. Une réflexion Sur l'état des connaissances des fonctions du Bocage pour l'eau dans Une perspective de mobilisation pour l'action. *Sci. EauX Territoires* 30 (4), 32–37. <https://doi.org/10.3917/SET.030.0032>.
- Vincze, K., Scheil, V., Kuch, B., Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2015. Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 (15), 11822–11839. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4398-6/TABLES/3>.
- Waeles, M., Riso, R.D., le Corre, P., 2005a. Seasonal variations of dissolved and particulate copper species in estuarine waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 62 (1–2), 313–323. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2004.09.019>.
- Waeles, M., Riso, R.D., le Corre, P., 2005b. Seasonal variations of cadmium speciation in the Penzé estuary, NW France. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 65 (1–2), 143–152. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2005.06.002>.
- Waeles, M., Vandenhecke, J., Salaün, P., Cabon, J.Y., Riso, R.D., 2013. External sources vs internal processes: what control inorganic as speciation and concentrations in the Penzé estuary? *J. Mar. Syst.* 109–110 (SUPPL.), <https://doi.org/10.1016/j.jmaysys.2011.09.008>.
- Wahbeh, M.L., Mahasneh, D.M., Mahasneh, I., 1985. Concentrations of zinc, manganese, copper, cadmium, magnesium and iron in ten species of algae and sea water from Aqaba, Jordan. *Mar. Environ. Research* 16 (2), 95–102. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90011-X).
- Williams, T.D., Davies, I.M., Wu, H., Diab, A.M., Webster, L., Viant, M.R., Chipman, J.K., Leaver, M.J., George, S.G., Moffat, C.F., Robinson, C.D., 2014. Molecular responses of European flounder (*Platichthys flesus*) chronically exposed to contaminated estuarine sediments. *Chemosphere* 108, 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.028>.
- Wood, C.M., 2022. Conservation aspects of osmotic, acid-base, and nitrogen homeostasis in fish. In: Cooke, S.J., Figueira, N.A., Farrel, A.P., Brauner, C.J., Eliason, E.J. (Eds.), *Conservation Physiology for the Anthropocene - A Systems Approach Part A*. Academic Press, pp. 321–388.
- Xu, E.G., Mager, E.M., Grosell, M., Pasparakis, C., Schlenker, L.S., Stieglitz, J.D., Benetti, D., Hazard, E.S., Courtney, S.M., Diamante, G., Freitas, J., Hardima, G., Schlenk, D., 2016. Time- and oil-dependent transcriptomic and physiological responses to Deepwater Horizon oil in mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) embryos and larvae. *Environ. Sci. Technol.* 50 (14), 7842–7851. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02205>.
- Xu, E.G., Khursigara, A.J., Li, S., Esbaugh, A.J., Dasgupta, S., Volz, D.C., Schlenk, D., 2019. miRNA-miRNA-seq reveals neuro-cardio mechanisms of crude oil toxicity in red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Environ. Sci. Technol.* 53 (6), 3296–3305. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b00150>.
- Yan, S., Wang, J., Dai, J., 2015. Activation of sterol regulatory element-binding proteins in mice exposed to perfluorooctanoic acid for 28 days. *Arch. Toxicol.* 89 (9), 1569–1578. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1322-7>.
- Zimmerman, C.E., 2011. Relationship of otolith strontium-to-calcium ratios and salinity: experimental validation for juvenile salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 62 (1), 88–97. <https://doi.org/10.1139/F04-182>.

4.2. Signatures environnementales et protéomiques chez les poissons : intégration multidisciplinaire pour évaluer la qualité écologique des estuaires à l’embouchure de bassins versants agricoles

Ci-dessous, l’article “Environmental signatures and fish proteomics: a multidisciplinary integration to assess the ecological quality of estuaries in French agricultural watersheds”, en préparation (Figure 29).

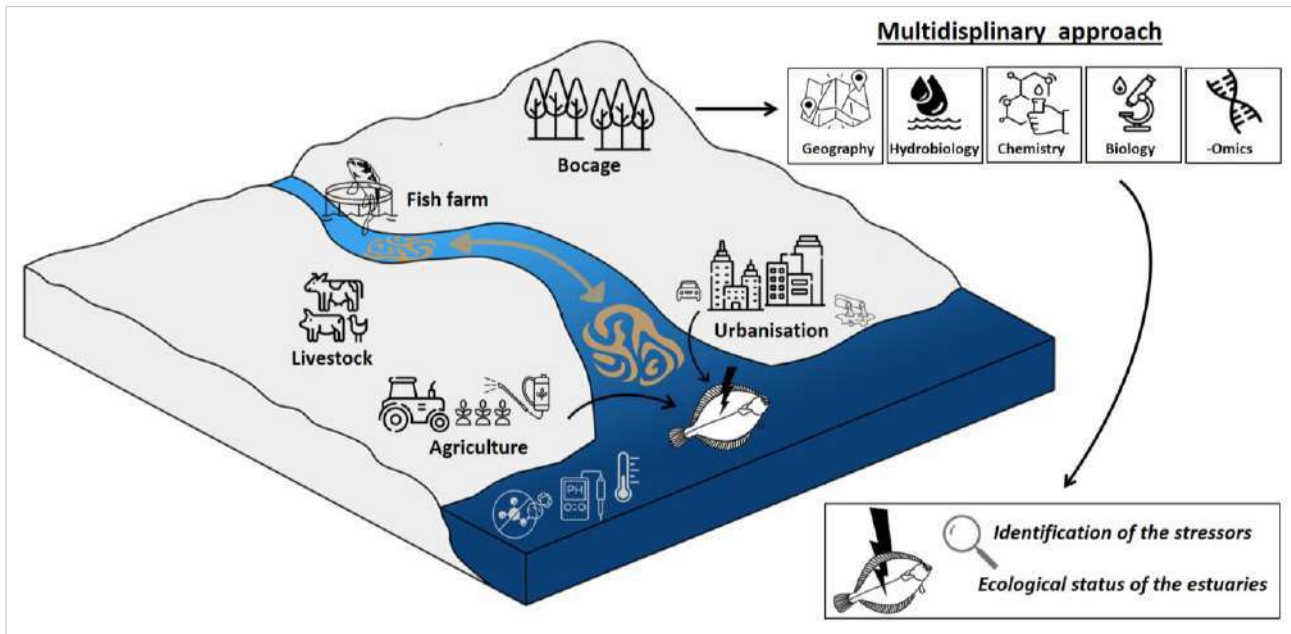


Figure 29. Résumé graphique de l’article “Environmental signatures and fish proteomics: a multidisciplinary integration to assess the ecological quality of estuaries in French agricultural watersheds”.

© Laurent *et al.* (2024b)

Environmental signatures and fish proteomics: a multidisciplinary integration to assess the ecological quality of estuaries in French agricultural watersheds

Jennifer Laurent^{1,2,*}, Iwan Le Berre³, Jean Armengaud⁴, Matthieu Waeles¹, Anthony Sturbois⁵, Stéphane Le Floch², Jean Laroche¹, Vianney Pichereau^{1,*}

¹ Univ Brest - CNRS - IRD - Ifremer, UMR 6539 LEMAR, IUEM-Université de Bretagne Occidentale, Rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

² CEDRE, 715 rue Alain Colas, 29200 Brest, France

³ Univ Brest - CNRS - IRD - Ifremer, UMR 6554 LETG-Brest GEOMER, IUEM-Université de Bretagne Occidentale, Rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

⁴ Laboratoire Innovations Technologiques pour la Détection et le Diagnostic (Li2D), Service de Pharmacologie et Immunoanalyse (SPI), CEA, INRAe, F-30207 Bagnols-sur-Cèze, France

⁵ Vivarmor Nature, Réserve naturelle nationale de la Baie de Saint-Brieuc, Ploufragan, France

* corresponding authors: jennifer.laurent@univ-brest.fr ; vianney.pichereau@univ-brest.fr

Abstract

In this paper, we develop a multidisciplinary approach to assess the ecological condition of seven small French estuaries. For each system studied, we collected data on geography, hydrobiology, pollutant chemistry and fish biology, from biomarkers to proteomics. This integrative approach focused on the whole hydrosystem, *i.e.* from the watershed to the estuary. All the anthropic factors that can have a potential impact on the hydrosystems were therefore considered.

To characterize each estuary, we determined the land use in each watershed using geographic indicators. Juveniles of European flounder (*Platichthys flesus*) were also captured in September in the estuaries. The fish thus lived at least five months in the estuary. Analyses in water, sediments and biota allowed to determine the concentrations of nitrite, nitrate, organic pollutants and trace elements in the systems. Classic biomarkers of fitness were also measured in flounder. These environmental parameters were used to establish a typology of the studied watersheds.

Furthermore, data from molecular proteomics analyses on fish livers were combined with classical biomarkers to determine the responses of European flounder to different stresses in its environment. The abundance of proteins have highlighted a positive deregulation related to the detoxification of xenobiotics in the most agricultural watersheds. These systems were characterized by livestock and vegetable crops, mainly impacted by pig manure and pesticides. The system displaying an industrial activity also showed upregulation of proteins linked to xenobiotic detoxification. Omics analyses also revealed a deregulation of proteins associated with the response to hypoxia and to heat stress in some estuaries. Finally, we highlighted a deregulation of proteins involved in urea cycle, immune system and fatty acids metabolism in several systems. The coupling of environmental and molecular signatures allowed the accurate identification of the main stressors operating in each hydrosystem.

Keywords: Land use, Estuarine water quality, Hypoxia, Pollutants, Shotgun proteomics, *Platichthys flesus*

1. Introduction

Estuarine environments are commonly exposed to multiple stressors and are therefore considered as very sensitive systems (Bárcena et al., 2017; Elliott, 2014). Estuaries are subjected to endogenous as well as exogenous pressures (Elliott, 2011). Endogenous pressures originate from within the river basin and estuary, and can more or less be managed. These pressures are attached to agriculture, industry, demography, or urbanization. In contrast, exogenous pressures are attached to external sources and are difficult to control. They include global change and thus modifications of thermal, salinity or flow regimes. The consequences of these exogenous pressures must also be managed. The combination of these multiple pressures will influence the quality of estuaries, resulting in a loss of biodiversity and a general decrease in the quality of transitional waters linked to eutrophication and pollution (Elliott, 2011).

Large estuaries, exposed to many stressors and pollutant cocktails have therefore been extensively studied, whereas small sized estuaries, considered as moderately stressed, are generally poorly known (Callaway et al., 2014). Thus, a first study integrating environmental signatures and omics-approaches on juvenile European Flounder was conducted in five moderate sized estuaries in Brittany (France); it allowed the identification of the main stressors and showed contrasted ecological status of these hydrosystems (Laurent et al., 2023).

In the present study, we sampled six new hydrosystems located in Brittany, whose total catchment area was between 70 and 450 km², and also our previous reference hydrosystem lowly impacted by stressors (Laurent et al. 2023). The originality of this survey resides in the study of seven hydrosystems mainly impacted by agricultural activities, with the same potential stressors. In addition, four of these watersheds are adjacent to each other, and this geographical proximity could further complicate the identification and the differentiation of these stressors. We therefore investigated whether the tools we have developed are sufficiently effective and accurate to differentiate, or not, these systems from each other, which appear at first sight to be similar. Moreover, we kept the previous reference hydrosystem in this comparison to conduct a temporal study and confirm, or not, the good ecological status of this system highlighted previously (Laurent et al., 2023).

The first objective of this study was to establish an accurate typology of these small hydrosystems to identify their specific main stressors and confirm, or not, the reference status of the Aven estuary. To this end, we compared different environmental parameters measured over the seven watersheds, such as anthropogenic land cover, hydrobiology, sediment quality, chemical contamination and fish biomarkers.

The second objective of the present study was to analyse the liver molecular responses of the European Flounder to stressors. Proteomic approaches accurately reflect the overall metabolic alterations of organisms submitted to various stressors in their environment; they are becoming major tools for the development of robust new biomarkers in stress ecology (Laurent et al., 2023; Borcier et al., 2019; Jeffrey et al., 2019, Gouveia et al., 2019; Martyniuk, 2018; Bahamonde et al., 2016; ECETOC, 2010). Thus, we conducted shotgun proteomics on flounders collected in the seven estuaries, comparing the differential proteins accumulation in fish livers from the seven estuaries. Then, the coupling environmental signatures - proteomic data allowed to identify the main stressors per hydrosystem and the ecological status of the seven estuaries.

2. Materials and methods

2.1. Study sites and geographical metrics

This study covers seven hydrosystems, from the watershed to the estuary: Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven. These systems are located in Brittany, along the French Western Channel coast and the French Atlantic coast (Fig. 1).

Several geographic indicators were developed from geographic reference dataset. These metrics produced a first typology of anthropic activities over the different watersheds. The first indicators concerned agriculture and associated pressures. One of these metrics measures the number of cattle in the watersheds using the all-feed livestock unit index. Provided by the Agreste database, this index measures the rations of food consumed by the different species of livestock. The proportions of agricultural activities in the watersheds were also measured using the Graphic Land Register (RPG). The quantity of phytosanitary products applied was evaluated using the treatment frequency index (IFT), provided by Agreste (Crisan, 2020; Pujol, 2015). This index provides information on the number of doses of phytosanitary treatments applied per hectare. A dose is the recommended amount to be applied during a spraying. Indicators related to urbanization have also been developed. The INSEE (French National Institute for Statistics and Economic Studies) data base was used to calculate population density. Similarly, Corine Land Cover (CLC) data were used to calculate the proportion of artificial surfaces per watershed. The Corine Land Cover and BD TOPO databases were used to calculate the percentage of natural surfaces, the density of hedges and the percentage of riparian vegetation.

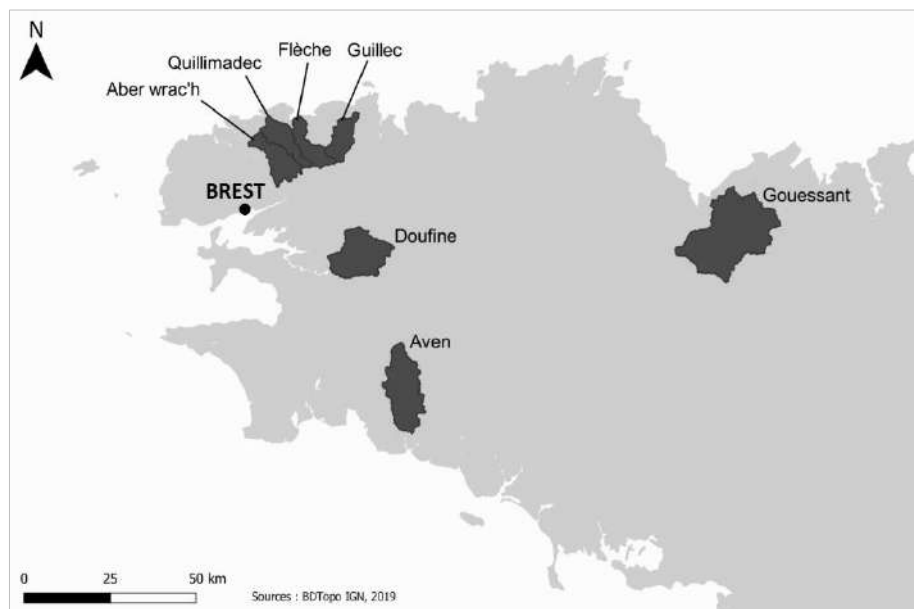


Figure 1. Location of the studied catchments and sampled estuaries (Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven) and main city (Brest).

2.2. Environmental fish sampling and tissue collection

Young of the year European flounders were born in March in coastal areas, recruited in May in the estuaries. The individuals therefore spent approximately 5 months in summer estuarine conditions before their catch by electrofishing in the upstream part of the estuaries, between mid-September and mid-October 2020. Twenty flounders

(total length: 9.16 ± 1.14 cm) were caught by estuary. Each individual was sacrificed in the field and dissected to collect several tissues. Recovered livers were immediately flash frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Otoliths were also collected, stripped of their membranous labyrinths and preserved in dry Eppendorf tubes.

2.3. Chemical and biomarkers analyses

2.3.1. Nitrate and nitrite analyses in estuarine waters

Nitrate and nitrite concentrations were assessed using the methodology detailed by Aminot & Kérouel (2007) as in Laurent et al. (2023). To this end, water samples were collected in the upper estuaries at low tide, just before fish sampling. Approximately 15 mL of water was filtered ($0.2 \mu\text{m}$) and frozen at -20°C until analysis. The samples were then analysed using a Bran + Luebbe AAIII auto-analyser.

2.3.2. Organic pollutants in sediment and fish tissue

Organic pollutants were quantified in sediment and flounder tissue by sorptive stir bar extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) using a method adapted from Lacroix et al. (2014) and performed in Laurent et al. (2022; 2023). In total, the concentrations of 7 PBDEs, 24 PAHs, and 26 PCBs were measured. Briefly, 100 mg of sample (w.w.) was digested by saponification. Then, analytes were extracted for 16 h at 700 rpm using polydimethylsiloxane bars (Twister 20 mm x 0.5 mm, Gerstel). The bars were then analysed using an Agilent 7890A gas chromatography system coupled to an Agilent 7000 triple quadrupole mass spectrometer (Agilent Technologies) and equipped with a thermal desorption unit (TDU) combined with a cooled injection system (Gerstel). The GC column was a Restek Rxi-5ms (30 m, 0.25 mm, $0.25 \mu\text{m}$). Analytes were evaluated against deuterated compounds using a calibration curve ranging from 0.01 ng to 30 ng per bar. Samples were dried at 50°C until the mass remained constant to remove water from the tissue. Results are therefore expressed as μg of analytes/kg dry weight (d.w.). Limits of quantification (LOQs) were calculated by the calibration curve method (Shrivastava and Gupta, 2011) and limits of detection (LODs) were estimated by dividing the LOQ by three. Analytical quality control was performed using the 1974c standard reference materials "Organics in Mussel Tissue (*Mytilus edulis*)" provided by the National Institute of Standards (SRM) and Technology (NIST, Gaithersburg, USA).

2.3.3. Trace elements in sediment and fish muscle

Two sediment samples and ten fish muscle samples per studied estuary were analysed as presented in Laurent et al. (2023). Muscle samples were lyophilized (Alpha 1-2 LDPlus, CHRIST) for 48h. All samples were oven-dried for 12h at 60°C before being ground in an agate mortar. Then, approximately 50 mg of powdered muscle (49.65 ± 4.14 mg) and sediment (50.39 ± 0.57 mg) were mineralized in closed 15-mL Teflon screw-cap vials (Savillex®) with 1 mL of 65 % nitric acid (Merck, Suprapur®) and 250 μL of 30 % suprapure hydrogen peroxide (Merck, Suprapur®). The muscle and sediment samples were then hydrolysed for 3h at 85°C and 4h at 105°C (EasyDigest®, ANALAB), respectively. Diluted mixtures (2.5 % nitric acid) were used for measurements of As and of several trace metals including Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Pb, V and Zn, using an ICP-quadrupole mass spectrometer (X-series II, Thermo Scientific) operated at P le Spectrom trie Oc an Brest (PSO, Brest, France). The concentrations reported in this survey were above the limits of quantification, while the digestion blanks were below the limits of detection. Certified

reference material (DORM-4 fish protein, National Research Council of Canada) was used to assess analytical accuracy.

2.4. Trace elements in otoliths

Trace element analyses performed on whole otoliths provides an average signature over the entire life of the fish. Otoliths from ten fish per estuary were used for trace element analysis in the same method as in Laurent et al. (2023). Briefly, otoliths were cleaned, rinsed and stored with milliQ water in an Eppendorf tube, previously treated with 10 % nitric acid. The otoliths were then exposed to an ultrasonic bath for 5 min and dried in a fume hood for 48h. Each otolith was weighed (1.92 ± 0.44 mg) using a Mettler Toledo MX5 balance and transferred to a Teflon tube. To each Teflon tube containing the samples, 2 mL of 2.5 % ultrapure nitric acid spiked with 0.863810 ppb indium (internal standard of the samples) was added in the clean room. The exact amount of acid added was measured on an accurate balance to 0.1 mg (1.21 ± 0.008 g). An internal standard, indium, and a standard sample were used to correct for signal drift and to verify the accuracy of the method during ICP-MS analysis. For this, 11.33 mg of northern red snapper (*Lutjanus campechanus*) sagittal otolith powder was added to 22.24 g of nitric acid. Elemental analysis was performed using a sector field ICP-MS (Thermo Element XR), in low and medium resolution depending on the selected isotopes. In low resolution, were measured ^7Li , ^{11}B , ^{97}Mo , ^{111}Cd , ^{118}Sn , ^{121}Sb , ^{135}Ba , ^{138}Ba , ^{208}Pb and ^{238}U . In average resolution were investigated ^{25}Mg , ^{51}V , ^{52}Cr , ^{55}Mn , ^{56}Fe , ^{59}Co , ^{60}Ni , ^{63}Cu , ^{66}Zn , ^{86}Sr , ^{138}Ba and ^{75}As . Limits of quantification were calculated for each of the analysed isotopes based on 10 times the standard deviation of the blanks.

2.5. Isotopes in otoliths

Stable oxygen and carbon isotope ratios were determined from otoliths of ten flounders per studied sites as performed by Laurent et al. (2023). Otoliths were cleaned, rinsed, and ground. Then, approximately 100 μg of powdered otoliths (111.3 ± 26.8 μg) were weighed and placed in a specific glass vial for isotopic analyses. Isotopic analyses were performed using a MAT-253 stable isotope ratio mass spectrometer (Thermo Scientific) coupled to a KIEL IV carbonate apparatus (Thermo Scientific). The standard deviation was calculated using a homogeneous internal carbonate standard. It was ± 0.03 ‰ for $\delta^{18}\text{O}$ and ± 0.02 ‰ for $\delta^{13}\text{C}$ for this mass range (50-170 μg). To formulate the V-PDB scale values, all samples were calibrated using two international carbonate standards, NBS-19 ($\delta^{18}\text{O}=-2.20$ ‰ and $\delta^{13}\text{C}=+1.95$ ‰) and NBS-18 ($\delta^{18}\text{O}=-23.20$ ‰ and $\delta^{13}\text{C}=-5.01$ ‰).

2.6. Shotgun proteomics

2.6.1. Total protein extraction, trypsinolysis and peptides analysis by tandem mass spectrometry

The complete proteome of five fish livers per estuary were analysed, as in Laurent et al. (2023). Briefly, protein extracts were diluted in 30 μL of NuPAGE LDS 1X sample buffer (Invitrogen) and 20 μL of β -mercaptoethanol. Based on its protein concentration, each sample was diluted with water and NuPAGE LDS 3X (Invitrogen) to a total protein concentration of 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ in LDS 1X. The samples were then heated at 99°C for 5 min. For each sample, 30 μg of protein was plated on a NuPAGE 4-12 % gradient gel and subjected to SDS-PAGE in MES SDS migration buffer (50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ MES ([2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid), 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris Base, 0.1 % SDS, 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

EDTA, pH 7.3) for 5 min. The proteome of each sample was extracted as a single polyacrylamide strip and processed for trypsin proteolysis as described in Hartmann et al. (2014). A 50 μL peptide sample was thus obtained. One-fifth of the volume of this sample was injected into a C18 PepMapTM 100 nanoscale capillary column (LC Packings) and resolved with a 120-min gradient of CH_3CN , 0.1 % formic acid, at a flow rate of $0.2 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Data-driven acquisition analysis of the peptides eluting from the column was performed with a Q-Exactive HF mass spectrometer (Thermo) (Klein et al., 2016). Each full scan of peptide ions in the Orbitrap analyzer was acquired from m/z 350 to 1800 at a resolution of 60,000 and with a dynamic exclusion of 10 seconds. Each MS scan was followed by high-energy collision dissociation and MS/MS scans on the 20 most abundant precursor ions.

2.6.2. Proteomic data interpretation

MS/MS spectra were assigned to peptide sequences by the MASCOT Daemon 2.3.2 search engine (Matrix Science) using the complete annotated proteomic database of *Paralichthys olivaceus*, as described previously in Laurent et al. (2023). The abundance of proteins in each condition was assessed by their spectral count (number of MS/MS spectra per protein). A protein was validated and conserved when at least two different peptides (p-value less than 0.05) were detected. The false discovery rate of protein identification is thus less than 1 %, as verified with a reverse search of the decoy database.

2.6.3. Proteomics data deposition

The mass spectrometry and proteomics dataset are available through the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE partner repository (<https://www.ebi.ac.uk/pride/>), under dataset identifiers PXD045611 and 10.6019/PXD045611. [The reviewers may access the currently private dataset using reviewer_pxd045611@ebi.ac.uk as Username and xLByP0vpas Password].

2.6.4. Functional analysis

For each estuary, proteomic dataset was subjected to a functional analysis involving a comprehensive COG (Cluster of orthologous group) classification coupled with GO (Gene Ontology) and KEGG enrichment experiments, as well as molecular network analysis using STRING v11.0 (Szklarczyk et al., 2019). These approaches aim to identify differentially regulated metabolic pathways in the different estuaries.

2.7. Statistical analysis

Statistical tests were performed in R. Normality and homoscedasticity of variances were investigated with a Shapiro-Wilk test and a Bartlett test, respectively. Because the data were not normally distributed, a nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post hoc test (for multiple comparisons) were applied to compare the means. A p-value below 0.05 was assumed as a significant difference. Data integration was conducted by principal component analyses (PCA) using the FactorMineR software package with default settings.

3. Results & Discussion

3.1. Land use in watersheds

This study focused on seven small hydrosystems, with less heterogeneity than the larger systems we have previously worked on (Laurent et al., 2022; Borcier et al., 2019; Pédron et al., 2017; Galland et al., 2013). Indeed, small estuaries have lower environmental heterogeneity, as well as lower inter-individual variability in fish response to its environment (Doubleday et al., 2015; Vasconcelos et al., 2015; Elliott, 2011). The seven estuaries selected for this survey are located in the Brittany region (France), as in Laurent et al. (2023). The major characteristics of these hydrosystems were their moderate size ($73 < \text{catchment area (km}^2) < 420$) and their main anthropic activities linked to agriculture, land use and land cover being determined by a geographic information system (GIS) (Table 1). Furthermore four watersheds are adjacent: Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h (Fig.1).

A first group of watershed (Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h) displayed a higher agricultural pressure (agricultural surface $\approx 75\%$, and $285 \text{ UGBTA.ha}^{-1} < \text{livestock} < 534 \text{ UGBTA.ha}^{-1}$) compared to a second group (Douffine and Aven) showing less marked agricultural surfaces (60 - 70 %) and livestock (190 - 220 UGBTA.ha^{-1}) (Table 1). Phytosanitary treatment were also higher in the first group ($2.4 < \text{IFT. Catchment-1} < 3.8$) compared to the second group ($1.8 < \text{IFT. Catchment}^{-1} < 2$) (Table 1).

The fish farm production highlighted a higher production of trout in Douffine (900 T.year^{-1}), followed by a significant production of $\approx 400 \text{ T.year}^{-1}$ in Guillec and Aven (Table 1).

Information on population density and urbanization levels in the seven watersheds studied was also gathered (Table 1). The highest population densities were reported for Aber Wrac'h and Quillimadec (118 - 172 inhab.km^{-2}). The population density being moderate in the other watersheds (31 - 85 inhab.km^{-2}) (Table 1). The relatively high population densities were associated with the highest occurrences of urbanized areas, observed for Aber Wrac'h (18.7 % of catchment) and Quillimadec (19.1 % of catchment). The lowest number of urbanized areas was detected the Douffine watershed (5.6 % of catchment).

Lastly, several geographic metrics linked to a good ecological quality were assessed in the watersheds (Table 1). These metrics included natural areas, hedgerow density and riparian vegetation. Aven and Douffine showed the highest rates of preserved natural areas (19 - 35 %) and the highest rates of riparian vegetation (25 - 33 % 100 m river band); the prevalence of riparian vegetation enhancing water quality and supporting ecological corridors. The two previous watersheds contrasted sharply with the group: Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h which displayed reduced natural surfaces (8 - 10 % of catchment) and limited riparian vegetation (13 - 18 % 100 m river band). The hedge density metric did not differentiate the majority of watersheds (7500 m.km^{-2} - 9800 m.km^{-2}) but showed a particularly weak value for the Gouessant basin (5600 m.km^{-2}) mainly characterized by a very high pressure of corn crops.

Table 1. Geographical metrics from Gouessant, Guilec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven estuaries.

Geographical Metrics	GOUESSANT	GUILLEC	FLÈCHE	QUILLIMADEC	ABER WRAC'H	DOUFFINE	AVEN
Catchment area (km ²)	420.2	72.5	73.5	79.2	95.6	173.9	193.7
Livestock (UGBTA.ha ⁻¹)	284.7	328.9	533.5	361.4	362.2	221.7	187.9
Agricultural surfaces (% of catchment)	74.9	74.4	77.7	72.2	71.4	59.1	70.3
Phytosanitary treatment (IFT.catchment ⁻¹)	2.7	3.8	2.5	2.5	2.4	1.8	2.1
Fish farm (T.year ⁻¹)	0	450	20	50	0	900	430
Population density (inhab.km ⁻²)	84.3	85.7	45.9	172.4	117.8	31.3	77.8
Urbanised surfaces (% of catchment)	10.9	18.2	12.9	19.1	18.7	5.6	10.9
Natural surfaces (% of catchment)	14.2	7.5	9.5	8.7	9.9	35.3	18.8
Hedges density (m.km ⁻²)	5628	7546	9554	9555	7724	7970	9839
Riparian vegetation (% 100 m river band)	16.6	17.6	16.9	12.9	18.3	33.3	25.4

* UGBTA correspond to the total feed intake of the livestock, i.e. the number of animals based on their complete feed intake

3.2. Chemical parameters and biomarkers

The quantification of chemical pollutants in water, sediments and/or tissues of organisms is one of the simplest and most effective ways to assess water quality. Thus, the main pollutants related to human activities were analysed, such as water nitrates and nitrites (linked to nitrogen fertilizers and waste waters), and several xenobiotics in sediment and/or fish, linked to road traffic and domestic and industrial effluents (PAHs, PCBs and metals). Furthermore, trace elements and stable isotopes were also analysed on fish otoliths, to better characterize: (1) fish exposure to pollutants and (2) fish habitat and fish metabolic rate (Laurent et al. 2023). Water samples, sediment samples and juvenile flounders were collected at the upper limit of each estuary to integrate the consequences of anthropic activities over the whole watersheds. The fish condition index ($K = 100 \times (W/L^3)$ where W is the weight of the fish in g, and L is the total length in cm) showed no significant differences between the fish populations in the seven estuaries (Table S1).

3.2.1. Nitrate, nitrite, and ammonium in estuarine water

Regarding nitrites (Table 2), the highest concentrations were observed in the group composed of Gouessant, Guilec and Douffine (0.12 - 0.16 mg.L⁻¹). The other estuaries showed reduced levels of nitrites (≈ 0.05 mg.L⁻¹). The highest nitrate concentration was observed in Guilec (50 mg.L⁻¹); medium values being observed in the group consisting of Flèche, Quillimadec and Aber Wrac'h (≈ 33 mg.L⁻¹). Finally the level of ammonium was higher in Guilec (0.4 mg.L⁻¹), the other estuaries showing an average concentration of 0.1 mg.L⁻¹; Aven displaying the low ammonium level (0.03 mg.L⁻¹).

The high loads of nitrogen (NH₄⁺, NO₂⁻, NO₃⁻) (Table 2), particularly detected in Guilec, could be linked to a strong fertilisation in small parcels devoted to intensive vegetable production (potatoes, carrots, shallots). The group Flèche, Quillimadec, and Aber Wrac'h showed high loads of NO₃⁻, that could be also related to the agricultural pressure. On the other hand, Aven displayed a reduced load of nitrogen; this trend was also detected in a previous study (Laurent et al., 2023). This last result confirmed that the agricultural pressure is quite moderate in Aven; this watershed is mainly oriented towards the production of canned

vegetables and shows marks of a good conservation of the bocage that could reduce the fluxes of nitrogen over the system.

Table 2. Mean and standard error of chemical and biological analysis realised on samples from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec and Aber Wrac'h estuaries, in 2020. Nitrites, nitrates, and ammonium concentrations in water samples. Organic pollutants concentrations in *P. flesus* tissue. Trace elements concentrations in *P. flesus* muscle. Trace elements concentrations in sediments. Trace elements concentrations in *P. flesus* otoliths. (Statistics: Kruskal-Wallis test: p-value < 0.05, letters correspond to significant differences among estuaries).

Chemical analysis		GOUESSANT	GUILLEC	FLÈCHE	QUILLIMADEC	ABER WRAC'H	DOUFFINE	AVEN
Nitrogen concentrations (mg.L⁻¹) in water samples*	NO ₂ ⁻	0.16 ± 0.03 ^(a) (0.11)**	0.14 ± 0.03 ^(a) (0.17)**	0.06 ± 0.01 ^(abc) (0.00029)**	0.07 ± 0.03 ^(abc) (0.14)**	0.05 ± 0.01 ^(bc) (0.06)**	0.12 ± 0.04 ^(ab) (0.08)**	0.03 ± 0.002 ^(c) (0.016)**
	NO ₃ ⁻	21.11 ± 3.55 ^(ad) (25.17)**	50.80 ± 1.51 ^(b) (48.05)**	36.83 ± 2.70 ^(c) (51.19)**	33.75 ± 2.75 ^(ac) (32.09)**	32.81 ± 1.76 ^(acd) (19.23)**	12.00 ± 0.91 ^(d) (18.52)**	24.00 ± 1.51 ^(acd) (25.00)**
	NH ₄ ⁺	0.15 ± 0.03 ^(ab)	0.4 ± 0.09 ^(a)	0.06 ± 0.01 ^(bcd)	0.09 ± 0.02 ^(abc)	0.07 ± 0.02 ^(cd)	0.1 ± 0.03 ^(abc)	0.03 ± 0.01 ^(d)
Organic pollutants concentrations (ng.g⁻¹ DW) in sediment	PAHs	117.1 ± 5.40 ^(a)	105.1 ± 67.70 ^(a)	300.5 ± 102.7 ^(ab)	488.5 ± 39.95 ^(ab)	273.7 ± 42.60 ^(ab)	535.9 ± 161.6 ^(ab)	1481.6 ± 268.9 ^(b)
	PCBS	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Organic pollutants concentrations (ng.g⁻¹ DW) in fish tissue	PCBS	3.97 ± 1.24 ^(a)	0.67 ± 0.67 ^(a)	11.57 ± 0.50 ^(abc)	22.77 ± 4.44 ^(bc)	4.30 ± 1.16 ^(ab)	27.70 ± 0.15 ^(c)	22.13 ± 4.59 ^(c)
Trace elements concentrations (µg.g⁻¹ DW) in sediment	Arsenic	4.26 ± 0.37 ^(a)	8.41 ± 0.16 ^(ac)	4.14 ± 0.66 ^(a)	9.19 ± 0.73 ^(ab)	27.43 ± 3.42 ^(b)	14.26 ± 0.44 ^(bc)	13.08 ± 0.65 ^(bc)
	Cadmium	0.11 ± 0.01 ^(a)	0.58 ± 0.01 ^(bc)	0.15 ± 0.02 ^(ab)	0.32 ± 0.03 ^(abd)	0.29 ± 0.06 ^(abd)	2.18 ± 0.3 ^(c)	0.87 ± 0.03 ^(cd)
	Copper	5.92 ± 0.55 ^(ab)	7.02 ± 0.08 ^(abd)	2.66 ± 0.47 ^(a)	7.45 ± 0.54 ^(abd)	13.79 ± 2.14 ^(bc)	69.2 ± 13.33 ^(c)	25.43 ± 1.25 ^(cd)
	Lead	9.83 ± 0.95 ^(ad)	11.62 ± 0.29 ^(ab)	5.5 ± 0.53 ^(a)	11.52 ± 0.56 ^(ab)	34.7 ± 5.59 ^(bc)	261.7 ± 56.9 ^(c)	31.65 ± 0.94 ^(bcd)
	Zinc	23.49 ± 2.27 ^(ab)	69.59 ± 1.52 ^(ac)	16.19 ± 2.7 ^(b)	47.71 ± 3.28 ^(abd)	60.16 ± 8.56 ^(abc)	326.1 ± 51.47 ^(c)	110.9 ± 5.71 ^(cd)
Trace elements concentrations (µg.g⁻¹ DW) in fish muscle	Arsenic	1.72 ± 0.38 ^(ac)	2.16 ± 0.24 ^(a)	0.39 ± 0.01 ^(b)	2.83 ± 0.33 ^(a)	3.12 ± 0.51 ^(a)	0.8 ± 0.09 ^(bc)	6.02 ± 0.32 ^(d)
	Cadmium	0.001 ± 0.0002 ^(ace)	0.003 ± 0.0002 ^(bd)	0.004 ± 0.0004 ^(bc)	0.001 ± 0.0001 ^(a)	0.002 ± 0.0003 ^(cd)	0.003 ± 0.001 ^(bd)	0.001 ± 0.0002 ^(e)
	Copper	1.06 ± 0.08 ^(a)	1.07 ± 0.04 ^(a)	0.93 ± 0.15 ^(b)	0.96 ± 0.05 ^(ab)	0.96 ± 0.07 ^(ab)	1.03 ± 0.05 ^(a)	0.81 ± 0.04 ^(b)
	Lead	0.03 ± 0.02 ^(ab)	0.02 ± 0.005 ^(ab)	0.01 ± 0.01 ^(a)	0.02 ± 0.003 ^(bc)	0.02 ± 0.003 ^(bcd)	0.05 ± 0.01 ^(c)	0.01 ± 0.001 ^(ad)
	Zinc	44.46 ± 9.79 ^(a)	33.56 ± 3.09 ^(a)	27.91 ± 0.98 ^(a)	28.43 ± 3.18 ^(ab)	34.31 ± 4.18 ^(a)	32.26 ± 2.90 ^(a)	21.87 ± 1.46 ^(b)
Trace elements concentrations (µmol.mol⁻¹ Ca) in fish otoliths	Strontium	423.5 ± 99.51 ^(a)	471.0 ± 83.94 ^(a)	650.5 ± 45.32 ^(ab)	811.5 ± 93.25 ^(bc)	1154.9 ± 35.92 ^(cd)	477.6 ± 26.9 ^(a)	1655.3 ± 39.43 ^(d)
	Manganese	36.46 ± 10.47 ^(ac)	4.94 ± 1.24 ^(bd)	7.05 ± 0.92 ^(b)	5.44 ± 0.82 ^(b)	9.91 ± 2.06 ^(ab)	30.56 ± 3.94 ^(c)	1.82 ± 0.15 ^(d)
	Copper	0.46 ± 0.22 ^(a)	0.26 ± 0.08 ^(abc)	0.15 ± 0.03 ^(bc)	0.48 ± 0.25 ^(ab)	0.26 ± 0.03 ^(a)	0.23 ± 0.06 ^(abc)	0.16 ± 0.03 ^(c)
	Zinc	11.62 ± 6.57 ^(a)	3.26 ± 0.84 ^(a)	2.33 ± 0.52 ^(a)	1.25 ± 0.4 ^(b)	4.4 ± 2.16 ^(ab)	9.12 ± 7.89 ^(ab)	3.82 ± 2.13 ^(ab)

* Data provided by the Regional Directorate for the Environment, Development and Housing (DREAL) of Rennes for 2019 water samples, excepted for Aven (2016).

** Additional values in brackets correspond to nitrites and nitrates concentrations measured the sampling day in 2020.

3.2.2. Organic pollutants in sediment and fish tissue

The analyses of PCBs in the sediment were below the detection limits in the seven estuaries which highlighted a limited impact of industrial effluents in these mainly agricultural watersheds (Table 2).

In contrast, PAHs were significantly detected in the sediments (Table 2). The highest PAHs concentrations were observed in Aven (1480 ng.g⁻¹ DW), due to the presence of a marina at the sampling site and a car park very popular for tourists in summer. Medium values of PAHs in the sediment (270 - 530 ng.g⁻¹ DW) were observed for the group composed of Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine; they are also probably linked to road traffic over these watersheds.

The fish muscle PCBs concentrations were rather limited (0.7 - 28 ng.g⁻¹ DW) across all the agricultural watersheds of the present study; these values being very weak compared to those commonly observed in the flounder muscle collected in the industrial Seine estuary (\approx 470 ng.g⁻¹ DW) (Borcier et al., 2020).

3.2.3. Trace elements in sediment and fish muscle

Sediment analyses (Table 2) highlighted a pronounced multi-contamination in the Douffine estuary, especially in As ($14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW), Cd ($2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW), Cu ($69 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW), Pb ($261 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) and Zn ($326 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW); this metallic multi-contamination being linked to ancient mining activities in a related watershed (Chiffolleau, 2017). Decreasing concentrations of the previous elements were detected in Aven and Aber Wrac'h sediments, with an exception for the highest As level in Aber Wrac'h ($27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) and similar As level in Aven ($13 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW). Globally, the remaining watersheds (Gouessant, Guillec, Flèche and Quillimadec) displayed low contaminations of sediments by trace elements.

The determination of trace elements in the muscle of the flounder caught in Douffine did not reflect the multi-contamination observed in the sediments. The relationship between trace elements in sediment vs fish appeared weak, with the exception of the highest As concentrations also measured in Aven ($6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW) and Aber Wrac'h ($3 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ DW). Globally the differentiation of fish trace elements between watersheds was reduced, the Aven basin showing the lowest values of Cd, Cu, Pb and Zn in fish muscle.

3.2.4. Trace elements and isotopes in fish otolith

Trace element and stable isotope analyses were conducted on the entire otoliths of 10 flounder per system studied (Table 2 & Fig. 2). Measurements on whole otolith allow to obtain signatures integrating the lifetime of the fish, from its birth to its capture. Otoliths can contain many trace elements such as Li, Sr, Ba or Mn. Rare earth elements (REE) and elements such as Hg or Pb were also found in otoliths (Hüssy et al., 2020). All these trace elements are used to reconstruct fish environmental changes and to detect possible exposure to pollutants (Halden & Friedrich, 2008).

Trace element analyses in otoliths showed that two major elements can characterize the fish habitats in estuaries, *i.e.* Sr and Mn. The Sr:Ca ratio in otoliths is commonly used as a proxy for water salinity (Panfili et al., 2015; Zimmerman, 2011). In the present study, the highest Sr concentrations (Table 2) in otoliths were clearly measured in Aven ($1655 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ Ca) suggesting a flounder polyhaline environment. The lowest Sr levels were measured in the group composed of Gouessant, Guillec, Flèche and Douffine ($423 - 650 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ Ca), were related to an oligohaline environment for fish. The medium values for otolith Sr in Quillimadec and Aber Wrac'h ($811-1154 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ Ca) being linked to a mesohaline environment.

The Mn:Ca ratio in fish otoliths is commonly used as a proxy for hypoxia in water bodies (Thorrold & Shuttleworth, 2011; Limburg et al., 2015). Thus we suggest that the highest Mn concentrations (Table 2) observed in Gouessant ($36 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ Ca) and Douffine ($30 \mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ Ca) revealed hypoxic events in these two estuaries.

Isotopic analysis were carried out on $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ compositions in flounder otoliths. The fish otolith $\delta^{18}\text{O}$ was commonly used as a proxy of water salinity, but also can be used to reconstruct water temperature (Reis-Santos et al., 2023). The otolith $\delta^{13}\text{C}$ is now considered as a very relevant proxy of the field metabolic rate of teleost fishes (Chung et al., 2019). The strong $\delta^{18}\text{O}$ signatures for Aven (Fig. 2) confirmed the polyhaline environment detected previously by the Sr concentrations in this particular system. The other estuaries were located in the left part of the

diagram, and thus characterized by reduced $\delta^{18}\text{O}$ signatures linked to meso- and oligohaline environments, and also probably to higher water temperatures. Considering the $\delta^{13}\text{C}$ otolith composition (Fig. 2), we suggest that the strongest values for the Aven flounders in the right part of the diagram could be linked to a reduced fish metabolic rate, in a weakly stressed environment. The most negative signatures on the left part of the diagram (Fig. 2), particularly those between -16 and -14 for the Flèche estuary, could be linked to an increase of the fish metabolic rate in a highly stressed environment. This activation of the metabolic rate allowing to respond to the increasing energy cost of self-maintenance in stressed environments (Sokolova, 2013).

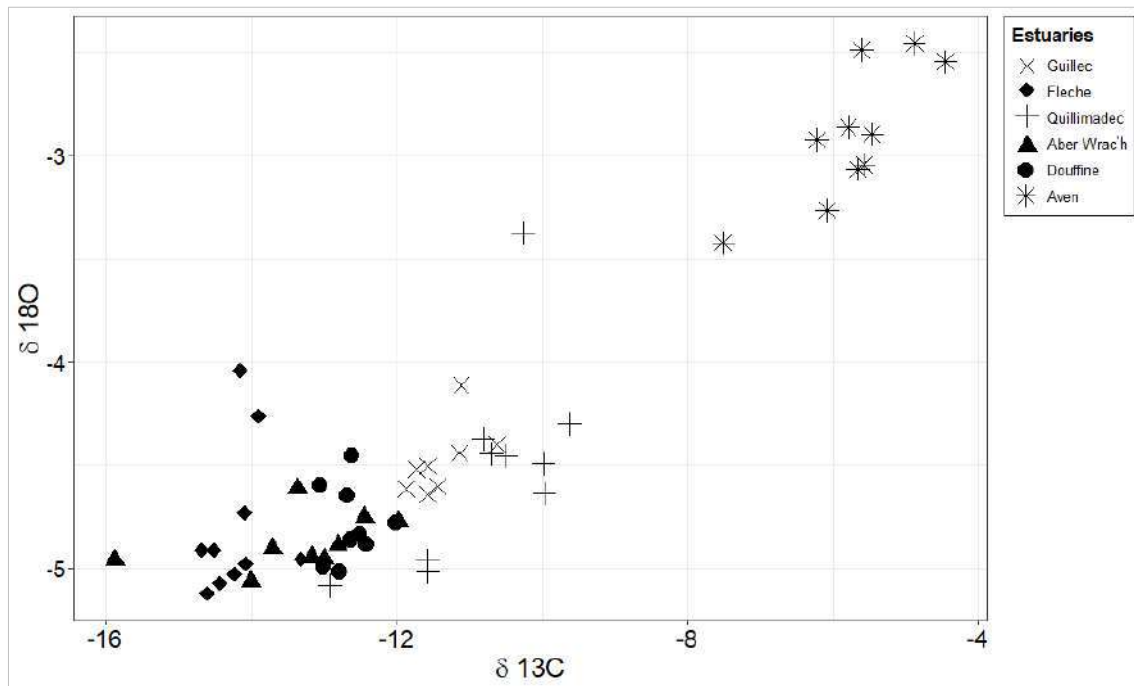


Figure 2. Stable carbon ($\delta^{13}\text{C}$) and oxygen ($\delta^{18}\text{O}$) isotopes in *P. flesus* otoliths from Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven estuaries. *Measurements could not be performed on the flounder from Gouessant because few individuals were captured and the otoliths were used for trace element analysis.

3.3. Integration of environmental signatures and identification of the reference hydrosystem

A principal component analysis was conducted on the environmental signatures, integrating geography of the watersheds, hydrobiology, chemical data and fish biomarkers (Fig. 3). The axis one (horizontal) of the diagram highlighted on the left part a first group of watersheds (Gouessant, Flèche, Guillec, Quillimadec and Aber Wrac'h) characterized by a high agricultural pressure (high levels of agricultural surface, phytosanitary treatment and water nitrate) vs on the left part the Douffine basin showing a moderate agricultural pressure (high levels of natural surfaces and riparian vegetation) but high levels of metals in the sediment and high fish farm activity. Furthermore, within the first highly anthropised group, Flèche and Gouessant showed high livestock, overload of nitrogen and a fish metallic contamination by Cu and Zn, whereas Quillimadec and Aber Wrac'h displayed high population density and urbanised surface.

The axis two (vertical) of the Figure 3 highlighted in the lower part of the diagram high values of otolith Mn shared in Gouessant and Douffine indicating hypoxic events in these hydrosystems. The Aven watershed was isolated in the upper side of the diagram and thus did not show hypoxic events. Furthermore, this system was mainly characterized by a polyhaline environment (high Sr otolith), high hedge density, reduced trace elements contamination in fish and

sediment, with the exception of an As signal in fish. Thus, no major stressors were detected in the Aven basin, and fish displayed a reduced metabolic activity in the Aven estuary (high otolith $\delta^{13}\text{C}$), highlighting a weakly stressed system compared to the six other watersheds of this study. Therefore, we have chosen the Aven watershed as the reference system in the -omics analysis in the following sections of the present study.

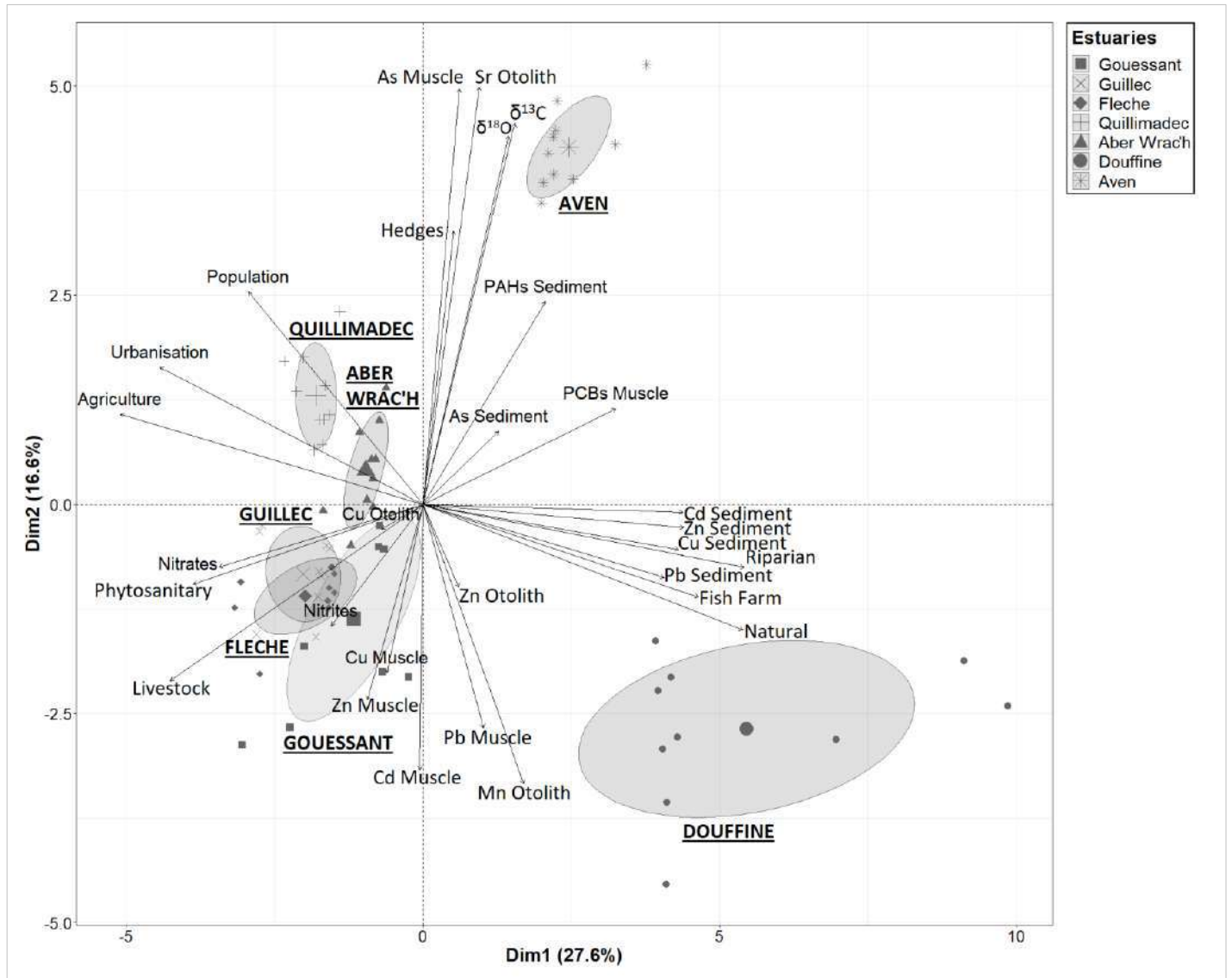


Figure 3. Principal component analysis (axes 1 and 2). Distribution of 30 variables on the correlation circle and individuals on the factorial plan in Gouessant, Guilec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven Flounder populations.

3.4. Shotgun proteomics

The global shotgun proteomics approach we developed aimed to identify differences in the liver metabolism of flounders sampled from various estuaries. The liver is a highly active organ in terms of metabolism and serves as the primary detoxification centre in fish. The observed differences may, therefore, reflect the stress levels experienced by the fish and, to some extent, the composition of their habitat. The health of the fish thus mirrors the health of the ecosystem.

In total, we analysed 726,163 MS/MS spectra, which allowed us to identify and track 1,740 proteins across all

analysed samples. Comparative statistical analysis was conducted using PatternLab software. Additionally, as previously mentioned, we used the Aven estuary as a reference point. The significance level was set at a p-value of 0.05, and the fold change factor (Tfold) was set at 1.5.

Proteomic comparisons revealed that the smallest differences in fish liver proteomes were observed between Guillec vs Aven, followed by Aber Wrac'h vs Aven (Table 3). Specifically, for individuals from Guillec, the abundances of 44 proteins increased, while 45 decreased. Similarly, 33 proteins were up-regulated, and 60 were down-regulated in the livers of flounders from Aber Wrac'h. In contrast, the most significant differences were found in fish from Gouessant, with 202 proteins showing increased abundance and 46 proteins displaying decreased abundance (Table 3).

Determining whether the number of deregulated proteins between the studied estuaries is proportional to the intensity of stress on the organisms is challenging. Our study did not include an unstressed control environment since we were investigating individuals collected from their natural habitats. This implies that even the reference fish may have been exposed to possible stressors. Therefore, we supplemented the study with a qualitative and quantitative functional analysis of differentially accumulated proteins to gain more meaningful insights.

Table 3. Number of deregulated proteins in *P. flesus* liver from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine estuaries, as compared to fish from Aven.

Proteomics	GOUESSANT	GUILLEC	FLÈCHE	QUILLIMADE C	ABER WRAC'H	DOUFFINE
Up-regulated	202	44	58	110	33	71
Down-regulated	46	45	75	61	60	39

3.4.1. Functional re-annotation and COG classification

In response to changing environmental conditions, organisms continually adjust their functioning by undergoing metabolic modifications. To identify the primary metabolic shifts in the livers of fish collected from different estuaries, we conducted a functional proteome analysis. In this context, we retrieved and re-annotated the sequences of all deregulated proteins using Blast2GO and EggNOG (Laurent et al., 2023; Powell et al., 2014; Conesa et al., 2005), followed by a detailed manual re-examination. This functional analysis was based on the classification of different protein subsets using COGs (Clusters of Orthologous Groups) (Fig. S1). This initial analysis revealed a remarkable functional diversity within the proteome.

In the Gouessant estuary, we observed the prevalence of categories O (16.3%, protein modification/transformation) and J (11.4%, translation, ribosomal structure, and biogenesis) in up-regulation, and category T (10.4%, signal transduction) in down-regulation.

In fish sampled from Guillec, three enriched protein categories (A, G, T) were identified at 16.6% (A for RNA processing and modification, and G for carbohydrate transport and metabolism). Down-regulated proteins were predominantly associated with categories O (17.8%) and S (15.6%).

In the Flèche estuary, category O was the most deregulated, with 18.9% and 18.6% of the accumulated and reduced proteins, respectively. Categories G, E (amino acid transport and metabolism), and I (lipid transport and metabolism) were also enriched, with 15.5%, 13.8%, and 10.3%, respectively.

In Quillimadec, we observed the dominance of categories J (22.7%) in accumulated proteins and S (24.6%, function unknown) in decreased ones. Categories U (22.7%, intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport) and O (12.7%) were also up-regulated, while category Q (14.8%, secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism) was downregulated.

In Aber Wrac'h, categories C (energy production and conversion), E, O, and Q largely dominated, each at 12.1%. Category I was also up-regulated with 15.2%. Downregulated proteins were mainly associated with categories O (13.3%), Z (13.3%, Cytoskeleton), and E (10%).

Finally, in Douffine, the most over-accumulated proteins were in categories I (12.7%), O (12.7%), and T (11.3%). Conversely, the most under-accumulated proteins were in categories Q (12.8%), E, H (coenzyme transport and metabolism), and W (extracellular structures), each at 10.3%.

3.4.2. Network and enrichment analyses

Following COG analyses, we conducted STRING network and KEGG enrichment analyses (Table S2) to further characterize the metabolic alterations in fish sampled from each estuarine system. Consequently, the analysis of both up-regulated and down-regulated protein subsets allowed for a comprehensive evaluation of molecular metabolic changes within the liver. This approach allowed for the precise characterization of the dysregulation of specific metabolic pathways.

3.4.2.1. Significant xenobiotic detoxification in flounder from all estuaries, less marked in the Aber Wrac'h

The molecular signatures of xenobiotic biotransformation processes are commonly used as biomarkers in ecotoxicology. These processes, that typically occur in the liver of organisms, are classified into two phases (Hassan et al., 2015). Phase I mechanisms involve mixed-function oxidases (MFOs), which result from the combined action of cytochrome P450 and NADPH-Cytochrome P450 reductase (Livingstone, 1998). MFOs activity serves as a recognized biomarker indicating the presence of contaminants such as PAHs, PCBs, and dioxins (Porte et al., 2000; Van der Oost et al., 2003). Phase II prepares for the excretion of xenobiotic intermediates formed during Phase I. This is achieved through the conjugation of metabolites to molecules such as glucuronic acid, amino acids, or glutathione by transferases. This process renders these metabolites highly hydrophilic and facilitates their elimination in the aqueous phase. The methionine cycle, associated with these detoxification mechanisms, also plays a crucial role. Methionine metabolism regulates two major homeostatic systems: cellular methylation and redox buffering. Methionine is an essential amino acid required for the synthesis of S-adenosylmethionine, the primary methylating agent in cells. It also serves as a precursor for amino acids like cysteine, which, in turn, contributes to the formation of glutathione, a key Phase II conjugating molecule and a cellular redox sensor. Previous studies have shown that the methionine cycle is often dysregulated in the livers of fish exposed to xenobiotics (Gandar et al., 2017; Galland et al., 2015).

We searched for all proteins involved in xenobiotic detoxification processes (GO:0009410, Table 4). Concerning Phase I processes, Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) is clearly implicated in the hepatic detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and other pollutants. This protein was significantly accumulated in fish from Douffine (2.29-fold), Aber Wrac'h (2.59-fold), and Guillec (2.65-fold). Another cytochrome P450, 2J2, showed increased accumulation in the livers of fish from Aber Wrac'h (1.57-fold). However, we identified no less than six cytochrome P450 proteins, five of which displayed reduced abundance in the livers of fish sampled from Quillimadec. These included cytochromes P450 2J2, 2B4, 2F2, and two isoforms of 2G1. Three of these were also diminished in Douffine, two in Flèche, and one in Guillec. Intriguingly, no cytochrome P450 proteins exhibited deregulation in the livers of fish from Guouessant.

The accumulation of CYP1A1 suggested exposure to xenobiotics in Aber Wrac'h, Guillec, and Douffine. In contrast, the down-regulation of several other CYP proteins suggested lower exposure levels in fish from Quillimadec, Douffine, and Flèche compared to those from Aven. However, it is worth noting that certain pharmaceuticals have been shown to decrease CYP450 activity through reversible inhibition, non-receptor-mediated mechanisms, or downregulation of receptor-mediated responses (Burkina et al., 2015). This has been demonstrated in vitro for CYP1A (and CYP3A) by certain antifungals, such as clotrimazole (Burkina et al., 2013) and ketoconazole (Zlabek & Zamaratskaia, 2012).

Regarding Phase II proteins (Table 4), three proteins were deregulated in fish livers from Guouessant, while only one was deregulated in fish from other estuaries, except for Aber Wrac'h. The livers of Guouessant flounders exhibited increased levels of Glutathione synthetase (1.96-fold), Glutathione peroxidase 1 (3.19-fold), and Glutathione S-transferase theta-1 (2.28-fold). Glutathione synthetase catalyses the biosynthesis of glutathione from gamma-glutamyl-cysteine and glycine. Glutathione plays a crucial role in detoxifying xenobiotics and protecting cells against oxidative damage caused by free radicals. Glutathione peroxidase-1 is an intracellular antioxidant enzyme that reduces hydrogen peroxide to water. Glutathione S-transferase theta 1 is involved in the detoxification of chemicals by conjugating reduced glutathione to various electrophilic and hydrophobic compounds.

Alterations in the methionine cycle have often been associated with fish exposure to xenobiotics (Galland et al., 2015). In our inter-estuary comparison, we observed a highly significant enrichment of the KEGG category 'Cysteine and methionine metabolism' (KEGG pathway dre00270, Table S2) and specifically investigated the involved proteins (Table 4). We identified nine proteins from this cycle that were down-regulated in the livers of fish from Flèche. Six of these were down-regulated in fish from Douffine, and five in fish from Guillec. These proteins encompassed all stages of the methionine cycle and included two isoforms of betaine homocysteine methyl transferase (BHMT), three isoforms of S-adenosylmethionine (SAM) synthase, and four isoforms of adenosyl homocysteinase. This trend appears to mirror previous observations in other Brittany estuaries (Laurent et al., 2023). Similarly, the negative deregulation of

BHMT, SAM synthetase, and adenosylhomocysteinase suggested a preference for methionine synthesis over homocysteine.

Other proteins involved in xenobiotic detoxification mechanisms exhibited deregulation as well. Most of these proteins showed deregulation in fish from only one estuary. However, one enzymatic protein, 4-aminobutyrate aminotransferase (ABAT), appeared reduced in Guillec (FC=-2.37), Flèche (FC=-3.24), Quillimadec (FC=-2.12), Aber Wrac'h (FC=-3.51), and Douffine (FC=-3.62), but not in Gouessant. ABAT plays a role in the catabolism of gamma-aminobutyric acid (GABA), an important neurotransmitter and inhibitor of the central nervous system.

Table 4. List of the deregulated proteins related to xenobiotics detoxification in *P. flesus* liver from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine estuaries, as compared to fish from Aven.

	Accession	Name	GO Term	Gouessant	Guillec	Flèche	Quillimadec	Aber Wrac'h	Douffine
Phase I xenobiotics detoxification processes GO:0009410	XP_019935791.1	Cytochrome P450 1A1	-	-	2.65	-	-	2.59	2.29
	XP_019936473.1	Cytochrome P450 2J2-like	x	-	-	-	-2.71	1.57	-2.59
	XP_019957767.1	Cytochrome P450 2B4-like isoform X1	-	-	-	-1.79	-1.79	-	-2.5
	XP_019957775.1	Cytochrome P450 2F2-like	-	-	-2.32	-4.5	-2.67	-	-3.43
	XP_019943606.1	Cytochrome P450 2G1-like	-	-	-	-	-1.96	-	-
	XP_019943823.1	Cytochrome P450 2G1-like	-	-	-	-	-2	-	-
	XP_019936740.1	Dimethylaniline monooxygenase [N-oxide-forming] 5-like	x	-	-	1.86	-	-	-
Phase II xenobiotics detoxification processes GO:0009410	XP_019945053.1	Glutathione synthetase	x	1.96	-	-	-	-	-
	XP_019942157.1	Glutathione peroxidase 1-like	x	3.19	-	-	-	-	-
	XP_019945879.1	Glutathione S-transferase A-like	-	-	1.51	1.53	-	-	-
	XP_019958382.1	Glutathione S-transferase theta-1-like	-	2.28	-	-	-	-	-
	XP_019969103.1	UDP-glucuronosyltransferase-like	x	-	-	-	2.22	-	-
	XP_019969171.1	UDP-glucuronosyltransferase 2A1-like partial	x	-	-	-	-	-	-1.50
Methionine cycle	XP_019967225.1	Adenosylhomocysteinase	-	-1.54	-1.55	-1.82	-	-	-1.8
	XP_019942595.1	Adenosylhomocysteinase 2-like	-	-	-	-1.63	-	-	-
	XP_019935095.1	Adenosylhomocysteinase 2-like isoform X1	-	3.44	-	-1.51	-	-	-
	XP_019954766.1	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1-like	-	-	-2.15	-4.08	-	-2.40	-3.60
	XP_019954768.1	Betaine-homocysteine S-methyltransferase 1	-	-	-	-2.27	-	-	-1.76
	XP_019948036.1	Putative adenosylhomocysteinase 3	-	-	-	-1.61	-	-	-
	XP_019953264.1	S-adenosylmethionine synthase-like	-	-	-1.53	-1.71	-	-	-2.11
	XP_019965459.1	S-adenosylmethionine synthase	-	-	-1.60	-1.87	-	-	-2.20
XP_019956582.1	S-adenosylmethionine synthase isoform X1	-	-	-1.59	-2.17	-	-	-2.08	
Other metabolisms GO:0009410	XP_019958526.1	4-aminobutyrate aminotransferase, mitochondrial	x	-	-2.37	-3.24	-2.12	-3.51	-3.62
	XP_019937416.1	78 kda glucose-regulated protein	x	-	-	-1.60	-	-	-
	XP_019956995.1	Aminoacylase-1	x	-	-	2.11	-	-	-
	XP_019954439.1	Aspartate aminotransferase mitochondrial	x	2.02	-	-	-	-	-
	XP_019939391.1	Dynamamin-2-like	x	1.56	-	-	-	-	-
	XP_019936595.1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	x	2.50	-	-	-	-	-
	XP_019945367.1	Histamine N-methyltransferase-like	x	-	-	-	2.14	-	-
	XP_019964208.1	Primary amine oxidase liver isozyme-like	x	-	-	1.54	-	-	-
	XP_019954909.1	Proliferating cell nuclear antigen	x	-	2.00	-	-	-	-
	XP_019949439.1	Serine/threonine-protein phosphatase 2A 55 kda regulatory subunit B alpha isoform	x	1.79	-	-	-	-1.57	-

3.4.2.2. Urea cycle slightly induced in flounder from the Gouessant, Quillimadec and Douffine estuaries

The urea cycle (GO:0000050) has recently gained attention due to its potential link to exposure to nitrates and nitrites (Laurent et al., 2023). We investigated the urea cycle and found modifications in the livers of fish from the studied estuaries involving five proteins (Table 5): Argininosuccinate Lyase (ASL), Argininosuccinate Synthase (ASS), Carbamoyl phosphate synthetase II Aspartate transcarbamylase and Dihydroorotase (CAD), mitochondrial Aspartate Aminotransferase (ASAT), and cytoplasmic aspartate-tRNA ligase.

ASL, an enzyme catalysing the formation of arginine from Argininosuccinic Acid (ASA), was accumulated in Quillimadec (FC=1.57) and Douffine (FC=1.50). Arginine is subsequently decomposed into urea and ornithine, which is excreted in urine to reduce cellular nitrogen compounds. Argininosuccinate synthase (ASS), involved in the third step of the urea cycle, synthesizes argininosuccinate from citrulline and aspartate. ASS levels were modified in Flèche (FC=-3.80), Quillimadec (FC=2.53), and Aber Wrac'h (FC=-2.38). CAD protein, while not directly part of the urea cycle, can be activated in case of urea cycle deregulation or saturation (Lee et al., 2018). CAD was accumulated only in Douffine (FC=1.59).

Gouessant differed from other systems, with flounders displaying overexpression of mitochondrial aspartate aminotransferase (FC=2.02) and cytoplasmic aspartate-tRNA ligase (FC=1.85) but not of typical urea cycle enzymes. ASAT helps eliminating ammonia by producing aspartate, which enters the urea cycle, while aspartate-tRNA ligase binds aspartate to its transfer RNA to form aspartyl-tRNA-Asp.

Surprisingly, no proteins associated with the urea cycle were deregulated in fish livers from the Guillec estuary, despite the presence of high loads of nitrogen in the water (as previously mentioned). The urea cycle is responsible for converting excess ammonia into urea. This excess nitrogen typically results from the breakdown of nitrogen-containing metabolites, such as proteins, amino acids, or ammonia itself, into urea, a nitrogen compound that can be excreted (Mew et al., 2017). Our recent study (Laurent et al., 2023) suggested a potential link between fish urea cycle deregulation and exposure to a possible excess of ammonium at the interface water-sediment, in the Horn highly eutrophicated estuary. Despite very similar high loads of nitrogen observed in the Guillec water, this estuary shows mainly sandy bottoms whereas eutrophicated systems display generally muddy sediments. Thus we suggest that the bacterial nitrate reduction activity in the Guillec estuarine sediment is rather reduced and does not produce the excess of ammonium which is necessary for the induction of urea cycle. While the connection between nitrate/nitrite exposure and the urea cycle (nitrogen metabolism) remains unclear, previous studies showed urea cycle deregulation following nitrite exposure in *Penaeus* (Cheng & Chen, 2001).

The estuaries where fish accumulated proteins of the urea cycle were Gouessant, Quillimadec, and Douffine. This finding can be explained for the Gouessant by the relatively high levels of ammonium, nitrites, and nitrates, potentially originating from large-scale pig farms, corn crops, and producing green algae tides in the Bay of Saint-Brieuc. In the Quillimadec estuary, intensive vegetable cultivation and

contamination from pig manure, combined again with green algae tides in this estuary, likely contribute to urea cycle deregulation. The Douffine stream hosts three large fish farms close to the estuary that can lead to important nitrogen loads. Indeed, fish farms can generate ammonium, nitrate and nitrite pollution (Helal et al., 2017; Schenone et al., 2011), which may explain the molecular responses of fish regarding the urea cycle.

Table 5. List of the deregulated proteins related to the urea cycle in *P. flesus* liver from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine estuaries.

	Accession	Name	GO Term	Gouessant	Guillec	Flèche	Quillimadec	Aber Wrac'h	Douffine
Urea cycle	XP_019952912.1	Argininosuccinate lyase isoform X1	x	-	-	-	1.57	-	1.50
	XP_019937290.1	Argininosuccinate synthase	x	-	-	-3.80	2.53	-2.38	-
	XP_019966168.1	CAD protein partial	x	-	-	-	-	-	1.59
GO:0000050	XP_019954439.1	Aspartate aminotransferase, mitochondrial	-	2.02	-	-	-	-	-
	XP_019945774.1	Aspartate-tRNA ligase cytoplasmic	-	1.85	-	-	-	-	-

3.4.2.3. Flounder from Gouessant and Quillimadec estuaries showed responses to thermal stress

Temperature is a critical water quality parameter in rivers and estuaries, influencing various ecological processes. The proteomic analysis revealed alterations in several proteins associated with the response to thermal stress (GO:0009408). This included the dysregulation of several Heat Shock Proteins (HSPs) and HSP-binding proteins (Table 6). The largest number of deregulated proteins was observed in fish captured in the Gouessant estuary (6 proteins), followed by Quillimadec and Aber Wrac'h (4 proteins each).

HSPs are a highly conserved group of proteins with varying molecular weights (ranging from 16 to >100 kDa) found in all organisms, produced in response to cellular stress. In aquatic species, HSPs are known to be synthesized in response to changes in environmental temperature as well as other stress. Fish, in particular, express HSPs when exposed to thermal fluctuations, whether it involves an increase or decrease in temperature. As such, the expression of HSPs can be used as an indicator for environmental monitoring (Roberts et al., 2010).

The hepatic proteome of flounders from the Gouessant estuary exhibited an accumulation of proteins associated with the response to heat stress. Notable among these were two HSPs: 14-3-3 protein epsilon isoform X1 (FC=1.93) and HSP 60 kDa (FC=1.54), along with a homolog of Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (FC=2.43), which is involved in proline biosynthesis. Similarly, fish from Quillimadec displayed an accumulation of three HSPs: DNAJ homolog subfamily C member 3 (FC=2.38), HSP 70 kDa protein 4L (FC=1.51), and mitochondrial HSP 75 kDa (FC=1.57).

In contrast, the molecular signatures observed in fish from the other estuaries showed decreased levels of Stress-induced-phosphoprotein 1 in Guillec, Aber Wrac'h, and Douffine (FC=-1.88; -1.76; and -1.67, respectively), as well as a mitochondrial HSP 10 in Flèche and Aber Wrac'h (FC=-1.72 and -1.63). Fish from Flèche also exhibited a reduction in DNAJ homolog subfamily C member 3 (FC=-2.17).

During the sampling campaign, water temperature was measured in each estuary at the beginning of electric fishing, indicating an average temperature of $15.2 \pm 2.2^\circ\text{C}$ (Table S1); these point data don't allow to investigate the thermal regime of estuaries over the tidal cycle in summer. The Gouessant estuary showed the highest number of accumulated proteins associated with the thermal stress response. The Gouessant watercourse showed two successive dams located immediately upstream the estuary which might expose the fish to warmer temperatures. Indeed, dams create reservoirs where water can warm up rapidly, particularly in the summer months. Furthermore, changes in temperature along the rivers are significantly influenced by the initial upstream temperature (Poole and Berman, 2001). As a result, water impoundment can disrupt water flow and alter the natural downstream hydrograph and thermograph (Daniels et al., 2020; Cai et al., 2018; Niemeyer et al., 2018). The Quillimadec estuary also showed significant responses to thermal stress. We suggest that the impoundment located immediately upstream the Quillimadec estuary could explain a thermal stratification in the reservoir producing warm waters in the estuary.

Another hypothesis is that fish from the Gouessant and Quillimadec estuaries may be exposed to other stressors, as HSPs are known to be induced by various stress conditions. Indeed, the trigger for the synthesis of these chaperone proteins is the presence of denatured proteins within cells, which can result from multiple harmful environmental conditions. Finally, it is worth noting that HSPs also play a role in the immune system, inflammatory response, and apoptosis (Roberts et al., 2010), which may be related to the high number of deregulated proteins associated with the immune system observed in our study (see later).

Table 6. List of the deregulated proteins related to the thermal stress in *P. flesus* liver from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine estuaries.

	Accession	Name	GO Term	Gouessant	Guillec	Flèche	Quillimadec	Aber Wrac'h	Douffine
Response to thermal stress GO:0009408	XP_019950692.1	14-3-3 protein epsilon isoform X1	x	1.93	-	-	-	-	-
	XP_019941260.1	Creatine kinase M-type	x	-	-	-	-	2.17	-
	XP_019945309.1	DNAJ homolog subfamily C member 3	-	-	-	-2.17	2.38	-	-
	XP_019953119.1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	x	2.33	-	-	1.54	-	-
	XP_019937416.1	Glucose-regulated protein 78 kDa	-	-	-	-1.60	-	-	-
	XP_019958780.1	Heat shock protein 70 kDa protein 4	x	-	-	-	1.51	-	-
	XP_019940529.1	Heat shock protein 70 kDa protein 4L	-	-	-	-	-	-	1.50
	XP_019961405.1	Heat shock protein 10 kDa, mitochondrial	-	-	-	-1.72	-	-1.63	-
	XP_019961403.1	Heat shock protein 60 kDa, mitochondrial	x	1.54	-	-	-	-	-
	XP_019957327.1	Heat shock protein 75 kDa, mitochondrial-like	-	-	1.71	-	1.57	-	-
	XP_019967007.1	Plasminogen, partial	x	1.61	-	-	-	-	-
	XP_019941387.1	Stress-induced-phosphoprotein 1	-	-	-1.88	-	-	-1.76	-1.67
	XP_019952975.1	Translation initiation factor eIF-2B subunit delta	x	-	-	-	-	1.50	-

3.4.2.4. Flounder from Gouessant estuaries showed molecular signatures of hypoxia

Physico-chemical parameters measured in the estuaries on the day of fish sampling indicated oxygen concentrations ranging from 8.74 to 10.85 mg O₂.L⁻¹, well above the hypoxia threshold of 2 mg O₂.L⁻¹ (Vaquer-Sunyer & Duarte, 2008) generally accepted as critical for benthic marine organisms. Nevertheless, previous proteomic analyses have uncovered a response to thermal stress in flounders from certain systems,

which may elucidate the observed deregulations of molecular markers linked to the response to hypoxia (GO:0001666). A total of eleven proteins associated with the response to hypoxia exhibited dysregulation in our study (Table 7).

Hypoxia upregulated protein 1 (HYOU1) and Glycogen phosphorylase muscle form (PYGM) displayed the most significant deregulation. HYOU1 showed decreased abundances in fish captured from the Guillec (FC=-1.62) and Flèche (FC=-2.29) estuaries but was accumulated in Quillimadec (FC=1.73). An isoform of PYGM was accumulated in the livers of individuals from Le Guillec (FC=1.54), Flèche (FC=1.87), and Quillimadec (FC=1.57), and another isoform in Flèche (FC=1.83).

HYOU1 plays a cytoprotective role in mitochondrial repair by suppressing hypoxia-induced premature cell death. HYOU1 is part of the Heat Shock Proteins (HSPs) family and assists in protein folding and secretion in the endoplasmic reticulum (ER). Under hypoxic conditions, HYOU1 accumulates in the ER (Chene et al., 2006). PYGM serves as a key enzyme in the initial stage of glycogenolysis, supplying energy for muscle contraction. Elevated expression levels of PYGM (along with Hif1- α) have been observed in *Larimichthys crocea* under hypoxic conditions to ensure rapid energy delivery during hypoxic stress (Ding et al., 2022). In contrast, Delta-aminolevulinic acid dehydratase, an enzyme involved in the early stages of heme biosynthesis (critical for oxygen transport in organisms), showed a decreased abundance specifically in Quillimadec (FC=-2.83).

Gouessant flounders showed distinct protein deregulations compared to those observed for the other systems. Indeed, they exhibited over-activation of Alpha-1-antitrypsin (A1AT) homolog (FC=2.04), Prohibitin-2 (Phb-2) isoform X1 (FC=1.81), and of NDRG1 (FC=3.41). Conversely, L-lactate dehydrogenase A (LDHA) and Protein-tyrosine kinase 2-beta (PTK2B) were under expressed (FC=-2.11 and -3.00, respectively). A1AT is a serine protease inhibitor (serpin) that protects tissues against enzymes produced by inflammatory cells. PHBs, highly conserved proteins, are found in various cellular compartments (Mishra et al., 2006) and have been identified in the inner mitochondrial membrane. Mitochondrial prohibitin complexes control cell proliferation, cristae morphogenesis, and the functional integrity of mitochondria (Merkwirth & Langer, 2009). The NDRG1 protein has recently been assigned a distinct role as a molecular switch for hypoxia adaptation in *Danio rerio* (Park et al., 2022). Finally, LDH catalyses the conversion of pyruvate to lactate in fermentative processes that are favoured under conditions of oxygen limitation (oxygen being the final electron acceptor in respiration). Additionally, the regulatory region of the LDH gene contains essential binding sites for HIF1, which govern its regulation in response to hypoxia. In the black rockfish (*Sebastes schlegelii*), the LDHA signalling pathway is activated by HIF1 to promote anaerobic glycolysis essential for coping with the increased energy demands induced by hypoxic stress (Qin et al., 2023; Sun et al., 2020; Gong et al., 2020). Considering that we previously reported the highest Mn:Ca ratio in the otoliths of Gouessant fish, which suggested chronic exposure to hypoxia, the deregulated molecular markers in these fish are likely linked to this chronic exposure.

Despite the results above, proteomic analyses failed to detect proteins more directly associated with the response to hypoxia, such as Hypoxia Inducible Factor 1 alpha (HIF1a), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), angiopoietin, or haemoglobin. In a previous study dealing with other small estuaries from Brittany (Laurent et al., 2023), these molecular markers were markedly deregulated in several estuaries exposed to hypoxic events. However, this previous study used transcriptomic methods to identify the mentioned hypoxia response genes. Hence, either the hypoxic episodes were less severe than those observed in Laurent et al. (2023), or proteomics may be less effective than transcriptomics in revealing components of the molecular responses of flounder to hypoxic events.

Table 7. List of the deregulated proteins related to the hypoxia in *P. flesus* liver from Guouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine estuaries.

	Accession	Name	GO Term	Guouessant	Guillec	Flèche	Quillimadec	Aber Wrac'h	Douffine
Response to hypoxia GO:0001666	XP_019947567.1	Alpha-1-antitrypsin homolog	x	2.04	-	-	-	-	-
	XP_019960693.1	Delta-aminolevulinic acid dehydratase, partial	x	-	-	-	-2.83	-	-
	XP_019955757.1	Glycogen phosphorylase, muscle form	x	-	1.54	1.87	-	-	1.57
	XP_019941808.1	Glycogen phosphorylase, muscle form-like	x	-	-	1.83	-	-	-
	XP_019941425.1	Hypoxia up-regulated protein 1	x	-	-1.62	-2.29	1.73	-	-
	XP_019957754.1	L-lactate dehydrogenase A chain	x	-2.11	-	-	-	-	-
	XP_019936938.1	Prohibitin-2 isoform X1	x	1.81	-	-	-	-	-
	XP_019946232.1	Protein NDRG1	x	3.41	-	-	-	-	-
	XP_019953062.1	Protein-tyrosine kinase 2-beta-like	x	-3.00	-	-	-	-	-

3.5.2.5. Stimulation of fatty acids oxidation

We have observed that hypoxia affects fish's ability to produce energy, but the primary energy reserve in fish is their lipid stores. Another category of proteins that was clearly deregulated relates to fatty acid metabolism (GO:0006631) (Table 8). We notably observe a significant decrease in acetyl-CoA carboxylase (FC=-4.05 and -4.50 in Quillimadec and Aber Wrac'h, respectively), responsible for malonate synthesis, which is the first step in fatty acid synthesis, and fatty acid synthase itself is reduced in the livers of fish from Guillec, Quillimadec, and Aber Wrac'h.

While this modification did not appear so clearly in fish sampled from the other estuaries, we can clearly see signs of enhanced lipid degradation in general (evidenced, for example, by a 1.88-fold induction of bile salt-activated lipase in Guouessant) and specifically in fatty acids. Indeed, we find numerous proteins involved in the beta-oxidation of fatty acids (GO:0019395) accumulated in the livers of fish from all the estuaries studied. This included several isoforms of acyl-CoA synthetases, acyl-CoA and hydroxyacyl-CoA dehydrogenases, beta-ketothiolase, as well as 2,4 dienoyl-CoA reductase involved in the degradation of unsaturated fatty acids.

The accumulation profiles of these proteins suggest that this metabolism is highly stimulated in Douffine and Flèche (5 proteins from the GO:0019395 category accumulated, with FC ranging from 1.52 to 3), but also in Aber Wrac'h (4 proteins), Guillec, and Guouessant (3 proteins). Only one protein from this category is accumulated in fish from Quillimadec. Fatty acid beta-oxidation constitutes the most efficient energy

metabolism in animals, and its stimulation in the livers of fish from nearly all estuaries likely responds to an increased energy demand.

Table 8. List of the deregulated proteins related to the lipid metabolism in *P. flesus* liver from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine estuaries.

	Accession	Name	Gouessant	Guillec	Flèche	Quillimadec	Aber Wrac'h	Douffine
Fatty acid metabolic process GO:0006631	XP_019941296.1	Acetyl-CoA carboxylase 1 isoform X3	-	-	-	-4.05	-4.50	-
	XP_019938598.1	ATP-citrate synthase-like	-	-	-	-	-2.20	-
	XP_019959772.1	Bile salt-activated lipase-like	1.88	-	-	-	-	-
	XP_019934831.1	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	1.53	-	-	-	-	-
	XP_019959379.1	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	2.53	-	-	-	-	-
	XP_019936921.1	Elongation of very long chain fatty acids protein 1-like	1.78	-	-	-	-	-
	XP_019963310.1	Fatty acid synthase-like	-	-1.79	-	-2.-11	-2.84	-
	XP_019938362.1	Fatty acid synthase-like	-	-	-	-1.57	-1.90	-
	XP_019942157.1	Glutathione peroxidase 1-like	3.19	-	-	-	-	-
	XP_019958509.1	Hydroxyacid oxidase 1	-	-	-	-	1.50	-
	XP_019950392.1	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	-	-	-	-2.60	-2.60	-2.17
	XP_019941733.1	LOW QUALITY PROTEIN: long-chain-fatty-acid--CoA ligase 6	-	-	-	-	-2.00	-
	XP_019967376.1	Threonine synthase-like 2, partial	-	-	-	-	-	1.80
	XP_019962064.1	Thromboxane-A synthase	-	-	-2.29	-	-3.90	-2.29
XP_019962483.1	Thromboxane-A synthase-like, partial	-	-	-	-	-1.67	-	
Fatty acid Oxidation GO:0006631 and GO:0019395	XP_019933793.1	2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial-like, partial	-2.00	-	-	-	-	-
	XP_019954722.1	3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	-	-	3.00	-	-	-
	XP_019952981.1	Acetyl-CoA acetyltransferase, cytosolic	-	-	-	-	-	1.82
	XP_019956972.1	ATP-binding cassette sub-family D member 3	-	2.00	-	-	-	-
	XP_019949074.1	Electron transfer flavoprotein subunit beta	-	-	-	-	-	-1.64
	XP_019959379.1	Electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	2.53	-	-	-	-	-
	XP_019946456.1	Fatty acid-binding protein, heart-like	-	-	2.18	-	-	2.82
	XP_019958509.1	Hydroxyacid oxidase 1	-	-	-	-	1.50	-
	XP_019956691.1	Hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase, mitochondrial	1.63	-	1.52	-	-	1.52
	XP_019940771.1	Isovaleryl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	-	-2.27	-	-	-	-
	XP_019938084.1	Methylglutaconyl-CoA hydratase, mitochondrial	-2.18	-	-	-	-	-
	XP_019939462.1	Peroxisomal acyl-coenzyme A oxidase 1 isoform X1	-	-	-	-	1.56	-
	XP_019945842.1	Peroxisomal bifunctional enzyme	-	-	-	-1.60	-	-
	XP_019935560.1	Very long-chain acyl-CoA synthetase-like	2.15	-	-	-	-	-
	XP_019934607.1	Very long-chain acyl-CoA synthetase-like	-	1.66	-	1.86	1.66	1.58
	XP_019934608.1	Very long-chain acyl-CoA synthetase-like	-	1.69	1.91	-	1.78	-
XP_019951247.1	Very long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	-	-	2.14	-	-	2.00	

3.4.2.5. Immune system, the first response mechanism to stress, especially for flounder from Gouessant

Proteomic analyses have revealed significant deregulation of a large number of proteins associated with the immune system (Table 9), especially those related to the complement system (GO:0006955 and GO:0006956). Complement proteins correspond to the set of enzymes involved in the organism's immune defense. The complement system serves as a bridge between innate and acquired immunity, facilitating enhanced antibody responses, immunological memory, lysis of foreign cells, and the clearance of antigen-antibody complexes and apoptotic cells (Lubbers et al., 2017).

Fish sampled in the Guillec estuary exhibited the fewest deregulated proteins related to complement, with 2 up-regulated and 4 down-regulated proteins. Flounder captured in Quillimadec and Douffine displayed 11 deregulated proteins, while those from Flèche and Aber Wrac'h showed 12 dysregulated proteins. In contrast, fish from the Gouessant estuary presented the highest number of deregulated proteins associated with the complement system, featuring 12 up-regulated and 3 down-regulated proteins (Table 9).

KEGG enrichment analysis revealed the overexpression of proteins linked to "Salmonella infection" (KEGG pathway dre05132, Table S2) exclusively in flounder from the Gouessant estuary. The deregulation of this pathway specifically reflects the development of an immune response specific to fish from Gouessant.

Among the numerous deregulated proteins, Complement C3 and Complement factor B both exhibited decreased levels in the livers of flounder from Guillec (FC=-1.81; -1.56), Aber Wrac'h (FC=-2.00; -1.92), and Douffine (FC=-1.61; -1.56). These two proteins were not significantly deregulated in fish from Gouessant, Flèche, and Quillimadec. While Complement factor 3 is one of the most abundant proteins in serum and plays a pivotal role in complement activation, Complement factor B is a component of the alternative complement pathway, contributing to complement activation in response to bacterial invasion (Laskowski & Thurman, 2018; Sunyer et al., 1997; Li & Sun, 2017). The absence of detection of these two complement proteins in fish from Guillec, Aber Wrac'h, and Douffine, compared to those from the reference estuary (Aven), suggests a potentially weaker immune response in these three systems.

Likewise, three distinct Major Vault like Proteins (MVPs) exhibited decreased levels exclusively in the hepatic proteome of flounder from Aber Wrac'h. Chronic exposure of epidermal cells to low levels of benzo-a-pyrene (BAP) has been linked to MVP overexpression in previous studies (Cheng et al., 2000). Although MVPs are abundant in various cell types, including macrophages, dendritic cells, epithelial cells, and liver neoplasia, their precise functions remain elusive. Juvenile mullets (*Chelon labrosus*) exposed to heavy fuel oil displayed significantly up-regulated hepatic MVPs (De Cerio et al., 2012). Consequently, the under-detection of MVPs in flounder from Aber Wrac'h, compared to those from Aven, could be associated with chronic PAH exposure across all systems, including Aven.

Finally, the analysis of the liver proteome revealed the deregulation of several proteins associated with the inflammatory response, such as Cathepsin B-like, Leukotriene A-4 hydrolase, and Plasma alpha-L-

fucosidase, and proteins linked to lymphocyte activation, such as Dipeptidyl peptidase 1 and the biased Plastin-2.

Table 9. List of the deregulated proteins related to the immune system and complement in *P. flesus* liver from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine estuaries.

	Accession	Name	Gouessant	Guillec	Flèche	Quillimadec	Aber Wrac'h	Douffine
	XP_019940057.1	26S proteasome non-atpase regulatory subunit 12	-	-	-	1.55	-1.82	-
	XP_019933970.1	Annexin A2	2.41	-	-	-	-	-
	XP_019938598.1	ATP-citrate synthase-like	-	-	-	-	-2.2	-
	XP_019935573.1	Bifunctional glutamate/proline--tr- ligase isoform X1	-	-	-	1.58	-	-
	XP_019935873.1	Cathepsin B-like	-	-	2.18	-	-	1.82
	XP_019954440.1	Coatomer subunit beta	-	-	-1.83	-	-	-
	XP_019939804.1	Complement C3-like	-	-1.81	-	-	-2	-1.61
	XP_019940984.1	Complement factor B-like	-	-1.56	-	-	-1.92	-1.56
	XP_019952113.1	Copine-3-like	-	-	-1.5	-2.45	-	-1.8
	XP_019943008.1	Copine-3-like isoform X1	-1.73	-	-	-	-	-
	XP_019953565.1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	-	-	-1.76	-	-	-
	XP_019962518.1	Desmoplakin isoform X1	-	-	-	-4.33	-	-5.2
	XP_019950815.1	Dipeptidyl peptidase 1	-	-	-	1.6	-	-
	XP_019965773.1	Elongation factor 2	3.14	-	-	-	-	-
	XP_019934932.1	F-actin-capping protein subunit alpha-2	5.25	-	-	-	-	-
	XP_019968127.1	Filamin-B-like	-2.21	-	-	-	-	-
	XP_019968923.1	Filamin-B-like, partial	-	-	-1.86	-	-	-
	XP_019953732.1	Glycogen phosphorylase, liver form	-	-	1.71	-	-	-
	XP_019955013.1	GTP cyclohydrolase 1-like	1.67	-	-	-	1.81	1.51
	XP_019965662.1	Histone H2B 1/2	2.13	-	-	-1.53	-	-
Complement activation GO:0006955 GO:0006956	XP_019936595.1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase	2.5	-	-	-	-	-
	XP_019933904.1	Importin subunit beta-1-like, partial	-	-	-	1.71	-	-
	XP_019965427.1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic-like	-	-	-	-	-	1.57
	XP_019968933.1	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic-like	-	1.73	1.5	-	-	1.76
	XP_019939583.1	Keratin, type I cytoskeletal 13-like	-	-	-	-2.25	-	-
	XP_019939584.1	Keratin, type I cytoskeletal 13-like	-	-	-	-2.63	-	-
	XP_019966124.1	Kinesin-1 heavy chain	1.61	-	-2.2	-	-1.83	-1.83
	XP_019961736.1	Leukotriene A-4 hydrolase	-	-	-	1.89	-	-
	XP_019954492.1	Lysine-tRNA ligase isoform X1	1.61	-	-	-	-	-
	XP_019963864.1	Major vault protein-like	-	-	-	-	-1.63	-
	XP_019969345.1	Major vault protein-like, partial	-	-	-	-	-2.05	-
	XP_019969569.1	Major vault protein-like, partial	-	-	-	-	-2.08	-
	XP_019942688.1	Methyltransferase-like protein 7A	1.58	-	-	-	-	-
	XP_019956957.1	Phosphoglucomutase-2	-	1.95	1.55	-	-	1.5
	XP_019953758.1	Plasma alpha-L-fucosidase	-	-	-	-	1.67	-
	XP_019968985.1	Plastin-2, partial	-	-	-	-	-2.89	-
	XP_019954173.1	Proteasome subunit beta type-1	2.25	-	-	-	-	-
	XP_019953062.1	Protein-tyrosine kinase 2-beta-like	-3	-	-	-	-	-
	XP_019941652.1	T-complex protein 1 subunit theta isoform X1	2.14	-	-	-	-	-
	XP_019942989.1	Thioredoxin domain-containing protein 5	-	-2.14	-1.76	-	-	-1.67
XP_019956568.1	Transitional endoplasmic reticulum atpase	-	-	-	1.52	-	-	
XP_019967815.1	Triokinase/FMN cyclase	1.98	-	-	-	-2.13	-	
XP_019952833.1	Vitronectin-like	-	-2.33	-1.91	-2.1	-	-	

3.4.3. Updating the typologies of the studied estuaries in the light of proteomics

The prior principal component analysis (PCA), which integrated environmental characteristics such as geography, hydrobiology, pollutant chemistry, and biomarkers specific to targeted fish (Fig. 3), has now

been augmented with -omics data to accurately establish the typology of the seven small estuaries, in Brittany.

The **Aven** watershed still appeared to be the system least affected by human activities. Indeed, the flounders sampled in this estuary showed the lowest levels of metals in their muscle, with the exception of relatively high values of arsenic. The source of arsenic contamination in Aven is not clearly identified at this time. However, no induction of arsenate methyltransferase was observed in Aven flounders, in contrast to Laurent et al. (2023b). Monitoring arsenic contamination in this hydrosystem is therefore necessary to better understand its origin. In the estuary, a small harbour and a car park could explain the contamination by PAHs. In addition, low values of nitrite and nitrate loads were detected in the estuarine water. Indeed, agricultural pressure is quite moderate, and mainly oriented towards the production of canned vegetables over the watershed. At last, the Aven basin showed a high density of bocage which plays a major role in the purification of runoff water; hedges and embankments increasing the runoff time of rainwater and thus facilitate its infiltration into the soil (Caubel, 2001). These results confirm the Aven watershed as a relevant and stable reference hydrosystem over time for -omics approaches in flounder.

On the other hand, the **Gouessant** watershed emerged as the most anthropised and stressed among the studied systems. This watershed is characterized by heavy agricultural pressure with high nitrate and nitrite loads due to intensive pig farming and corn crops, and a particularly reduced hedge density. We suggest that concentrations of pesticides could be low in the Gouessant estuary located downstream two dams which could reduce downstream transfer of pesticides, and favour their degradation in the reservoirs. Thus, the activation of phase II xenobiotic detoxification could be related to the antioxidant defense after a more or less chronic exposure to cyanotoxin developed in the eutrophicated reservoirs and transferred to the estuary. The fish antioxidant activity may help to restore the liver function after a cyanotoxin contamination (Paulino et al., 2020; Falfushynska et al., 2023). Furthermore, flounders from the Gouessant showed an induction of the urea cycle related to excess of nitrogen, heat stress and hypoxia response proteins. The marked deregulation of proteins related to immune system in the Gouessant could be the signal of severe immune disorders induced by cyanotoxins in rivers (Falfushynska et al., 2023).

The four adjacent watersheds, Guillec, Flèche, Quillimadec and Aber Wrac'h, were apparently similar, with high agricultural pressure linked to vegetable cultivation and high inputs of nitrogen and pesticides (Crisan M., 2020). However, we have been able to differentiate them, thanks to proteomics.

Fish from **Guillec** were mainly characterized by hypoxic risk, the activation of the xenobiotic detoxification, probably related to intensive production of vegetables and massive phytosanitary treatments over the whole watershed.

Flounders from **Flèche** also showed deregulation of proteins associated with xenobiotic detoxification, but more specifically we observed a down-regulation of proteins involved in cysteine and methionine metabolism. Thus, the cocktail of organic pollutants is probably relatively different in Flèche vs Guillec.

This watershed is also characterized by the production of vegetables and displays a particularly high level of livestock. Fish from Flèche showed a particular increase of their metabolic rate responding to an increased energy demand by beta-oxidation of fatty acids. Furthermore, a strong deregulation of proteins related to complement was observed in this hydrosystem.

Flounders from **Quillimadec** displayed an activation of the xenobiotic detoxification, an induction of the urea cycle linked to excess of nitrogen; these responses could be linked to agricultural activities and to a relatively high human population density. The fish response to thermal stress is probably linked to warm waters coming from the reservoir upstream the estuary.

The **Aber Wrac'h** hydrosystem appeared as the least impacted by stressors considering the four agricultural adjacent watersheds, except for an arsenic contamination. Thus, proteomics revealed no obvious xenobiotic detoxification activity.

The **Douffine** watershed stood out from the other hydrosystems due to multi-metallic contamination related to past mining operations. A present industrial activity and domestic wastes of a village just upstream the estuary could explain the deregulation of Phase I proteins, cysteine and methionine metabolism, and other associated proteins. The Douffine system was also characterized by intense fish farming activity, which induced high nitrogen loads and hence eutrophication, possibly explaining the deregulation of the urea cycle observed with proteomics. Finally, fish in Douffine showed a deregulation of proteins involved in the degradation of unsaturated fatty acids metabolism, probably due to the wastes of fish farming.

4. Conclusion

In a previous study, we provided some initial insights into the ecology of stress to assess the health status of estuaries. We decided to extend this study with new small estuaries in Brittany, even if it remains a very difficult exercise. Seven small estuarine systems, located in Brittany, were thus compared through an integrative approach. This integrative approach combined data on watershed geography, water and sediment chemistry, and biology of the estuarine flatfish *P. flesus*, including fitness biomarkers and shotgun proteomics. Data at different spatial and temporal scales were collected and analysed, in order to establish a high quality diagnostic of estuaries. The largest scale was obtained with geography and land use, which gives an overall view. The finest scale was obtained with molecular approaches and more particularly proteomics, which give an overview of the whole metabolism of fish liver. The proteome is mainly affected by short/medium term changes in estuarine water conditions.

The different approaches presented in the present article were very complementary and allowed to define a very accurate typology of anthropisation in the different watersheds.

For instance, in the four adjacent, agricultural hydrosystems, fish liver metabolisms differed. Flounders from Guillec, Flèche and Quillimadec showed differential signatures of exposure to stressors (hypoxia, pesticides, excess of nitrogen, thermal stress, population density). We suggest that the better ecological status of the Aber Wrac'h can be explained by the well-preserved bocage, higher natural surfaces and riparian vegetation over the watershed.

Very few such exhaustive studies on estuaries have been already conducted. Thus, the methodology highlighted in

the present paper could produce relevant tools for developing new management and restoration strategies for anthropised watersheds.

5. Acknowledgments

This work was funded by the “Agence de l’eau Loire-Bretagne” (AELB, project ECOEST) and the “LTSER Zone Atelier Brest-Iroise”, CNRS and AllEnvi (Project STRESS). This project was also supported by ISblue project, Interdisciplinary graduate school for the blue planet: ANR-17-EURE-0015 (Project ESTUARIES), and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir".

Many thanks to J.-C. Gaillard, M. Gallinari, E. Dabas - A. Jolivet - F. Dewilde for help in proteomics, ions-, otolith trace elements- assays, respectively. Many thanks to P. Mazari for valuable help in the geography part of the work.

This work also benefited from the French GDR EA, “Aquatic Ecotoxicology”, framework that aims at fostering scientific discussions and collaborations for more integrative approaches.

6. References

- Aminot, A., & Kérouel, R. (2007). *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu* (Editions Quae, Ed.).
- Bahamonde, P. A., Feswick, A., Isaacs, M. A., Munkittrick, K. R., & Martyniuk, C. J. (2016). Defining the role of omics in assessing ecosystem health: perspectives from the Canadian environmental monitoring program. *Environmental toxicology and chemistry*, 35(1), 20-35. <https://doi.org/10.1002/etc.3218>
- Bárcena, J. F., Gómez, A. G., García, A., Álvarez, C., & Juanes, J. A. (2017). Quantifying and mapping the vulnerability of estuaries to point-source pollution using a multi-metric assessment: The Estuarine Vulnerability Index (EVI). *Ecological indicators*, 76, 159-169. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.01.015>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133760>
- Borcier, E., Charrier, G., Couteau, J., Maillet, G., le Grand, F., Bideau, A., Waeles, M., le Floch, S., Amara, R., Pichereau, V., & Laroche, J. (2020). An Integrated Biomarker Approach Using Flounder to Improve Chemical Risk Assessments in the Heavily Polluted Seine Estuary. *Journal of Xenobiotics*, 10(2), 14–35. <https://doi.org/10.3390/jox10020004>
- Burkina, V., Zlabek, V., & Zamaratskaia, G. (2015). Effects of pharmaceuticals present in aquatic environment on Phase I metabolism in fish. *Environmental toxicology and pharmacology*, 40(2), 430-444. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.07.016>
- Burkina, V., Zlabek, V., & Zamaratskaia, G. (2013). Clotrimazole, but not dexamethasone, is a potent in vitro inhibitor of cytochrome P450 isoforms CYP1A and CYP3A in rainbow trout. *Chemosphere*, 92(9), 1099-1104. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.050>
- Cai, H., Piccolroaz, S., Huang, J., Liu, Z., Liu, F., & Toffolon, M. (2018). Quantifying the impact of the Three Gorges Dam on the thermal dynamics of the Yangtze River. *Environmental Research Letters*, 13(5), 054016. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/aab9e0>
- Callaway, R., Grenfell, S. & Lønborg, C. (2014). Small estuaries: Ecology, environmental drivers and management challenges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 150, 193-195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.06.009>
- Chene, P., Cechowska-Pasko, M., & Bankowski, E. (2006). The effect of hypoxia on the expression of 150 kDa oxygen-regulated protein (ORP 150) in HeLa cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 17(1-2), 89-96. <https://doi.org/10.1159/000091467>

- Cheng, S.Y., Chen, J.C. (2001). The time-course change of nitrogenous excretion in the kuruma shrimp *Penaeus japonicus* following nitrite exposure. *Aquatic Toxicology*, 51 (4), 443–454. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(00\)001223](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(00)001223).
- Cheng, S. H., Lam, W., Lee, A. S., Fung, K. P., Wu, R. S., & Fong, W. F. (2000). Low-level doxorubicin resistance in benzo [a] pyrene-treated KB-3-1 cells is associated with increased LRP expression and altered subcellular drug distribution. *Toxicology and applied pharmacology*, 164(2), 134–142. <https://doi.org/10.1006/taap.2000.8903>
- Chiffolleau, J.-F. (2017). La contamination chimique sur le littoral Loire-Bretagne. Résultats de 35 années de suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique. RST.RBE-BE/2017.02. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00405/51617/>
- Chung, M. T., Trueman, C. N., Godiksen, J. A., Holmstrup, M. E., & Grønkjær, P. (2019). Field metabolic rates of teleost fishes are recorded in otolith carbonate. *Communications Biology*, 2(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0266-5>
- Crisan, M. (2020). *Pratiques culturelles en grandes cultures 2017, IFT et nombre de traitements, Agreste Chiffres et Données*.
- Daniels, M. E., & Danner, E. M. (2020). The drivers of river temperatures below a large dam. *Water Resources Research*, 56(5), e2019WR026751. <https://doi.org/10.1029/2019WR026751>
- De Cerio, O. D., Bilbao, E., Cajaraville, M. P., & Cancio, I. (2012). Regulation of xenobiotic transporter genes in liver and brain of juvenile thicklip grey mullets (*Chelon labrosus*) after exposure to Prestige-like fuel oil and to perfluorooctane sulfonate. *Gene*, 498(1), 50–58. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.01.067>
- Ding, J., Zhang, Y., Wang, J., Liu, C., Gao, X., Wu, Y., Wang, J., Zhu, J., & Shen, W. (2022). Genome-wide association study identified candidate SNPs and genes associated with hypoxia tolerance in large yellow croaker (*Larimichthys crocea*). *Aquaculture*, 560, 738472. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738472>
- Doubleday, Z. A., Izzo, C., Haddy, J. A., Lyle, J. M., Ye, Q., & Gillanders, B. M. (2015). Long-term patterns in estuarine fish growth across two climatically divergent regions. *Oecologia*, 179(4), 1079–1090. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3411-6>
- ECETOC. (2010). European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. 'Omics in (eco)toxicology: Case Studies and Risk Assessment. 'Omics in (eco)toxicology: Case Studies and Risk Assessment. *Workshop Report, no. 19*.
- Elliott, M. (2011). Marine science and management means tackling exogenic unmanaged pressures and endogenic managed pressures - A numbered guide. In *Marine Pollution Bulletin*, 62(4), 651–655. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.11.033>
- Elliott, M., Cutts, N. D., & Trono, A. (2014). A typology of marine and estuarine hazards and risks as vectors of change: a review for vulnerable coasts and their management. *Ocean & Coastal Management*, 93, 88–99. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2014.03.014>
- Elliott, M., & Whitfield, A. K. (2011). Challenging paradigms in estuarine ecology and management. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 94(4), 306–314. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.06.016>
- Falfushynska, H., Kasianchuk, N., Siemens, E., Henao, E., & Rzymyski, P. (2023). A review of common cyanotoxins and their effects on fish. *Toxics*, 11(2), 118. <https://doi.org/10.3390/toxics11020118>
- Galland, C., Dupuy, C., Capitaine, C., Auffret, M., Quiniou, L., Laroche, J., & Pichereau, V. (2013). Comparisons of liver proteomes in the European flounder *Platichthys flesus* from three contrasted estuaries. *Journal of Sea Research*, 75, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.05.009>
- Gandar, A., Laffaille, P., Marty-Gasset, N., Viala, D., Molette, C., & Jean, S. (2017). Proteome response of fish under multiple stress exposure: effects of pesticide mixtures and temperature increase. *Aquatic Toxicology*, 184, 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.004>
- Gong, D., Xu, L., Li, W., Shang, R., Chen, J., Hu, F., Wang, S., Liu, Q., Wu, C., Zhou, R., Zhang, C., Tao, M., Wang, Y., & Liu, S. (2020). Comparative analysis of liver transcriptomes associated with hypoxia tolerance in the gynogenetic blunt snout bream. *Aquaculture*, 523, 735163. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735163>
- Gouveia, D., Almunia, C., Cogne, Y., Pible, O., Degli-Esposti, D., Salvador, A., Cristobal, S., Sheehan, D., Chaumot, A., Geffard, O., & Armengaud, J. (2019). Ecotoxicoproteomics: A decade of progress in our understanding of anthropogenic impact on the environment. *Journal of Proteomics*, 198, 66–77. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.12.001>
- Hassan, I., Jabir, N. R., Ahmad, S., Shah, A., & Tabrez, S. (2015). Certain phase I and II enzymes as toxicity biomarker: an overview. *Water, Air, & Soil Pollution*, 226(5), 1–8. <https://doi.org/10.1007/bf02803638>
- Helal, A. M., Attia, A. M., & Mustafa, M. M. (2017). Water conservation and management of fish farm in Lake Mariout. *Life Science Journal*, 14(11), 44–51. <http://www.dx.doi.org/10.7537/marslsj141117.08>
- Jeffrey, J. D., Jeffries, K. M., & Suski, C. D. (2019). Physiological status of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) in the Illinois River: An assessment of fish at the leading edge of the invasion front. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 32, 100614. <https://doi.org/10.1016/J.CBD.2019.100614>
- Lacroix, C., le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., & Guyomarch, J. (2014). Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *Journal of Chromatography A*, 1349, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.04.094>

- Laskowski, J., & Thurman, J. M. (2018). Factor B. *The complement factsbook (Second Edition)*, 135-146. Academic press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-810420-0.00014-6>.
- Laurent, J., Lavergne, E., Couteau, J., le Floch, S., Ouddane, B., Cachot, J., Davail, B., Clérandeau, C., Devin, S., Fisson, C., Devaux, A., Amara, R., Diop, M., Pichereau, V., & Laroche, J. (2022). Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research*, 29(39), 59751–59769. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20000-y>
- Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Kailasam, S., Couteau, J., Waeles, M., Le Floch, S., Laroche, J. & Pichereau, V. (2023). Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France. *Science of The Total Environment*, 163195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163195>
- Li, X. P., & Sun, L. (2017). A teleost complement factor Ba possesses antimicrobial activity and inhibits bacterial infection in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 71, 49-58. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.01.021>
- Livingstone, D. R. (1998). The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 43-49. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10008-9](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10008-9)
- Lubbers, R., Van Essen, M. F., Van Kooten, C., & Trouw, L. A. (2017). Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical & Experimental Immunology*, 188(2), 183-194. <https://doi.org/10.1111/cei.12952>
- Martyniuk, C. J. (2018). Are we closer to the vision? A proposed framework for incorporating omics into environmental assessments. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 59, 87–93. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.03.005>
- Merkwirth, C., & Langer, T. (2009). Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1793(1), 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.013>
- Mishra, S., Murphy, L. C., & Murphy, L. J. (2006). The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(2), 353-363. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00404.x>
- Niemeyer, R. J., Cheng, Y., Mao, Y., Yearsley, J. R., & Nijssen, B. (2018). A thermally stratified reservoir module for large-scale distributed stream temperature models with application in the Tennessee River basin. *Water Resources Research*, 54(10), 8103-8119. <https://doi.org/10.1029/2018WR022615>
- Pédrón, N., Artigaud, S., Infante, J. L. Z., Le Bayon, N., Charrier, G., Pichereau, V., & Laroche, J. (2017). Proteomic responses of European flounder to temperature and hypoxia as interacting stressors: differential sensitivities of populations. *Science of the Total Environment*, 586, 890-899. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.068>
- Park, J.S., Gabel, A.M., Kassir, P., Kang, L., Chowdhary, P.K., Osei-Ntansah, A., Tran, N.D., Viswanathan, S., Canales, B., Ding, P., Lee, Y.S., Brewster, R. (2022). N-myc Downstream Regulated Gene 1 (NDRG1) functions as a molecular switch for cellular adaptation to hypoxia. *Elife*, 11, e74031. <https://doi.org/10.7554/eLife.74031>
- Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplanche, C., Merlina, G., Sánchez-Pérez, J. M., & Pinelli, E. (2011). Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 126–134. <https://doi.org/10.1016/J.AQUATOX.2010.09.014>
- Paulino, M. G., Tavares, D., Terezan, A. P., Sakuragui, M. M., Pesenti, E., Giani, A., Margareth, M., Fernandes, J. B., & Fernandes, M. N. (2020). Biotransformations, antioxidant system responses, and histopathological indexes in the liver of fish exposed to cyanobacterial extract. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(5), 1041-1051. <https://doi.org/10.1002/etc.4696>
- Poole, G. C., & Berman, C. H. (2001). An ecological perspective on in-stream temperature: natural heat dynamics and mechanisms of human-caused thermal degradation. *Environmental management*, 27, 787-802. <https://doi.org/10.1007/s002670010188>
- Porte, C., Escartín, E., García, L. M., Solé, M., & Albaigés, J. (2000). Xenobiotic metabolising enzymes and antioxidant defences in deep-sea fish: relationship with contaminant body burden. *Marine Ecology Progress Series*, 192, 259-266. <https://doi.org/10.3354/meps192259>
- Pujol, J. (2015). *Enquête : Pratiques culturelles sur les légumes 2013, Nombre de traitements phytosanitaires, Agreste Les Dossiers*.
- Qin, H., Zhang, X., Xie, T., Gao, Y., Li, J., & Jia, Y. (2023). Hepatic transcriptomic analysis reveals that Hif1 α /LDHA signal is involved in the regulation of hypoxia stress in black rockfish *Sebastes schlegelii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 47, 101098. <https://doi.org/10.1016/j.cbd.2023.101098>
- Reis-Santos, P., Gillanders, B. M., Sturrock, A. M., Izzo, C., Oxman, D. S., Lueders-Dumont, J. A., Hüßy, K., Tanner, S. E., Rogers, T., Doubleday, Z. A., Andrews, A. H., Trueman, C., Brophy, D., Thiem, J.D., Baumgartner, L. J., Willmes, M., Chung, M.-T., Charapata, P., Johnson, R. C., Trumble, S., Heimbrand, Y., Limburg, K. E., & Walther, B. D. (2023). Reading the biomineralized book of life: expanding otolith biogeochemical research and applications for fisheries and ecosystem-based management. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 33(2), 411-449. <https://doi.org/10.1007/s11160-022-09720-z>

- Roberts, R. J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., & Sung, Y. Y. (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of fish diseases*, 33(10), 789-801. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x>
- Schenone, N. F., Vackova, L., & Cirelli, A. F. (2011). Fish-farming water quality and environmental concerns in Argentina: a regional approach. *Aquaculture International*, 19, 855-863. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9404-x>
- Sun, J. L., Zhao, L. L., Wu, H., Liu, Q., Liao, L., Luo, J., Lian, W. Q., Can, C., Jin, L., Li, M. Z., & Yang, S. (2020). Acute hypoxia changes the mode of glucose and lipid utilization in the liver of the largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Science of the Total Environment*, 713, 135157. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135157>
- Sunyer, J. O., Tort, L., & Lambris, J. D. (1997). Diversity of the third form of complement, C3, in fish: functional characterization of five forms of C3 in the diploid fish *Sparus aurata*. *Biochemical Journal*, 326(3), 877-881. <https://doi.org/10.1042/bj3260877>
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology*, 13(2), 57-149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- Vasconcelos, R. P., Henriques, S., França, S., Pasquaud, S., Cardoso, I., Laborde, M., & Cabral, H. N. (2015). Global patterns and predictors of fish species richness in estuaries. *Journal of Animal Ecology*, 84(5), 1331-1341. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12372>
- Zlabek, V., & Zamaratskaia, G. (2012). Comparison of three fluorescent CYP3A substrates in two vertebrate models: pig and Atlantic salmon. *Animal*, 6(4), 633-640. <https://doi.org/10.1017/S1751731111002096>

Supplementary data

Table S1. Samples description from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven.

Estuaries	GOUESSANT	GUILLEC	FLÈCHE	QUILLIMA DEC	ABER WRAC'H	DOUFFINE	AVEN
Collection date	08/10/2020	16/09/2020	30/09/2020	22/09/2020	28/09/2020	29/09/2020	23/09/2020
Location	48°31'14.4"N 2°37'21.9"W	48°40'15.7"N 4°03'23.2"W	48°37'16.3"N 004°16'15.9" W	48°38'14.2" N 4°23'52.0"W	48°34'23.7"N 4°28'54.8"W	48°15'21.2" N 4°05'45.9"W	47°51'06.9"N 3°44'49.9"W
Temperature (°C)	14.2	16.3	14.4	17.4	12.3	13.4	18.4
Salinity (g.L ⁻¹)	0.1	0.1	0.1	0.3	0.1	0.1	1.3
O ₂ concentration (mg.L ⁻¹)	10.34	9.93	10.33	9.91	10.85	8.74	9.99
Condition Factor	0.93 ± 0.02	0.96 ± 0.02	0.96 ± 0.01	0.92 ± 0.01	0.97 ± 0.01	0.98 ± 0.02	1.01 ± 0.01

Table S2. KEGG enrichment analyses of the different subsets of proteins found deregulated in *P. flesus* liver from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven estuaries.

Estuaries	KEGG pathway	Term description	Gene count	False discovery rate
Gouessant up-regulated	dre01100	Metabolic pathways	57	2.76e-19
	dre01200	Carbon metabolism	13	1.23e-08
	dre03010	Ribosome	11	1.41e-06
	dre03050	Proteasome	8	1.90e-06
	dre05132	Salmonella infection	13	1.09e-05
	dre00020	Citrate cycle (TCA cycle)	6	2.93e-05
	dre00630	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	6	2.95e-05
	dre00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	6	6.21e-05
Gouessant down-regulated	dre01100	Metabolic pathways	14	7.34e-05
Guillec up-regulated	dre00500	Starch and sucrose metabolism	4	8.02e-05
Guillec down-regulated				
Flèche up-regulated	dre01100	Metabolic pathways	24	5.21e-12
	dre00500	Starch and sucrose metabolism	7	8.84e-10
Flèche down-regulated	dre04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	13	3.33e-12
	dre00270	Cysteine and methionine metabolism	7	4.05e-08
	dre01100	Metabolic pathways	22	4.05e-08
Quillimadec up-regulated	dre00970	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	9	1.03e-10
	dre01100	Metabolic pathways	23	2.21e-05
	dre04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	9	2.21e-05
Quillimadec down-regulated	dre01100	Metabolic pathways	18	4.94e-06
	dre00650	Butanoate metabolism	4	9.26e-05
Aber Wrac'h up-regulated	dre01100	Metabolic pathways	17	8.92e-10
	dre04146	Peroxisome	7	9.17e-09
	dre00260	Glycine, serine and threonine metabolism	4	5.68e-05
Aber Wrac'h down-regulated	dre01100	Metabolic pathways	19	1.20e-07
	dre00061	Fatty acid biosynthesis	4	4.70e-05
Douffine up-regulated	dre01100	Metabolic pathways	24	1.21e-09
Douffine down-regulated	dre01100	Metabolic pathways	15	7.75e-07

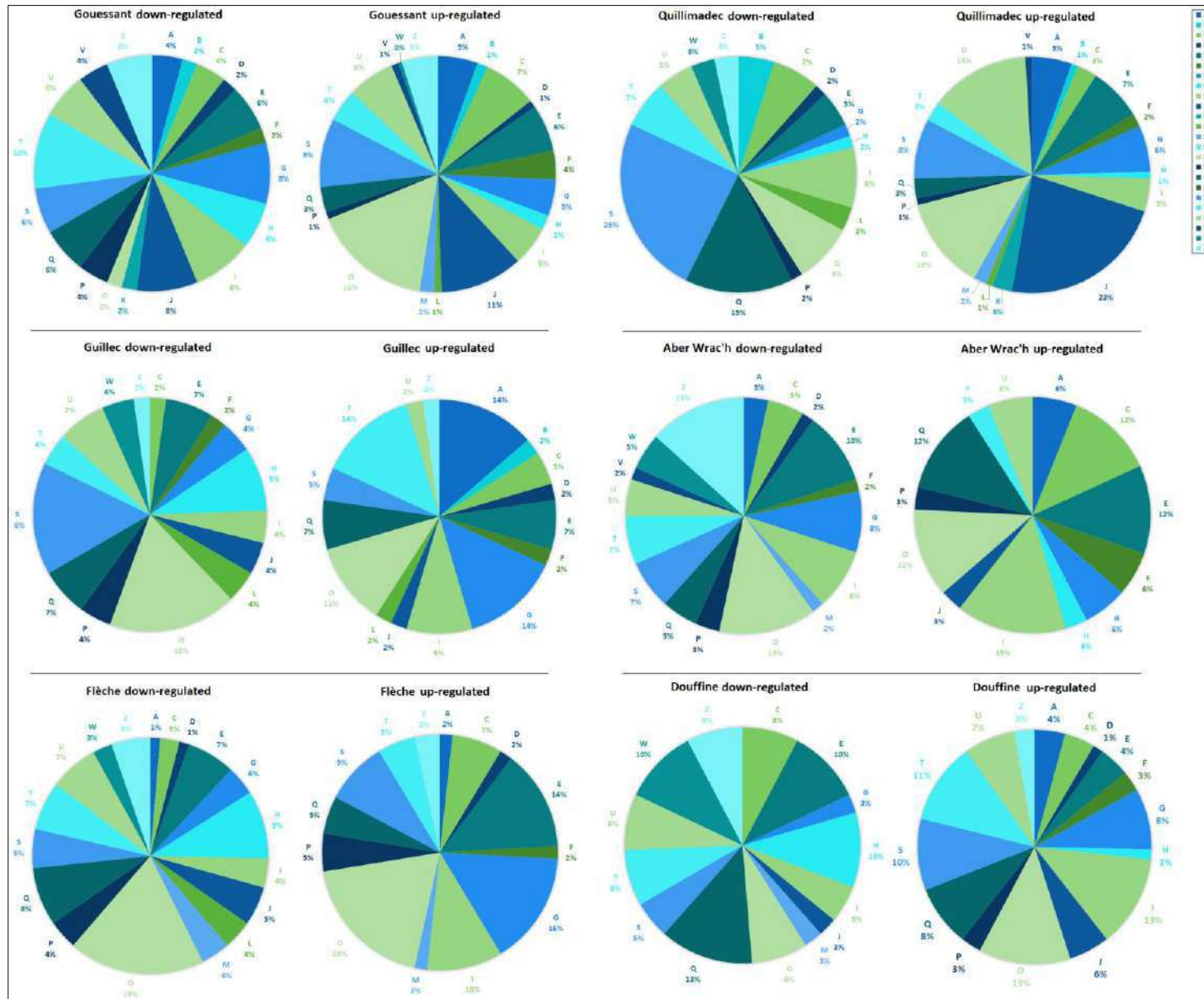


Figure S1. Pie charts representing the main Clusters of Orthologous Group (COG) categories of proteins down-regulated and up-regulated in *P. flesus* liver from Guouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h and Douffine estuaries, as compared to fish from Aven.

5. Références

- Amiard-Triquet, C., & Berthet, B. (2015). Individual Biomarkers. *Aquatic Ecotoxicology: Advancing Tools for Dealing with Emerging Risks*, 153–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800949-9.00007-3>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133760>
- Brylinski, J. M., Lagadeuc, Y., Gentilhomme, V., Dupont, J. P., Lafite, R., Dupeuble, P. A., Huault, M. F., & Auger, Y. (1991). Le fleuve côtier : Un phénomène hydrologique important en Manche orientale. Exemple du Pas-de-Calais. *Oceanologica Acta, Special Issue*. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00268/37874/>
- Callaway, R., Grenfell, S. & Lønborg, C. (2014). Small estuaries: Ecology, environmental drivers and management challenges. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 150, 193-195. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2014.06.009>
- Canévet, C. (1992). Le modèle agricole breton : histoire et géographie d'une révolution agro-alimentaire, 397. <http://www.theses.fr/1992REN20005>
- Cardoso, I., França, S., Pais, M. P., Henriques, S., da Fonseca, L. C., & Cabral, H. N. (2011). Fish assemblages of small estuaries of the Portuguese coast: a functional approach. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 93(1), 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2011.03.016>
- Carluer, N., Catalogne, C., Dagès, C., & Tournebize, J. (2017). Aménager le territoire et gérer les aménagements : les zones tampons sèches et humides, les fossés pour lutter contre les pollutions diffuses par les produits phytosanitaires dans les aires de captage. *Innovations Agronomiques*, 57, 117–139. <https://doi.org/10.15454/1.5137822668081328E12>
- Catalogne, C., & Hénaff, G. le. (2016). *Guide d'aide à l'implantation des zones tampons pour l'atténuation des transferts de contaminants d'origine agricole*. 69. <https://hal.inrae.fr/hal-02604919>
- Chung, M. T., Trueman, C. N., Godiksen, J. A., Holmstrup, M. E., & Grønkjær, P. (2019). Field metabolic rates of teleost fishes are recorded in otolith carbonate. *Communications Biology*, 2(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0266-5>
- Condini, M., Pereyra, P., Garcia, A., Saint'pierre, T., Ceni, G., Lugo, R., Fontoura, N., Vieira, J., Albuquerque, C. (2019). Use of fresh water by an estuarine-resident marine catfish: Evidence from gonadal and otolith chemistry analyses. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(7), 1667-1674. <https://doi:10.1017/S0025315419000493>
- Corriveau, J. (2009). Etude des concentrations toxiques dans les cours d'eau d'un bassin versant agricole. Thèse de doctorat en Sciences de l'eau. Université du Québec. 137.
- Crisan M. (2020). *Pratiques culturales en grandes cultures 2017, IFT et nombre de traitements, AgresteChiffres et Données*.
- Cui, D., Zhang, P., Li, H., Zhang, Z., Song, Y., & Yang, Z. (2021). The dynamic changes of arsenic biotransformation and bioaccumulation in muscle of freshwater food fish crucian carp during chronic dietborne exposure. *Journal of Environmental Sciences*, 100, 74-81. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.07.005>
- De los Ríos, A., Pérez, L., Echavarri-Erasun, B., Serrano, T., Barbero, M. C., Ortiz-Zarragoitia, M., Orbea, A., Juanes, J. A., & Cajaraville, M. P. (2016). Measuring biological responses at different levels of organisation to assess the effects of diffuse contamination derived from harbour and industrial activities in estuarine areas. *Marine Pollution Bulletin*, 103(1–2), 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.056>
- Elliott, M. (2011). Marine science and management means tackling exogenic unmanaged pressures and endogenic managed pressures-a numbered guide. *Marine Pollution Bulletin*, 62(4), 651-655. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.11.033>
- Falfushynska, H., Kasianchuk, N., Siemens, E., Henao, E., & Rzymiski, P. (2023). A review of common cyanotoxins and their effects on fish. *Toxics*, 11(2), 118. <https://doi.org/10.3390/toxics11020118>
- Frenzilli, G., Nigro, M., & Lyons, B. P. (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 681(1), 80–92. <https://doi.org/10.1016/J.MRREV.2008.03.001>

- Greenfield, R., Wepener, V., Degger, N., & Brink, K. (2011). Richards Bay Harbour: Metal exposure monitoring over the last 34 years. *Marine Pollution Bulletin*, 62(8), 1926–1931. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.04.026>
- Grimaldi, C., Fossey, M., Thomas, Z., Fauvel, Y., & Merot, P. (2012). Nitrate attenuation in soil and shallow groundwater under a bottomland hedgerow in a European farming landscape. *Hydrological Processes*, 26(23), 3570–3578. <https://doi.org/10.1002/HYP.8441>
- Helal, A. M., Attia, A. M., & Mustafa, M. M. (2017). Water conservation and management of fish farm in Lake Mariout. *Life Science Journal*, 14(11), 44-51. <http://www.dx.doi.org/10.7537/marslsj141117.08>
- Kousar, S., & Javed, M. (2015). Pakistan Veterinary Journal Diagnosis of Metals Induced DNA Damage in Fish Using Comet Assay. *Pakistan Veterinary Journal*, 35(2), 168–172. WOS:000353175600008
- Laurent, J., Diop, M., Amara, R., Fisson, C., Armengaud, J., Labadie, P., Budzinski, H., Couteau, J., Maillet, G., Le Floch, S., Laroche, J., & Pichereau, V. (2024a). Relevance of flounder caging and proteomics to explore the impact of an industrial accident caused by fire on the Seine estuarine water quality: the case of the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique facilities. (Soumis)
- Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Kailasam, S., Couteau, J., Waeles, M., Le Floch, S., Laroche, J. & Pichereau, V. (2023). Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France. *Science of The Total Environment*, 163195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163195>
- Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Waeles, M., S., Le Floch, S., Laroche, J. & Pichereau, V. (2024b). Environmental signatures and fish proteomics: a multidisciplinary integration to assess the ecological quality of estuaries in French agricultural watersheds. (En préparation)
- Lee, Y. S., Lim, J. E., Lee, S., & Moon, H. B. (2020). Phthalates and non-phthalate plasticizers in sediment from Korean coastal waters: Occurrence, spatial distribution, and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin*, 154, 111119. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2020.111119>
- Li, Q., Zhang, H., Zou, J., Mai, H., Su, D., Feng, X., & Feng, D. (2019). Bisphenol A exposure induces cholesterol synthesis and hepatic steatosis in C57BL/6 mice by down-regulating the DNA methylation levels of SREBP-2. *Food and Chemical Toxicology*, 133, 110786. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.110786>
- Limburg, K. E., Walther, B. D., Lu, Z., Jackman, G., Mohan, J., Walther, Y., Nissling, A., Weber, P. K., & Schmitt, A. K. (2015). In search of the dead zone: Use of otoliths for tracking fish exposure to hypoxia. *Journal of Marine Systems*, 141, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.02.014>
- Lu, Y., Wang, P., Wang, C., Zhang, M., Cao, X., Chen, C., Wang, C., Xiu, C., Du, D., Cui, H., Li, X., Qin, W., Zhang, Y., Wang, Y., Zhang, A., Yu, M., Mao, R., Song, S., Johnson, A. C., Shao, X., Zhou, X., Wang, T., Liang, R., Su, C., Zheng, X., Zhang, S., Lu, X., Chen, Y., Zhang, Y., Li, Q., Ono, K., Stenseth, N. C., Visbeck M., & Ittekkot, V. (2022). Multiple pollutants stress the coastal ecosystem with climate and anthropogenic drivers. *Journal of Hazardous Materials*, 424, 127570. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127570>
- Lubbers, R., Van Essen, M. F., Van Kooten, C., & Trouw, L. A. (2017). Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical & Experimental Immunology*, 188(2), 183-194. <https://doi.org/10.1111/cei.12952>
- McCarthy, A. M., Bales, J. D., Cope, W. G., & Shea, D. (2007). Modeling pesticide fate in a small tidal estuary. *Ecological modelling*, 200(1-2), 149-159. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2006.07.013>
- Mew, A., Simpson, K. L., Gropman, A. L., Lanpher, B. C., Chapman, K. A., & Summar, M. L. (2017). Urea cycle disorders overview.
- Naz, S., & Javed, M. (2013). Growth Responses of Fish During Chronic Exposure of Metal Mixture under Laboratory Conditions. *Pakistan Veterinary Journal*, 33(3). WOS:000321701200019
- Panfili, J., Darnaude, A. M., Vigliola, L., Jacquart, A., Labonne, M., & Gilles, S. (2015). Experimental evidence of complex relationships between the ambient salinity and the strontium signature of fish otoliths. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 467, 65–70. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2015.03.007>
- Paulino, M. G., Tavares, D., Terezan, A. P., Sakuragui, M. M., Pesenti, E., Giani, A., Margareth, M., Fernandes, J. B., & Fernandes, M. N. (2020). Biotransformations, antioxidant system responses, and histopathological indexes in the liver of fish exposed to cyanobacterial extract. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 39(5), 1041-1051. <https://doi.org/10.1002/etc.4696>
- Pichereau, V., Laurent, J., Borcier, E., Laroche J. (2021). Projet POPEST : Marqueurs de vulnérabilité de populations de flets identifiés par la protéo-génomique : de nouveaux outils pour estimer l'état écologique des systèmes

- estuariens. *Rapport de recherche OFB*, 50.
- Poole, G. C., & Berman, C. H. (2001). An ecological perspective on in-stream temperature: natural heat dynamics and mechanisms of human-caused thermal degradation. *Environmental management*, 27, 787-802. <https://doi.org/10.1007/s002670010188>
- Pujol, J. (2015). *Enquête : Pratiques culturelles sur les légumes 2013, Nombre de traitements phytosanitaires, Agreste Les Dossiers*.
- Roberts, R. J., Agius, C., Saliba, C., Bossier, P., & Sung, Y. Y. (2010). Heat shock proteins (chaperones) in fish and shellfish and their potential role in relation to fish health: a review. *Journal of fish diseases*, 33(10), 789-801. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2010.01183.x>
- Rebholz, S. L., Jones, T., Herrick, R. L., Xie, C., Calafat, A. M., Pinney, S. M., & Woollett, L. A. (2016). Hypercholesterolemia with consumption of PFOA-laced Western diets is dependent on strain and sex of mice. *Toxicology reports*, 3, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.11.004>
- Reichenberger, S., Bach, M., Skitschak, A., & Frede, H. G. (2007). Mitigation strategies to reduce pesticide inputs into ground- and surface water and their effectiveness; A review. *Science of The Total Environment*, 384(1-3), 1-35. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2007.04.046>
- Reis-Santos, P., Gillanders, B. M., Sturrock, A. M., Izzo, C., Oxman, D. S., Lueders-Dumont, J. A., Hüsey, K., Tanner, S. E., Rogers, T., Doubleday, Z. A., Andrews, A. H., Trueman, C., Brophy, D., Thiem, J.D., Baumgartner, L. J., Willmes, M., Chung, M.-T., Charapata, P., Johnson, R. C., Trumble, S., Heimbrand, Y., Limburg, K. E., & Walther, B. D. (2023). Reading the biomineralized book of life: expanding otolith biogeochemical research and applications for fisheries and ecosystem-based management. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 33(2), 411-449. <https://doi.org/10.1007/s11160-022-09720-z>
- Romana, L. A. (1994). Les grands estuaires français. *Equinoxe: les ressources vivantes de la mer et de l'environnement littoral*, (47-48), 38-42. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00701/81332/>
- Schenone, N. F., Vackova, L., & Cirelli, A. F. (2011). Fish-farming water quality and environmental concerns in Argentina: a regional approach. *Aquaculture International*, 19, 855-863. <https://doi.org/10.1007/s10499-010-9404-x>
- Sebilo, M., Mayer, B., Nicolardot, B., Pinay, G., & Mariotti, A. (2013). Long-term fate of nitrate fertilizer in agricultural soils. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(45), 18185-18189. https://doi.org/10.1073/PNAS.1305372110/SUPPL_FILE/PNAS.201305372SI.PDF
- Sokolova, I.M. (2013). Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Integrative and Comparative Biology*, 53(4), 597-608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>
- Sørhus, E., Incardona, J. P., Furmanek, T., Goetz, G. W., Scholz, N. L., Meier, S., Edvardsen, R. B. & Jentoft, S. (2017). Novel adverse outcome pathways revealed by chemical genetics in a developing marine fish. *elife*, 6, e20707. <https://doi.org/10.7554/eLife.20707>
- Taljaard, S., Slinger, J. H., & Van Niekerk, L. (2017). A screening model for assessing water quality in small, dynamic estuaries. *Ocean & Coastal Management*, 146, 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2017.05.011>
- Terrier, C., Sylvander, M., Khiati, A., & Moncere, V. (2005). *Population présente : méthodes de détermination à partir des enquêtes sur les touristes*.
- Thorrold, S. R., & Shuttleworth, S. (2011). In situ analysis of trace elements and isotope ratios in fish otoliths using laser ablation sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(6), 1232-1242. <https://doi.org/10.1139/F00-054>
- Vasconcelos, R. P., Henriques, S., França, S., Pasquaud, S., Cardoso, I., Laborde, M., & Cabral, H. N. (2015). Global patterns and predictors of fish species richness in estuaries. *Journal of Animal Ecology*, 84(5), 1331-1341. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12372>
- Vandegehuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2011). Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology*, 20(3), 607-624. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0634-0>
- Viaud, V., & Thomas, Z. (2019). Une réflexion sur l'état des connaissances des fonctions du bocal pour l'eau dans une perspective de mobilisation pour l'action. *Sciences Eaux & Territoires, Numéro 30(4)*, 32-37. <https://doi.org/10.3917/SET.030.0032>

- Wahbeh, M. I., Mahasneh, D. M., & Mahasneh, I. (1985). Concentrations of zinc, manganese, copper, cadmium, magnesium and iron in ten species of algae and sea water from Aqaba, Jordan. *Marine environmental research*, 16(2), 95-102. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90011-X)
- Wood, C.M. (2022). Conservation aspects of osmotic, acid-base, and nitrogen homeostasis in fish. In *Conservation physiology for the Anthropocene - A systems approach part A*. Edit. S.J. Cooke, N.A. Fänge, A.P. Farrell, C.J. Brauner, E.J. Eliason. Academic Press. 321-388.

CHAPITRE IV

**Évaluation de la qualité de l'eau
dans les petits systèmes
estuariens :
la composition en
acides gras du poisson,
un outil prometteur**

1. Introduction

1.1. Lipides et acides gras : caractéristiques principales

Le terme “**lipide**” désigne un groupe mal délimité de **molécules organiques hydrophobes non polaires** insolubles dans l’eau, mais miscibles dans des solvants organiques non polaires (chloroforme, éther diéthylique, benzène ou acétone). De ce fait, la classe des lipides comprend les graisses animales, les huiles végétales, les cires et certaines vitamines telles que les caroténoïdes (Johnson *et al.*, 2011).

Les lipides sont caractérisés par une **tête hydrophile polaire** et de longues chaînes de liaisons carbone-hydrogène (C—H), formant une **queue hydrophobe apolaire** (Figure 30). Par conséquent, en milieu aqueux, les lipides s’agrègent spontanément formant un amas en orientant vers l’eau les régions polaires hydrophiles, afin de regrouper vers l’intérieur de l’amas les régions apolaires hydrophobes. Ce rassemblement spontané des lipides peuvent former des **micelles** (gouttelettes) ou des **bicouches** (deux couches de phospholipides) (Figure 30). Les lipides peuvent également comporter d’autres atomes, tels l’oxygène, le phosphore, le soufre ou l’azote (Johnson *et al.*, 2011).

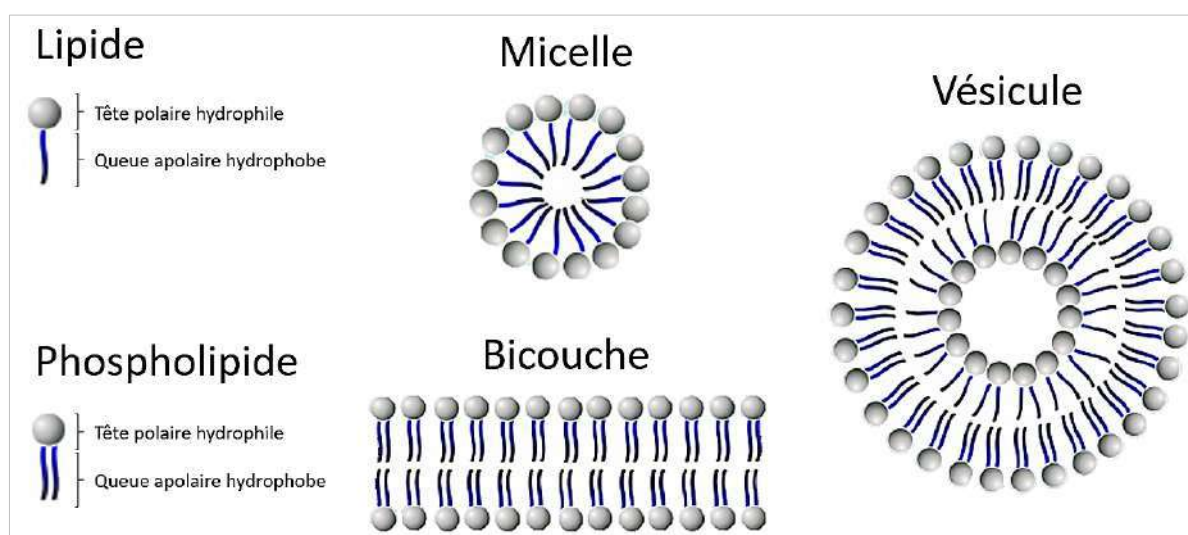


Figure 30. Schéma représentant l’agencement des lipides en milieux aqueux.

© Jennifer Laurent, à partir de Zhao & Lappalainen (2012).

Les lipides sont principalement composés de **glycérol** et d’**acides gras** (AG). Le glycérol est un polyalcool à trois carbones avec trois groupes C—OH. Les AG sont constitués d’un groupement méthyle (—CH₃) et d’une longue chaîne d’hydrocarbures (—CH₂) se terminant par un groupe carboxyle (—COOH). La longueur de ces chaînes varie en fonction du nombre de paires de carbone, compris entre 4 et 40 carbones.

Un AG est également caractérisé par le nombre et la position de doubles liaisons entre deux atomes de carbones successifs, aussi appelées **insaturations**. Par conséquent, un acide gras peut être **saturé** (AGS), lorsque tous les carbones sont liés à au moins deux atomes d’hydrogène, **monoinsaturé** (AGMI) si deux carbones sont liés par une double liaisons, ou **polyinsaturé** (AGPI) s’il y a plusieurs liaisons doubles dans la chaîne (Johnson *et al.*, 2011).

Les AG sont désignés par la **notation abrégée** suivante C:Xn-Y ; avec C le nombre de carbones, X le nombre de doubles liaisons, et Y la position de la première double liaisons à partir du groupe méthyle terminal.

Les lipides peuvent être subdivisés en deux catégories : les **lipides neutres** et les **lipides polaires**, en fonction de leur polarité pour certains solvants en chromatographie liquide.

Les lipides neutres vont principalement constituer les **lipides de réserve**. Les lipides de réserve regroupent les triglycérides, les diglycérides, les monoglycérides, les esters, les cires ou encore les AG libres. Les lipides polaires constituent essentiellement les **lipides membranaires**, tels que les phospholipides, les sphingolipides, les glycolipides et les stérols libres, bien que ces derniers soient considérés comme des lipides neutres, ils sont localisés dans les membranes.

Les lipides sont des **molécules multifonctionnelles** avec plusieurs rôles biologiques essentiels. En effet, les lipides sont une source majeure d'**énergie métabolique**, grâce aux nombreuses liaisons C—H permettant le stockage d'énergie pour une longue durée. Les lipides sont également à la base de la structure des **membranes cellulaires** et sont les **précurseurs** de nombreux messagers intra- et extracellulaires. Enfin, les lipides ont un rôle essentiel dans la **reproduction**, le **système immunitaire** ou encore l'équilibre ionique (Parish *et al.*, 2013 ; Tocher, 2003).

La nature **multifonctionnelle** et **hétérogène** des lipides permet d'obtenir de nombreuses informations sur les organismes (Parish *et al.*, 2013).

1.2. Lipides et acides gras : biomarqueurs trophiques et physiologiques (état de l'art)

Les lipides sont des **biomarqueurs polyvalents** de par leur stabilité et la diversité de leurs structures. L'étude des classes ou groupes de lipides renseigne sur les organismes, et plus particulièrement sur leur régime alimentaire, leur activité métabolique, leur état physiologique et sur les niveaux de contamination de leur environnement (Parish *et al.*, 2013).

Les signatures en AG ont été analysées pour déduire les **niveaux trophiques** et les variations spatio-temporelles des **régimes alimentaires** au sein et entre les espèces. La composition en AG offre des informations sur les modes de stockage et d'alimentation des organismes, caractérisant les **relations trophiques** dans un écosystème donné (Figure 31). En effet, l'abondance et la proportion en AG varient parmi les groupes fonctionnels et taxonomiques des différents niveaux trophiques. Les profils spécifiques d'AG sont transmis de la proie au prédateur, tant à la base qu'au sommet des réseaux trophiques, ce qui permet d'identifier la dynamique et les multiples interactions entre espèces (Rossi *et al.*, 2006 ; Iverson, 2009). De ce fait, les AG offrent la possibilité de distinguer les lipides provenant de bactéries, de plancton (Parish *et al.*, 2013), d'invertébrés ou de vertébrés (Jeffreys *et al.*, 2009).

En effet, tous les organismes synthétisent principalement des AGS comme l'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0). Ces AGS sont à la base des AGMI et des AGPI. Les AGMI, comme l'acide palmitoléique (16:1n-7) et vaccénique (18:1n-7), sont aisément produits. Les AGPI, provenant du phytoplancton, s'accumulent chez les animaux marins de niveaux trophiques supérieurs. Les AGPI,

comme l'acide eicosapentaénoïque (20:5n-3, EPA), l'acide docosahexaénoïque (22:6n-3, DHA), l'acide docosatétranoïque (22:4n-6, DTA) et l'acide arachidonique (20:4n-6, AA), sont essentiels pour la santé, la croissance et le métabolisme énergétique des organismes (Gonçalves *et al.*, 2012). En effet, la composition en AGPI est un indicateur de nutrition et de santé pour les poissons. Les microalgues (diatomées et dinoflagellés), riches en AGPI, sont à la base de la chaîne trophique et sont considérées comme une source alimentaire de haute qualité, tandis que la matière organique terrestre et les cyanobactéries sont de moins bonne qualité (Müller-Navarra *et al.*, 2004).

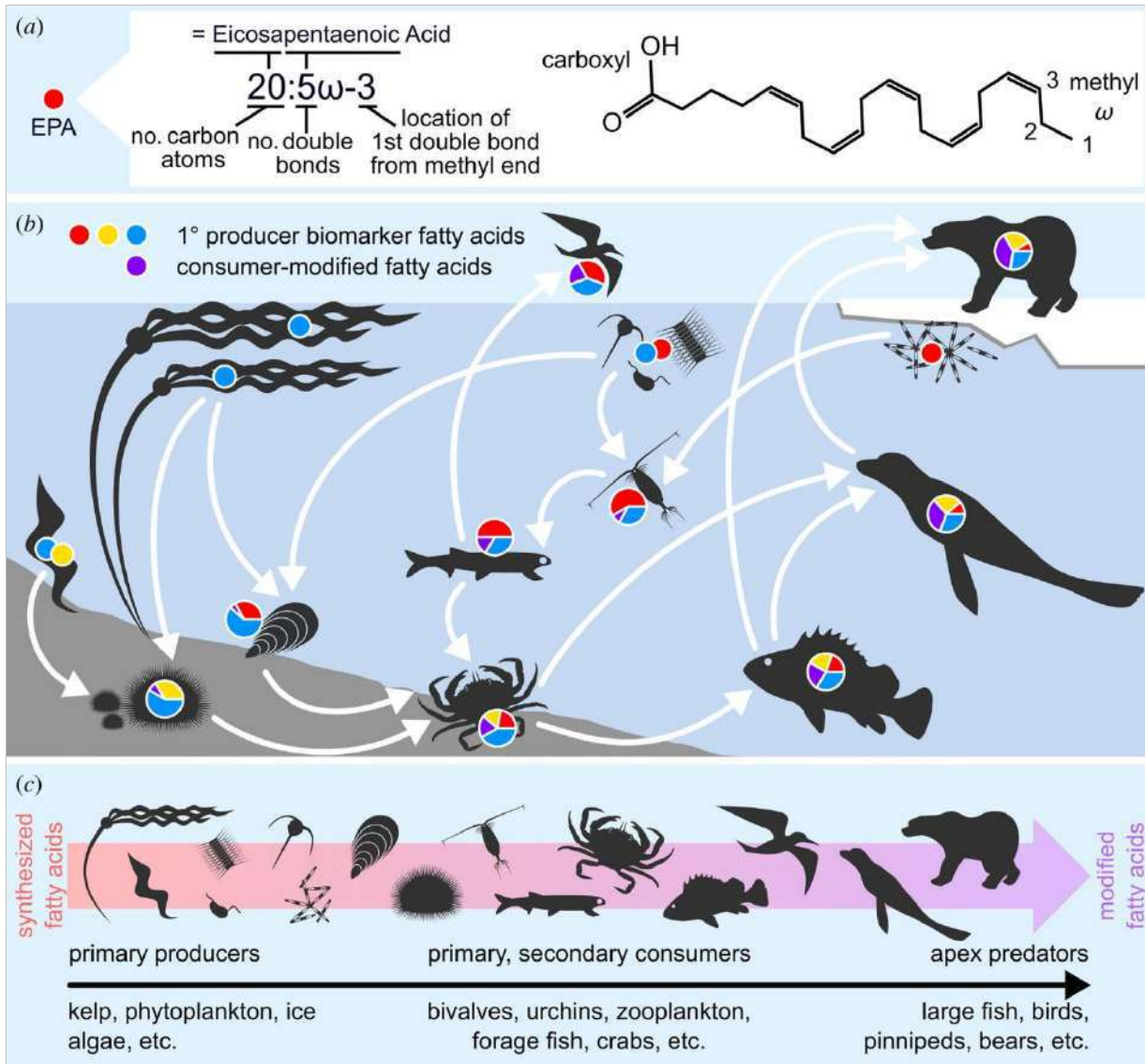


Figure 31. Schéma représentant les acides gras comme des traceurs trophiques ou des "biomarqueurs".

(a) Structure de l'EPA, un acide gras polyinsaturé.

(b) Dessin représentant le chemin que les acides gras synthétisés par les producteurs peuvent suivre au sein d'un réseau trophique. Le dessin ne montre que quatre traceurs, mais les producteurs et les consommateurs peuvent présenter jusqu'à 70 acides gras différents.

(c) Continuum d'acides gras synthétisés par les algues à des acides gras hautement modifiés.

Les organismes ont des capacités différentes, généralement inconnues, de synthétiser certains acides gras *de novo*, ce qui fait que les prédateurs supérieurs ont des profils d'acides gras plus dérivés et hautement modifiés par rapport aux consommateurs de base.

© Galloway & Budge (2020) - Artwork by R. M. Yoshioka.

La structure des lipides et des AG en fait également un outil approprié pour déterminer l'**état physiologique** des organismes, et plus particulièrement les processus allant des niveaux d'organisation cellulaire aux niveaux macroscopiques (De Carvalho & Caramujo, 2018 ; Neves *et al.*, 2015) (Figure 32). De ce fait, les lipides et les AG peuvent être utilisés comme biomarqueurs pour étudier la réponse et l'adaptation des cellules aux **xénobiotiques** et aux **conditions environnementales** (De Carvalho & Caramujo, 2018 ; Filimonova *et al.*, 2016). De nombreux **contaminants organiques** sont **hydrophobes** et, en raison de leurs propriétés physicochimiques, peuvent s'accumuler dans les lipides des organismes de manière dose-dépendante (Kainz & Fisk, 2009). Ces polluants comprennent les HAPs, les PCBs, les pesticides, les PFAS ou encore des produits pharmaceutiques (Olivares-Rubio & Vega-López, 2016).

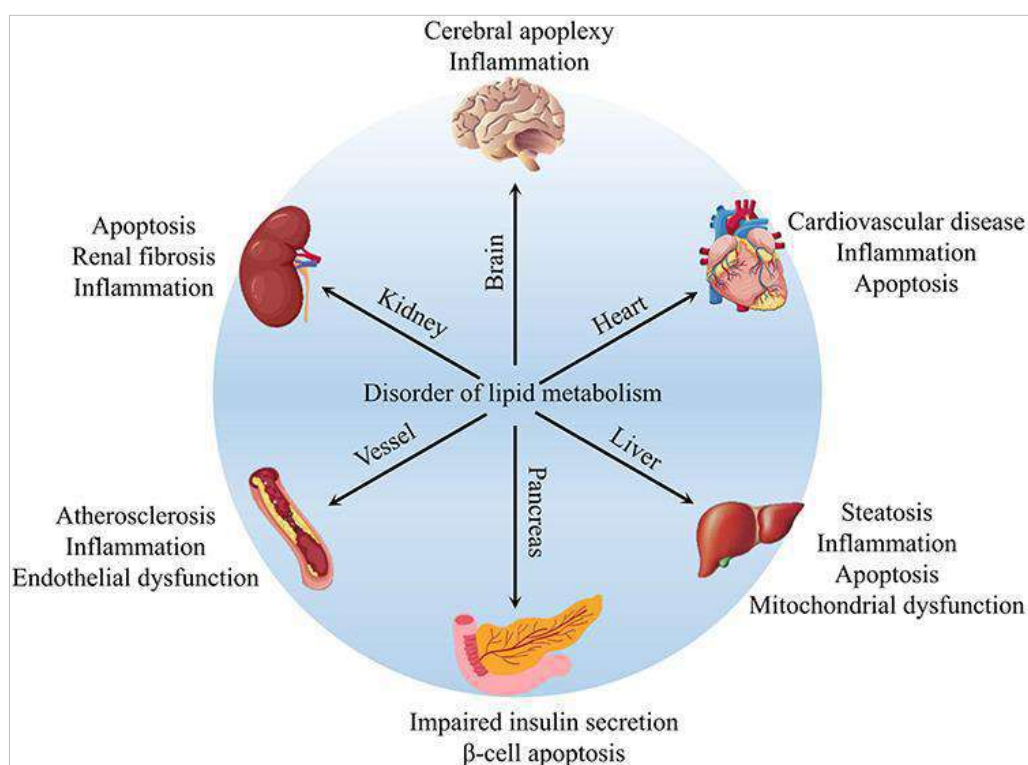


Figure 32. Schéma représentant les conséquences des perturbations du métabolisme des lipides dans différents organes et tissus. © Shan *et al.* (2020).

En effet, plusieurs études ont démontré des corrélations positives entre les concentrations de PCBs et de DDT et l'augmentation des niveaux d'EPA et de DHA. Il en est de même pour les concentrations de DDT et de HCH et les AGs, AGMI et AGPI, chez les poissons d'eau douce (Zhang *et al.*, 2019). De même, une exposition aux métaux (Cd, Hg, Ni) peut induire une modification du profil des AG, et notamment les AA, EPA et DHA (Silva *et al.*, 2017). Enfin, les diméthylacétals (DMA), issus des plasmalogènes, ont aussi un rôle lié à la résistance au stress (Nagan & Zoeller, 2001). Les AG apparaissent donc comme des bio-indicateurs pertinents en écotoxicologie (Liu *et al.*, 2023 ; Bernier-Graveline *et al.*, 2021 ; Gonçalves *et al.*, 2021).

Ainsi, dans le cadre de cette thèse, il nous est apparu particulièrement pertinent d'étudier les **lipides** et les **acides gras** en tant qu'outil potentiel en **écologie du stress** pour évaluer la qualité écologique des petits systèmes estuariens fortement eutrophisés (Figure 25).

Pour ce faire, nous avons repris les données de **géographie** sur les **bassins versants** et de **chimie des polluants**, développées au cours du projet ECOEST, et nous les avons combinées avec des analyses de **classes de lipides** et d'**acides gras** polaires et neutres quantifiés dans le muscle des flets, afin de caractériser **l'état physiologique** de **flets juvéniles** capturés dans les petits estuaires bretons.

Cette étude avait pour objectifs (1) d'identifier la **typologie de l'anthropisation** dans les différents hydrosystèmes en considérant des métriques géographiques sur le bassin versant et des analyses chimiques dans les sédiments et les poissons, (2) de quantifier les **profils d'acides gras** dans les muscles du flet au cours des estuaires, et (3) d'explorer la pertinence des **lipides** et des **acides gras** comme **indicateurs** de **l'état écologique** des estuaires.

Les résultats de ces recherches sont détaillés dans la sous-partie 2. ci-dessous. Ces résultats ont également fait l'objet d'un article en préparation (Laurent *et al.*, 2024c), présenté dans la sous-partie 4. ci-dessous.

2. Résultats & Discussion

Dans cette étude, nous avons approfondi la comparaison des **sept petits estuaires bretons** (Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine et Aven) présentant une surface de bassin versant comprise entre 70 et 450 km², en menant des analyses lipidiques sur les Flets juvéniles échantillonnés à la fin de l'été 2020.

Les données de **géographie** et de **chimie** ont mis en évidence que les hydrosystèmes étudiés étaient principalement **eutrophiés** par de fortes pressions agricoles. La **pression agricole** dans le Gouessant, la Flèche et le Guillec est liée à l'**élevage intensif** et une forte production de maïs pour le premier système et une culture légumière intensive pour les deux autres bassins. Le Quillimadec et l'Aber Wrac'h présentaient une pression agricole plus faible mais une **urbanisation** plus forte. Les signatures classiques d'activités industrielles, comme les niveaux de PCBs dans les sédiments et les poissons demeurent très faibles dans tous ces écosystèmes. Par ailleurs, l'Aven et la Douffine sont caractérisés respectivement par une production de légumes de conserve et une forte **activité piscicole**. De plus, les BV de l'Aven et la Douffine présentent des proportions plus élevées d'**espaces naturels**, relativement aux autres systèmes. L'ensemble des données ont mis en avant que le BV de l'Aven pourrait être considéré comme le système le moins impacté par l'anthropisation.

Les **réserves lipidiques** les plus élevées (lipides totaux et lipides de stockage) ont été détectées chez les poissons de la Douffine et du Guillec. Le **rapport TG:FS**, l'indice de stockage des lipides couramment utilisé en écologie pour les poissons (Kerambrun *et al.*, 2013), était particulièrement élevé chez les individus de la Douffine. Cette tendance pourrait être liée à la très forte **activité piscicole** en Douffine, conduisant à de gros rejets de nutriments et de matière organique, à l'origine d'une forte eutrophication de l'hydrosystème (Pickova & Mørkøre, 2007). L'Aber Wrac'h et l'Aven présentent les valeurs les plus faibles de lipides de stockage et de ratio TG:FS, témoignant d'une **eutrophisation modérée**. Les autres sites n'ont montré que de légères différences lipidiques entre eux, pouvant être aussi liées à des variations dans l'abondance et la diversité des proies propres à chaque environnement.

Les analyses d'**acides gras totaux** ont révélé que les poissons de la Douffine vs l'Aven présentaient des teneurs élevées en **AGMI** et faibles en **AGPI**, reflétant une moins bonne qualité des lipides. Les valeurs d'AGPI plus élevées pour l'Aven indiquent une meilleure qualité des composants du réseau trophique (Keva *et al.*, 2020) et illustrent l'origine marine des sources alimentaires (Závorka *et al.*, 2022). Les poissons de l'Aven étaient également enrichis en **oméga 3 et 6**, comme le **DHA** et le **DTA**. Les niveaux d'AGPI, tels que le DHA, sont réduits dans les environnements fortement eutrophiés (Taipale *et al.*, 2016) et élevés dans les systèmes oligotrophes, confirmant l'**eutrophisation** limitée de l'Aven (Laurent *et al.*, 2023). Les poissons de la Douffine présentaient également une combinaison d'acides gras oléique, linoléique et alpha-linoléique, considérés comme des biomarqueurs pertinents pour identifier l'impact des rejets de la **pisciculture** dans les hydrosystèmes (White *et al.*, 2019). Or, la Douffine se caractérise par trois piscicultures produisant 900 T.an⁻¹ de truites. Les autres BV, le Gouessant, l'Aber Wrac'h, le Guillec, le Quillimadec et la Flèche, présentaient vraisemblablement des conditions mésotrophes, *i.e.* intermédiaires entre la Douffine et l'Aven (Laurent *et al.*, 2023). Les analyses d'**acides gras totaux** ont également mis en

évidence que les poissons de l'Aber Wrac'h vs la Flèche présentaient un gradient entre le **DHA-AA** et l'**EPA**. Les poissons de l'Aber Wrac'h se caractérisaient par des taux élevés de DHA, révélant un environnement de grande qualité. A l'inverse, les poissons du Gouessant ont montré un niveau réduit d'AGPI, reflétant une mauvaise qualité des composants du **réseau trophique**. En outre, un manque d'AGPI chez les producteurs primaires des écosystèmes aquatiques est observé lorsque la température de l'eau augmente, ce qui affecte négativement les poissons (Závorka *et al.*, 2021). De plus, les poissons du Gouessant étaient caractérisés par une abondance particulière d'**AA**, qui joue un rôle majeur dans le bon fonctionnement du **système immunitaire** et la **réponse inflammatoire** (Hanna & Hafez, 2018). Les individus du Gouessant présentaient également de fortes proportions d'**AG ramifiés**, couramment utilisés pour évaluer l'**activité bactérienne** (Prato *et al.*, 2010). Or, deux barrages successifs fragmentent la rivière du Gouessant dans sa partie avale, conduisant à une stratification thermique et à une charge en azote probablement élevée dans les réservoirs associés à ces barrages. Ces conditions environnementales favorisent très probablement la prolifération de cyanobactéries dans ces retenues (Chinyama *et al.*, 2016). Les individus de la Flèche et du Guillec présentaient des taux élevés d'EPA mais des taux très faibles de **DHA**, pouvant refléter le mauvais état des **membranes cellulaires**. Par ailleurs, la forte proportion de **DMA** détectée dans les individus de la Flèche et du Guillec pourrait être liée à une **eutrophisation-hypoxie** dans ces hydrosystèmes. En effet, les plasmalogènes dont sont issus les DMA jouent un rôle protecteur lors de **stress oxydatif** et hypoxique (Nagan & Zoeller, 2001). Les individus de la Flèche et du Guillec ont également montré des niveaux élevés d'**acide vaccénique**, ce marqueur étant pertinent pour évaluer la contribution **bactérienne** dans le réseau trophique marin (Alfaro *et al.*, 2006). Ainsi, les élevages intensifs dans les bassins de la Flèche et du Guillec pourraient conduire à une prolifération bactérienne significative dans les estuaires.

De ce fait, contrairement aux classes de lipides, les **acides gras totaux** semblent fournir des informations substantielles sur les effets des **facteurs de stress** environnementaux sur les profils lipidiques du Flet. Ces résultats soulignent le rôle influent des variables environnementales sélectionnées en tant que déterminants clés de la composition des profils d'acides gras dans les tissus des poissons.

Les analyses d'**acides gras polaires** ont révélé que les poissons de l'Aven présentaient toujours des proportions plus élevées d'**oméga 3 et 6**, confirmant le **bon état écologique** de ce système. Les poissons de la Douffine étaient invariablement caractérisés par des **AGMI** et les acides gras oléique, linoléique et alpha-linoléique, corrélés à l'**activité piscicole**. Cependant, les individus présentaient également des proportions élevées d'**AA**. Une étude précédente a montré une prédominance d'**AA** chez plusieurs espèces de poissons marins, contaminés par différents **métaux** (Ajeeshkumar *et al.*, 2015). Ainsi, la contamination métallique chronique des sédiments de la Douffine par des activités minières anciennes (Chiffolleau, 2017) pourrait expliquer le taux élevé d'**AA** chez le Flet. Les individus de l'Aber Wrac'h se distinguent clairement du Gouessant, par des taux élevés d'**AGPI**, et notamment de **DHA**, ce qui pourrait conduire à une **physiologie membranaire cellulaire** efficace dans cet hydrosystème. Les poissons de la Flèche et du Guillec étaient caractérisés par de fortes teneurs en **AGMI** et en **DMA**. La forte proportion de DMA, notamment dans le système de la Flèche, pourrait être liée à l'impact d'un **stress oxydatif** marqué sur les lipides membranaires cellulaires (Nagan & Zoeller, 2001).

Les analyses d'**acides gras neutres** ont mis en évidence que les poissons de l'Aber Wrac'h étaient enrichis en **AGPI** et surtout en **DHA**, un AG qui caractérise la présence de **diatomées** et de **dinoflagellés** (Strandberg *et al.*, 2015). Par ailleurs, les poissons de l'Aber Wrac'h présentaient également un taux élevé d'**AA**. Dans Laurent *et al.* (2023), nous avons émis l'hypothèse d'une contamination à l'arsenic du BV de l'Aber Wrac'h par épandage de boues d'algues dans les champs (Greger *et al.*, 2007), résultant de l'**exploitation des algues** dans l'industrie agroalimentaire (Piwowar & Harasym, 2020). Or, les algues concentrent naturellement l'**arsenic** et une gamme de **métaux** qui sont incorporés dans les enzymes, les protéines et les vitamines (Wahbeh *et al.*, 1985). De plus, l'AA et le DHA sont couramment présents dans les algues rouges (*Gracilaria sp.*) et brunes (*Sargassum sp.*), respectivement (Shanab *et al.*, 2018), et l'extraction industrielle de molécules d'intérêt passe généralement par l'extraction à l'eau (Zakaria *et al.*, 2016). La fraction restante, souvent considérée comme un déchet, est donc susceptible de contenir de nombreux lipides, et lorsque des boues d'algues sont épandues dans les champs, ces lipides pourraient avoir un impact sur les **réserves lipidiques** de toute la **chaîne trophique**, y compris les Flets. Les poissons du Gouessant et du Quillimadec présentaient une faible proportion de DHA, probablement liée à la prolifération de cyanobactéries et d'algues vertes, qui ne produisent pas d'AGPI (Strandberg *et al.*, 2015). Cette surproduction est favorisée dans les réservoirs associés à ces hydrosystèmes. La répartition générale des **acides gras neutres** confirme les résultats observés avec les classes de lipides totaux, à savoir une **mauvaise qualité des réserves** pour les poissons de la Douffine, du Guillec et de la Flèche. Les poissons de la Douffine étaient toujours caractérisés par les acides gras oléique, linoléique et alpha-linoléique, issus des végétaux terrestres (White *et al.*, 2019). Il semblerait donc que les **aliments distribués** dans les **piscicultures** aient contaminé toute la chaîne trophique. En effet, ces mêmes AG ont été observés en grande proportion chez les poissons vivant dans les eaux entourant les piscicultures, suggérant une chaîne trophique associée aux rejets piscicoles (Johnson *et al.*, 2018). Ces trois AG apparaissent donc comme des indicateurs fiables de l'**activité piscicole**, quel que soit la fraction d'acide gras. De plus, les poissons de la Douffine étaient clairement **carencés** en **DHA**, une autre caractéristique de l'impact des piscicultures (Fernandez-Jover *et al.*, 2011). Les individus de la Douffine présentaient également de fortes teneurs en **acide myristique** et en **acide margarique**, tous deux caractéristiques de la présence de bactéries (Prato *et al.*, 2010). L'aquaculture intensive, qui induit de nombreux rejets, peut conduire à l'**eutrophisation** du milieu (Amirkolaie, 2011) et à la **prolifération bactérienne**. Par ailleurs, dans Le Croizier *et al.* (2016), l'**acide margarique** était corrélé avec le **Cd** et le système de la Douffine présentait aussi une concentration élevée en Cd dans les sédiments. Les individus de la Flèche et du Guillec présentaient des taux élevés d'acides gras oléique, linoléique et alpha-linoléique. De même que pour la Douffine, le système du Guillec abrite des piscicultures (450 T.an⁻¹), ce qui peut expliquer ces concentrations en AG. La Flèche, quant à elle, ne supporte qu'une très petite pisciculture (20 T.an⁻¹), donc ces proportions en AG pourraient ici être liées à un régime alimentaire composé principalement de proies issues de **sources terrestres**.

Au final, les profils d'**acides gras neutres** pourraient être liés à des facteurs de stress environnementaux, tels que l'eutrophisation et la pollution par les HAPs ou les métaux. Ces **stresseurs** pourraient aussi exercer des **pressions sélectives** sur les **proies** dont se nourrissent les Flets, influençant leur composition en lipides et en acides gras (Keva *et al.*, 2019 ; Le Croizier *et al.*, 2016).

3. Conclusion

Les simples **classes de lipides totaux** identifiées dans le muscle ne permettent pas d'appréhender pleinement la complexité des relations entre acides gras, écologie et physiologie du poisson. Les diverses approches d'analyse des acides gras offrent des informations plus précises à cet égard.

Les **acides gras totaux** sont apparus comme particulièrement pertinents, surtout chez les juvéniles de Flet, qui ont tendance à avoir peu de réserves lipidiques et donc de fortes teneurs en acides gras polaires dans leur muscle.

Cependant, il convient de noter que la **composition lipidique** peut varier en fonction des **stades de développement** du poisson et de l'**espèce** considérée. Ainsi, pour les poissons plus gras, voire les flets adultes, il est impératif de privilégier l'analyse des acides gras neutres et polaires pour mieux comprendre la composition des lipides. En outre, cette approche s'est révélée particulièrement utile pour explorer les aspects complexes de la physiologie et de l'écologie des poissons.

La **séparation** des **acides gras** neutres et polaires est longue et onéreuse. Il est donc essentiel de trouver un équilibre entre le besoin d'informations approfondies et les contraintes de temps et de coût.

Ainsi, les **acides gras neutres** sont apparus très utiles pour analyser les **interactions trophiques** dans les écosystèmes aquatiques, tandis que les **acides gras polaires** se sont avérés particulièrement pertinents pour étudier la **réponse** des poissons aux **facteurs de stress** dans l'environnement.

Par conséquent, dans le contexte de l'**écologie du stress**, il pourrait être fortement recommandé d'intégrer l'analyse des acides gras **polaires** en plus des acides gras **neutres**, afin de comprendre pleinement les interactions biochimiques et physiologiques en jeu.

4. Article

Ci-dessous, l'article "Fatty acids in European flounder muscle: promising tools to assess the impact of eutrophication on estuarine health", en préparation (Figure 33).

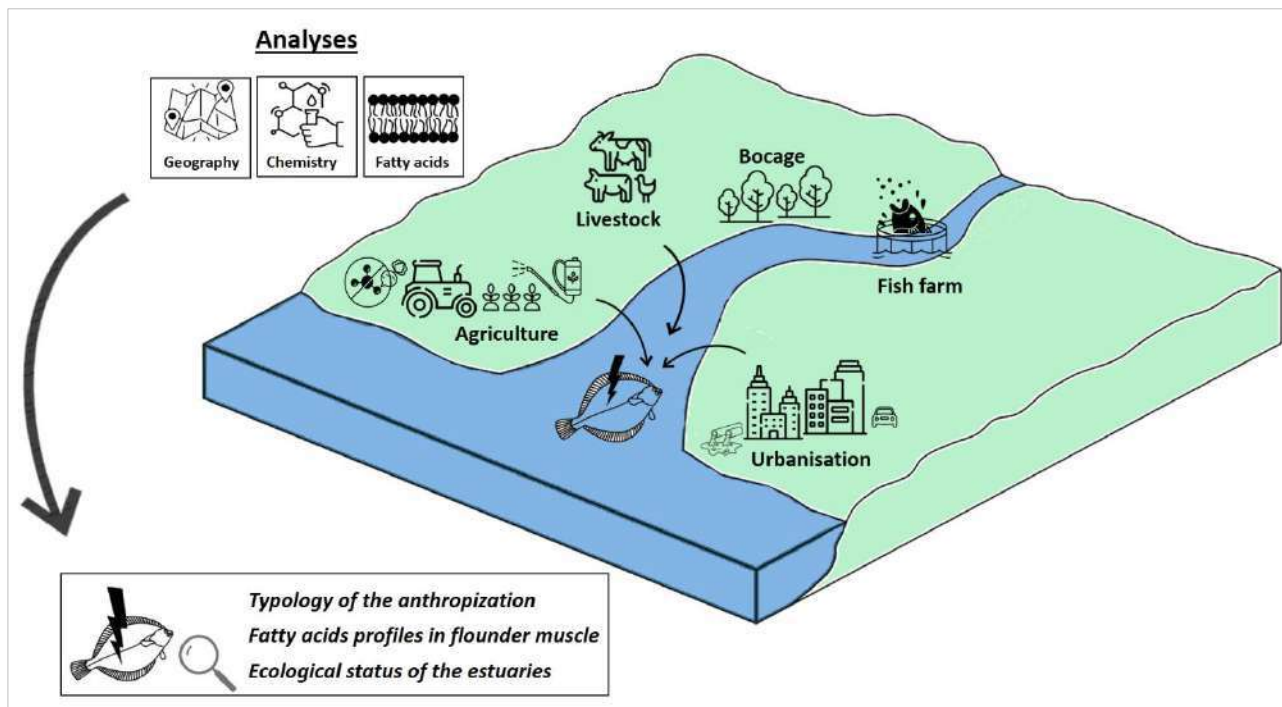


Figure 33. Résumé graphique de l'article "Fatty acids in European flounder muscle: promising tools to assess the impact of eutrophication on estuarine health".

© Laurent *et al.* (2024c)

Fatty acids in European flounder muscle: promising tools to assess the impact of eutrophication on estuarine health

Jennifer Laurent^{1,2*}, Fabienne Le Grand¹, Antoine Bideau¹, Iwan Le Berre³, Stéphane Le Floch², Vianney Pichereau¹, Jean Laroche¹,

¹ Univ Brest - CNRS - IRD - Ifremer, UMR 6539 LEMAR, IUEM-Université de Bretagne Occidentale, Rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

² CEDRE, 715 rue Alain Colas, 29200 Brest, France

³ Univ Brest - CNRS - IRD - Ifremer, UMR 6554 LETG-Brest GEOMER, IUEM-Université de Bretagne Occidentale, Rue Dumont D'Urville, 29280 Plouzané, France

* corresponding authors: jennifer.laurent@univ-brest.fr

Abstract

In the present paper, we developed an approach combining lipid and fatty acid analyses on European flounder muscle, and watershed geographic metrics, pollutant analyses in sediments, to assess the ecological status of seven small French estuaries.

The watersheds were clearly differentiated by contrasted lipid compositions in flounder muscle. The analysis of polar lipid fatty acids provides a better understanding of the physiological adaptation of fish to their environment. Differences in polyunsaturated fatty acid (PUFA) profiles, particularly docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), reflect the state of cell membranes and variations in the quality of food sources. High levels of PUFA were associated with better ecological conditions, while reduced PUFA availability were correlated with eutrophication. In addition, higher lipid reserves were clearly identified in systems affected by fish farming, reflecting a potentially lipid-rich diet.

Neutral lipid fatty acids are useful for studying trophic relationships in aquatic ecosystems. However, polar fatty acid analysis is crucial for understanding fish responses to environmental stressors. Thus, the integration of polar fatty acid analysis, in addition to neutral fatty acids, offered a more comprehensive assessment of biochemical and physiological interactions in the ecosystem.

This research highlighted the importance of lipid and fatty acid profiles as bioindicators to evaluate the health of the estuarine ecosystem, and the impact of stressors such as pollution and eutrophication.

Keywords: Estuary, Fatty acids, Environmental stressors, *Platichthys flesus*

1. Introduction

Lipids and fatty acids (FAs) are the most important molecules transferred across the plant-animal interface in aquatic food webs, and are considered good bioindicators of ecosystem health (Maazouzi et al., 2008, Ramírez et al., 2013) and stress bioindicators (Sánchez-Muros et al., 2013, Gonçalves et al., 2016).

Numerous studies have therefore been conducted on fish lipids, as lipids are essential to the life cycle and physiology of fish. Indeed, fatty acids (FAs), the main components of lipids, are used as fuel in all metabolic systems and play an important role in fish growth, reproduction and migration. In addition, FAs are necessary for cell membrane production and permeability, playing an important role in biochemical and physiological responses (Filimonova et al., 2016).

Living organisms are mainly capable of synthesizing saturated fatty acids (SFA), such as palmitic acid (16:0) and stearic acid (18:0). SFA are the basis for monounsaturated fatty acids (MUFA) and some polyunsaturated fatty acids (PUFA). MUFA are easily synthesized by organisms and include palmitoleic acid (16:1n-7), vaccenic acid (18:1n-7), 20:1n-7, 22:1n-7 or nervonic acid (24:1n-9). Dimethyl acetals (DMAs) are derived from the transmethylation of plasmalogens and are therefore a proxy for plasmalogens. The role and function of DMAs are still unclear, but plasmalogens are often influenced by stress and are thought to confer stress resistance (Nagan & Zoeller, 2001). PUFA are derived from phytoplankton and accumulate in marine animals at higher trophic levels through the food web (Saito & Aono, 2014; Gonçalves et al., 2012). Highly unsaturated fatty acids (HUFA), have a key role in the health and function of all organisms at all trophic levels, and cannot be synthesized *de novo*, or not in sufficient quantities. HUFA include eicosapentaenoic acid (20:5n-3, EPA), docosahexaenoic acid (22:6n-3, DHA) and arachidonic acid (20:4n-6, AA), all of which are essential (Saito & Aono, 2014). Indeed, EPA is an excellent source of energy and precursor of eicosanoids, DHA is involved in the support of membrane structures and functions, and AA is implicated in the growth and survival of larval stages (Costa et al., 2015). In addition, organisms that feed on HUFA exhibit higher growth rates, reinforcing the importance of FAs as ecophysiological indicators (Neves et al., 2015).

PUFA composition is also an indicator often used to assess fish nutrition and health, and is largely determined by the quality of fish diet (Arts and Kohler, 2009). Indeed, algae and diatoms, rich in DHA, EPA and AA, are considered a high-quality food source for consumers, improving the efficiency of energy transfer to higher trophic consumers (Lau et al., 2012; Müller-Navarre et al., 2004). Conversely, terrestrial organic matter and cyanobacteria generally lack PUFA and are considered a poor quality food source (Müller-Navarra et al., 2004).

Other studies have shown that certain pollutants can operate as lipid disruptors, impacting normal lipid metabolic processes in organisms (Bennett et al., 2021; Bernier-Graveline et al., 2021). FAs profiles can be altered by exposure to organohalogen contaminants in marine mammals (Xie et al., 2023; Zhang et al., 2022), polychlorinated biphenyls (PCBs) in freshwater species (Huang et al., 2022) and pesticides in fish

(Gonçalves et al., 2021; Zang et al., 2019; Filimonova et al., 2016). Indeed, a positive correlation has been observed between PCBs and DDT concentrations and increased EPA and DHA levels, as well as between DDT and HCH concentrations and SFA, MUFA and PUFA, in freshwater fishes (Zhang et al., 2019). Similarly, exposure to metals (Cd, Hg, Ni) induces a change in FAs profile in sea snail, and in particular AA, EPA and DHA (Silva et al., 2017). FAs therefore appear to be relevant bioindicators in ecotoxicology (Liu et al., 2023; Bernier-Graveline et al., 2021; Gonçalves et al., 2021).

Estuaries, highly valued for their productivity and role as critical nurseries for marine species, are facing severe degradations due to various human activities. These coastal ecosystems are under significant threat from factors such as pollution, overexploitation, habitat fragmentation, and the expansion of industries and urban areas. Moreover, estuaries worldwide are vulnerable to multiple anthropogenic pressures, including chemical pollution, dredging, eutrophication, and urban expansion, which compromise water quality and increase the risk of hypoxia. Additionally, global climate change has exposed these shallow estuarine ecosystems to heat stress, subjecting them to a growing number of environmental stressors (Alfonso et al., 2021; Cabral et al., 2019).

Assessing the health of estuaries is a challenge due to their inherent diversity and the various pressures these ecosystems face, often influenced by the size of the estuary. Small vs large estuaries are generally subject to fewer human-induced changes, which can adversely affect estuarine habitats. Consequently, in small estuaries, the main driver of change is usually degradation of water quality due to eutrophication linked to human activities over the watersheds. Consequently, the degree of human impact on small estuaries is assessed by studying the effects of eutrophication and pollution on water, sediments and biota (Laurent et al., 2023).

The present survey focused on seven hydrosystems located in Brittany, chosen for their small size (between 70 and 450 km²) and their contrasting levels of eutrophication induced by human activities and land use. The biological model used in this survey is the European flounder (*Platichthys flesus*), a key sentinel species to assess the ecological quality of European estuaries (Laurent et al., 2022; Borcier et al., 2020). The choice of this species is attributed to its estuarine life cycle (Dando, 2011) and its predominantly benthic lifestyle. Consequently, flounders are exposed to pollutants present in sediment (Chiffolleau, 2017; Williams et al., 2014) as well as substances from runoff and urban discharges into the water (Defo et al., 2021; Tetreault et al., 2021).

The aims of the present study were (1) to identify the typology of the anthropization in the different hydrosystems considering geographical metrics on the watershed and chemical analyses in sediment and fish, (2) to quantify fatty acids profiles in flounder muscle over the estuaries, and (3) to explore the relevance of lipids and fatty acids as proxies of ecological status of estuaries.

2. Materials and methods

2.1. Study sites, *in situ* fish sampling and tissues collection

Seven watersheds located along the French Atlantic coast were considered in this study: Guouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven (Fig. 1). These hydrosystems showed contrasted environments and stressors. The Guouessant, Guillec, Quillimadec and Flèche catchments show a high agricultural pressure and are considered as eutrophicated system. The Aber Wrac'h watershed displays a moderate agricultural pressure and a reduce risk of eutrophication. The Douffine system is mainly impacted by a high fish farming activity in the lower part of its watershed. Finally, the Aven catchment is weakly affected by eutrophication and could be considered as a "reference system" (Laurent et al., 2023).

At the end of September 2020, juvenile flounders were sampled by electric fishing in the upstream part of the estuaries. A set of 20 fish (total length 9.16 ± 1.15 cm) per estuary was collected, excepted for the Guouessant estuary where only seven individuals were caught, fish being very rare. Immediately after fishing, fish were sacrificed in the field and dissected to recover the white muscle. Tissues were promptly flash-frozen in liquid nitrogen.

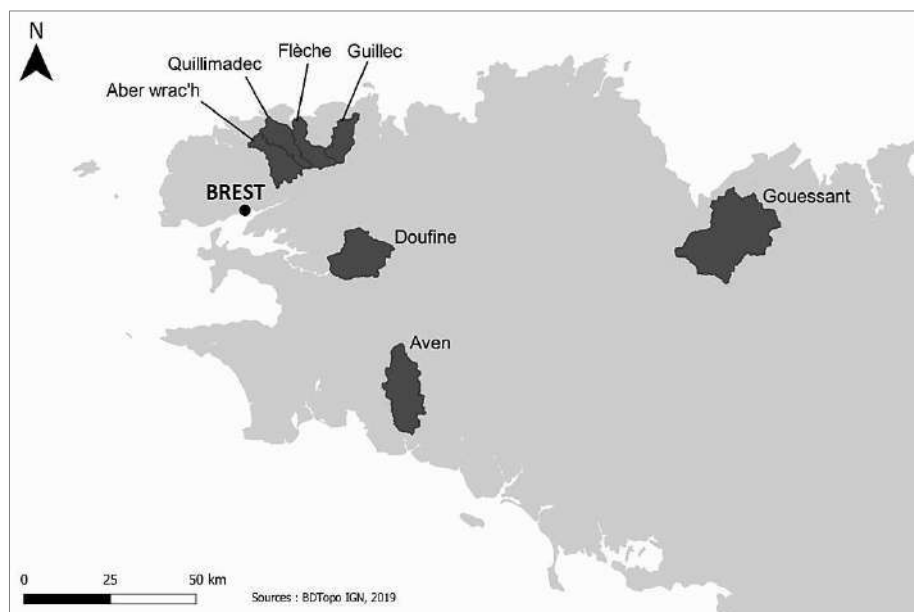


Figure 1. Location of the studied catchments and sampled estuaries (Guouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven) and main city (Brest).

2.2. Geographical metrics and chemical analysis

Several geographical indicators have been developed from a set of geographical reference data as in Laurent et al. (2023), to characterize the studied systems and to identify potential contamination sources (Table S1).

Briefly, three metrics capture agricultural pressures. Firstly, livestock per watershed was determined using the total feed index of the livestock unit (Agreste database - Ministry of Agriculture), which facilitates comparison of species based on feed consumption. Secondly, agricultural surfaces were assessed on the basis of agricultural land cover in watersheds (Theia Land database). Thirdly, phytosanitary treatments provided by Agreste (Crisan, 2020; Pujol, 2015) allowed calculating the number and quantity of phytosanitary products applied per catchment (Treatment Frequency

Index, IFT - European Union). The IFT represents the number of doses applied per hectare during a crop year, which corresponds to the recommended treatment quantities. Urban pressure was gauged using two indicators: population density from INSEE Census data and the proportion of artificial surfaces per watershed (Theia Land database). Lastly, three indicators evaluate watershed ecological health: the percentage of natural surfaces, encompassing forests (Theia Land database), the hedge density (BDTopo database - OFB/IGN), and the percentage of riparian vegetation over a 100 m river band (CBNB map of major vegetation types in Brittany).

Chemical analyses included measurements of nitrates and nitrites in water, organic pollutants in sediment, and trace elements in sediment and fish (Table S1). Briefly, nitrate and nitrite concentrations were assessed in filtered water samples (0.2 µm) of approximately 15 mL using a Bran + Luebbe AAIII autoanalyser, according to the method of Aminot & Kérouel (2007). Organic pollutants (24 PAHs and 26 PCBs) were quantified in samples 100 mg (w.w.) of sediment and flounder tissue, by sorptive stir bar extraction-thermal desorption-gas chromatography-tandem mass spectrometry (SBSE-GC-MS/MS) according to the method adapted from Lacroix et al. (2014). Trace elements were analysed using an ICP-quadrupole mass spectrometer (X-series II, Thermo Scientific) operated by the P le Spectrom trie Oc an Brest (PSO, Brest, France), using sediments that had been dried (at 60 C), ground, mineralised (65 % nitric acid and 30 % hydrogen peroxide) and hydrolysed (105 C, EasyDigest  ANALAB).

2.3. Total muscle lipids analysis

Total lipids analysis were performed on flounder white muscle by HPTLC (High-performance Thin Layer Chromatography). This method was adapted for *P. flesus* by P dron et al. (2017), using a CAMAG TLC Sampler 4 (CAMAG, Switzerland). Lipids extraction was performed from 150 mg of muscle crushed by a mixer mill (MM400, RETSCH, Germany), according to Mathieu-Resuge et al. (2019). A standard comparison and quantification, relatively to standard calibration curves (Visioncats software, CAMAG), allowed the identification of six neutral lipid classes (sterol esters, glyceride ethers, triacylglycerol, free fatty acids, fatty alcohols, free sterols) and seven polar lipid classes (sphingomyelin, lysophosphatidylcholine, phosphatidylcholine, phosphatidylserine, phosphatidylinositol, cardiolipines, phosphatidylethanolamine). Storage lipids are composed of neutral lipids, except free sterols, whereas membrane lipids include of polar lipids. The lipid storage index based on the ratio of the quantity of reserve lipid (triacylglycerol) over the quantity of structural lipid (free sterols) was also calculated. This ratio is commonly consider as a relevant proxy of fish fitness (Kerambrun et al., 2013).

2.4. Fatty acids analysis

Lipid extractions were performed following the method modified by Folch et al. (1957). Fish muscle were ground into a fine and homogeneous powder by ball milling under liquid nitrogen. Then, approximately 150 mg of tissue powder (162.36 ± 8.79 mg) were put in glass tubes with 6 mL of chloroform/methanol (2:1; v:v) and sonicated. Lipid extracts were stored at -20 C until further analysis. Neutral and polar lipids fractions were separated using the procedure described by Le Grand et al. (2014). Briefly, 1 mL of muscle lipid extract was evaporated to dryness. Lipids were recovered with three washings of 0.5 mL of chloroform/methanol (98:2; v:v) and deposited at the top of a silica gel micro-column (40 mm \times 4 mm, silica gel 60A 63-200 µm rehydrated with 6 % H₂O (70-230 mesh)). Neutral lipids were eluted with 10 mL of chloroform/methanol (98:2; v:v) while the polar lipids were recovered with

20 mL of methanol. In each fraction, internal standard was added (2.3 µg of tricosanoic acid (C23:0)). Both lipids fractions were stored at -20°C . FAs analysis composition by assessed by gas chromatography. Neutral and polar lipids fractions were evaporated to dryness under nitrogen one more time. Fractions were then transesterified for 10 min at 100°C after the addition of 0.8 mL of methanol/ H_2SO_4 (3.4 %; v:v) according to the methods modified by Le Grand et al. (2014). The transesterification allowed the formation of fatty acids methyl esters (FAME) and dimethylacetals (DMA). Then, 0.8 mL of hexane was added to the lipids fractions. After that, 1.5 mL of hexane-saturated water were added to wash three times the organic phase containing FAME and DMA. To correctly wash the fractions, vials were centrifuged (1 min at 738 g; 20°C), and the aqueous phase (was removed. FAME and DMA were analysed with a Varian CP8400 gas chromatograph equipped with two splitless injectors programmed at 220°C , and two flame-ionization detectors programmed at 280°C , with hydrogen as vector gas. Temperature programme was as followed, from 0°C to 150°C at $50^{\circ}\text{C min}^{-1}$, then to 170°C at $3.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, to 185°C at $1.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$, to 225°C at $2.4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and finally to 250°C at $5.5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and maintained for 15 min. Moreover, FAME and DMA were separated on two columns with different polarities, one polar (ZBWAX: $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm ID} \times 0.2\text{ }\mu\text{m}$, Phenomenex) and another one apolar (ZB5HT: $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm ID} \times 0.2\text{ }\mu\text{m}$, Phenomenex), to avoid co-elution issues. FAME and DMA were identified by comparing their retention time with commercial references. The relative proportions of FAs of interest were expressed as mass percentages of the total FAs content.

2.5. Statistical analysis

A Euclidean distance was applied for FAs results, due to the number of zeros in data sets that was inferior to 2.5 %. In addition, FAs accounting for $> 0.5\%$ at one station and/or period were considered for the statistical analysis. Statistical analyses were performed with R software (v.3.5.0) implemented in Rstudio (v. 1.1.453). Normality and homoscedasticity of variances were investigated with a Shapiro-Wilk test and a Bartlett test, respectively. Because the data were not normally distributed, a nonparametric Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post hoc test (for multiple comparisons) were applied to compare the means. Data integration was conducted by principal component analyses (PCA) were performed with the FactorMineR package with default settings. Graphical analyses were performed with “ggplot” package of R. A p-value lower than 0.05 was considered as a significant difference.

3. Results

3.1. Geographical, hydrobiological and chemical data: a typology of the watersheds

We performed a Principal Component Analysis (PCA) by combining geographical catchment metrics with hydrobiology and pollutants chemical data (Table S1 & Fig. 2).

Axis 1 (horizontal) of the figure revealed two distinct groups of watersheds. On the left, we observed a first group of hydrosystems characterized by high agricultural pressure, while on the right, the Douffine and Aven catchments showed a moderate agricultural pressure. Furthermore, within the first group, the Gouessant, Flèche and Guillec basins were mainly characterized by high livestock production and phytosanitary treatments, nitrogen enrichment and metallic contamination of fish muscle; the Quillimadec and Aber Wrac'h basins in the upper left part of the

diagram showing higher human population density and urbanization.

In the second group on the right, the Douffine system was characterized by high fish farming activity, metallic contamination of the sediment and large proportion of well-preserved natural environments. The Aven watershed, isolated in the upper right part of the graph, stood out due to high density of hedges and contamination of the sediment by PAHs and fish muscle by Arsenic. Overall, the Principal Component analysis (Fig. 2) highlighted a moderate eutrophication in the Aven basin compared to other six watersheds.

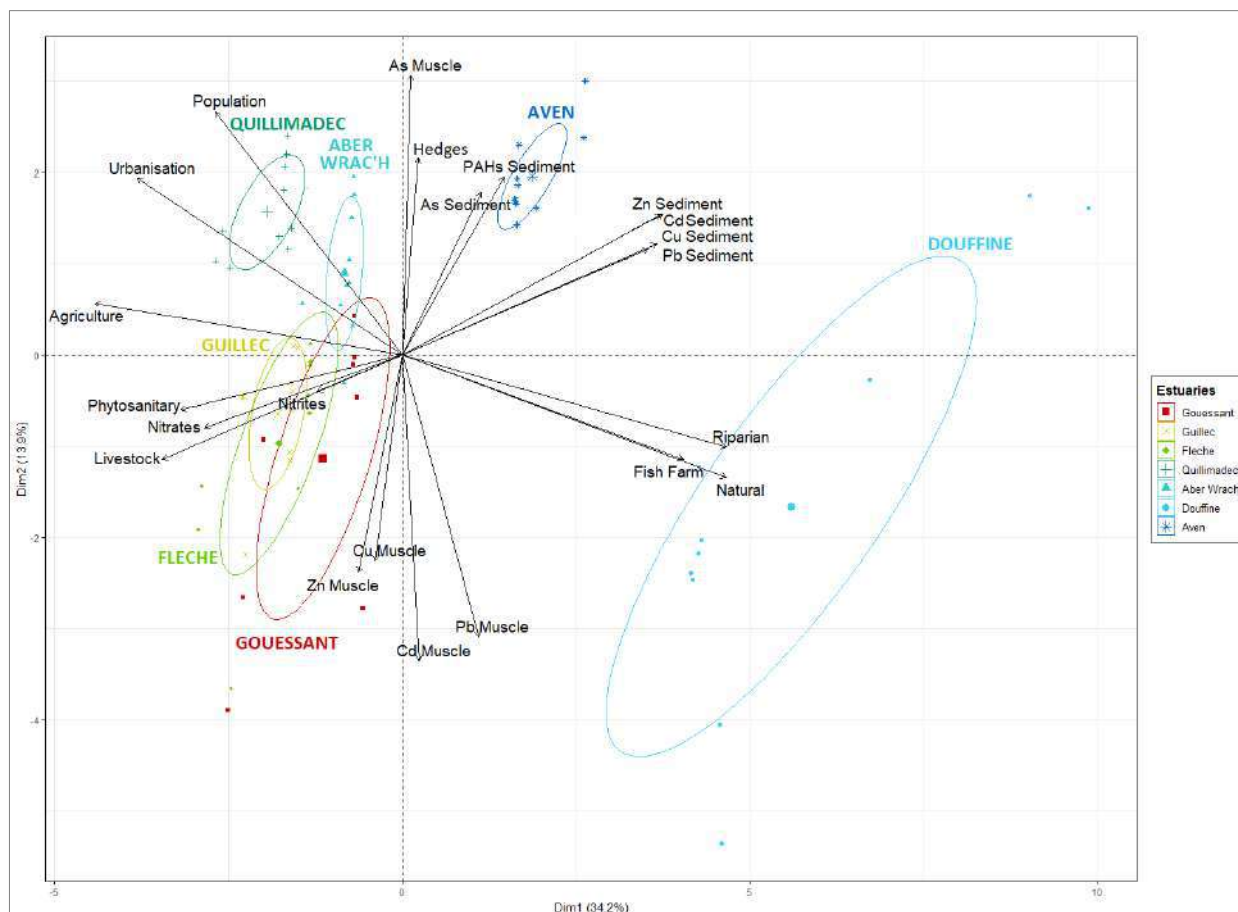


Figure 2. Principal Component Analysis (axes 1 and 2). Distribution of 22 variables (geographical, hydrobiological and chemical metrics) and individuals on the factorial plan in Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven hydrosystems.

3.2. Total lipids classes

We first focused on total lipid classes, and more closely on storage lipids, membrane lipids and the ratio TG:FS (Table 1). The highest levels of total lipids were observed in flounders from Guillec and Douffine ($\approx 14 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), the lowest amounts being measured in Flèche ($11 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$). Overall, the storage lipids were also higher in Douffine fish ($3.85 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$) compared to other hydrosystems; fish from Aven and Aber Wrac'h showing the lowest values ($\approx 1 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$). Membrane lipids were the most abundant in individuals from Guillec ($12.08 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$), compared to fish from Flèche ($9.66 \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$). The ratio TG:FS ratio confirmed the previous trend of a moderate fish lipid reserve for Aven and Aber Wrac'h (1.18 - 1.23).

Finally, the fish condition factors were not significantly different (0.92 - 1.01) over the seven watersheds (Table 1).

Table 1. Total lipids (HPTLC) in *P. flesus* muscle from Gouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven.

Estuaries	Gouessant	Guillec	Flèche	Quillimadec	Aber Wrac'h	Douffine	Aven
Total lipids ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ w.w.)	12.78 \pm 2.14 ^(ab)	14.05 \pm 1.27 ^(a)	11.28 \pm 0.95 ^(b)	12.68 \pm 2.36 ^(bc)	12.01 \pm 1.39 ^(bc)	14.65 \pm 5.03 ^(ac)	12.22 \pm 0.94 ^(bc)
Total storage lipids ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ w.w.)	1.55 \pm 1.03 ^(ac)	1.97 \pm 1.13 ^(ab)	1.62 \pm 0.67 ^(ab)	1.91 \pm 2.06 ^(ac)	0.97 \pm 0.34 ^(bc)	3.85 \pm 4.56 ^(a)	1.00 \pm 0.5 ^(c)
Total membrane lipids ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ w.w.)	11.23 \pm 1.39 ^(ac)	12.08 \pm 0.47 ^(a)	9.66 \pm 0.57 ^(b)	10.77 \pm 0.53 ^(c)	11.04 \pm 1.13 ^(ac)	10.80 \pm 0.9 ^(c)	11.22 \pm 0.63 ^(c)
Ratio TG:FS	1.98 \pm 1.56 ^(abc)	2.62 \pm 1.84 ^(a)	2.53 \pm 1.26 ^(ac)	2.83 \pm 3.2 ^(abc)	1.23 \pm 0.82 ^(b)	5.6 \pm 6.8 ^(a)	1.18 \pm 0.71 ^(c)
Fish Condition Factor	0.93 \pm 0.02 ^(ab)	0.96 \pm 0.02 ^(ac)	0.96 \pm 0.01 ^(ac)	0.92 \pm 0.01 ^(b)	0.97 \pm 0.01 ^(ac)	0.98 \pm 0.02 ^(ac)	1.01 \pm 0.01 ^(c)

3.3. Fatty acids profiles

3.3.1. Total lipid fatty acids

In this study, we analysed the fatty acid composition of flounder muscle over the seven hydrosystems. A total of 59 FAs were detected in fish muscle, including 9 SFA, 14 MUFA and 23 PUFA. We have retained only those FAs $\geq 1\%$, detected in a minimum of one individual per site. This approach enabled to highlight the most abundant and potentially most important FAs in the lipid composition of fish per site, reducing the complexity of our data for a clearer and more relevant analysis.

Total lipid fatty acids (TL) were integrated in a principal component analysis (PCA) which revealed significant differences in FAs composition between catchment. In the PCA (Fig. 3), the first and second principal components accounted for 45.1% of the total variance of the data set.

PCA showed that Douffine flounders were mainly discriminated by oleic acid (18:1n-9, OA), linoleic acid (18:2n-6, LA) and alpha-linoleic acid (18:3n-3, ALA), in opposition to Aven individuals characterized by 20:1n-7, docosatetraenoic acid (22:4n-6, DTA) and 22:5n-3. PCA also revealed that fish from Aber Wrac'h were discriminated by 16:1n-9, 20:2n-6 and (22:6n-3, DHA), while fish from the Gouessant were characterized by 20:3n-3, branched FAs and arachidonic acid (20:4n-6, AA). PCA showed that Guillec flounders showed high levels of EPA (20:5n-3), vaccenic acid (18:1n-7), palmitoleic acid (16:1n-7) and DMA. Finally, PCA also revealed that individuals caught in Quillimadec displayed high levels of 20:1n-7 and 22:4n-6, in contrast to Flèche fish characterized by high levels of DMA and EPA (20:5n-3).

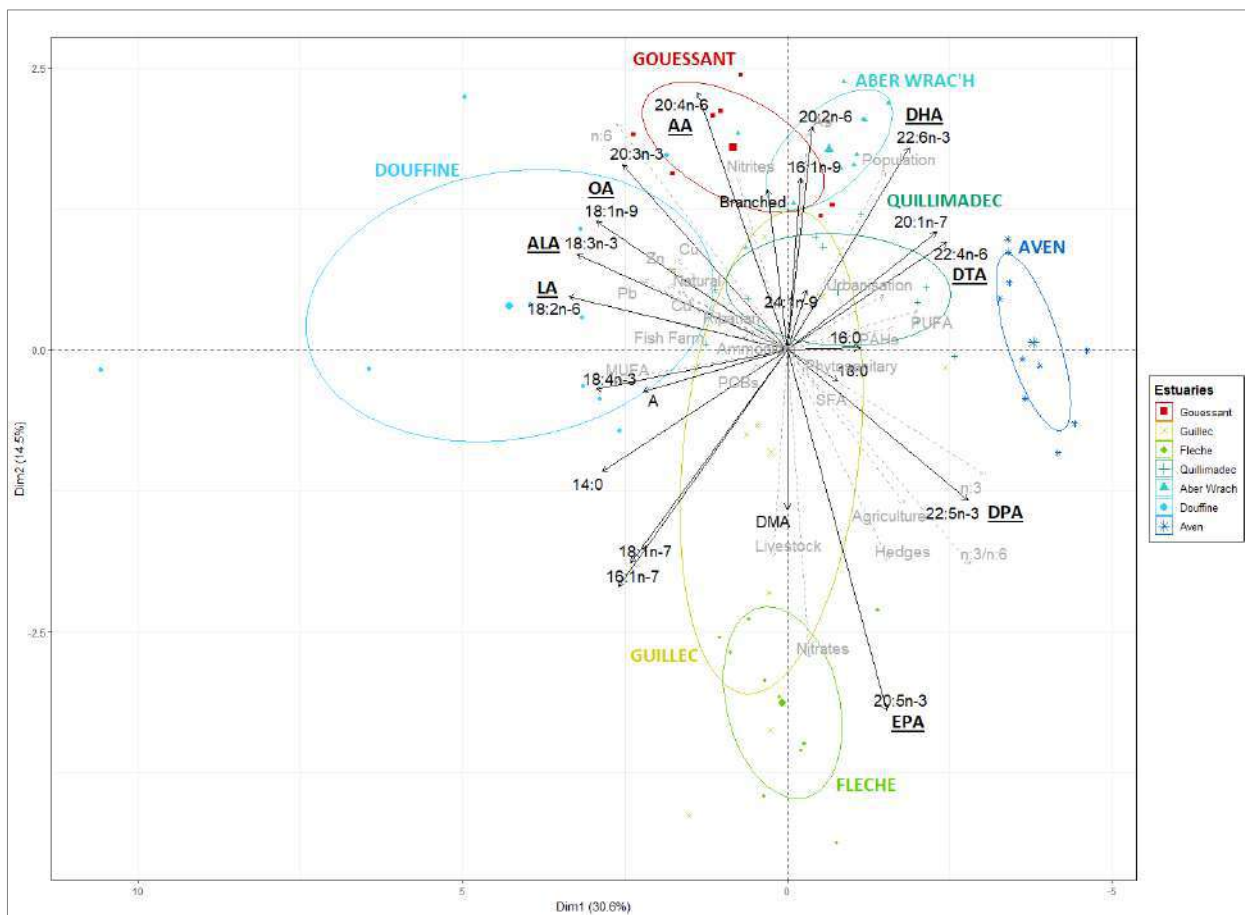


Figure 3. Principal Component Analyses of total fatty acids in *P. flesus* muscle from Gouessant, Guilec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac’h, Douffine and Aven estuaries

3.3.2. Polar lipid fatty acids profiles

We also investigated polar lipid fatty acids (PL) in flounder muscle. The PCA carried out on PL (PL PCA) showed contrasted differences of FAs composition between hydrosystems (Fig. 4). In this PCA, the two first principal components explain 47.4 % of the total variance of the data set.

The PL PCA showed that flounder from Douffine were still discriminated by, OA (18:1n-9), LA (18:2n-6) and ALA (18:3n-3), additionally accompanied by vaccenic acid (18:1n-7). Statistical analyses and Spearman correlations showed positive correlations between OA, LA and ALA and fish farm, natural surfaces, riparian vegetation and metals (Fig. S1a). Furthermore, Flèche fish were characterized by palmitoleic acid (16:1n-7), a fatty acid positively correlated with fish farm, natural surfaces, riparian vegetation and metal concentrations (Fig. S1a). High values of vaccenic acid (18:1n-7) and DMA were also detected in Flèche fish and were positively correlated with nitrates and livestock (Fig. S1a). Some Guilec fish showed high values of myristic acid (14:0), stearic acid (18:0) and EPA (20:5n-3). Myristic acid was positively correlated with fish farm, natural surfaces, riparian vegetation and metal concentrations (Fig. S1a). EPA was positively correlated with nitrate concentrations, livestock, agricultural surfaces and hedges density (Fig. S1a). The PL PCA showed that Aber Wrac’h flounders showed high levels of DPAn-6 (22:5n-6) and DHA (22:6n-3), positively correlated with As in sediment and urbanized surfaces (Fig. S1a). In addition, the Aven fish were characterized by high proportions of margaric acid (17:0), 18:1n-11, 20:1n-11, and DTA (22:4n-6), positively correlated with PAHs in sediments. FAs 18:1n-11 and 22:4n-6 were also correlated with hedges

density (Fig. S1a). No particular trends were detected for the FAs composition of fish from Guouessant and Quillimadec, the individuals being positioned close to the gravity centre of the PL PCA (Fig. 4).

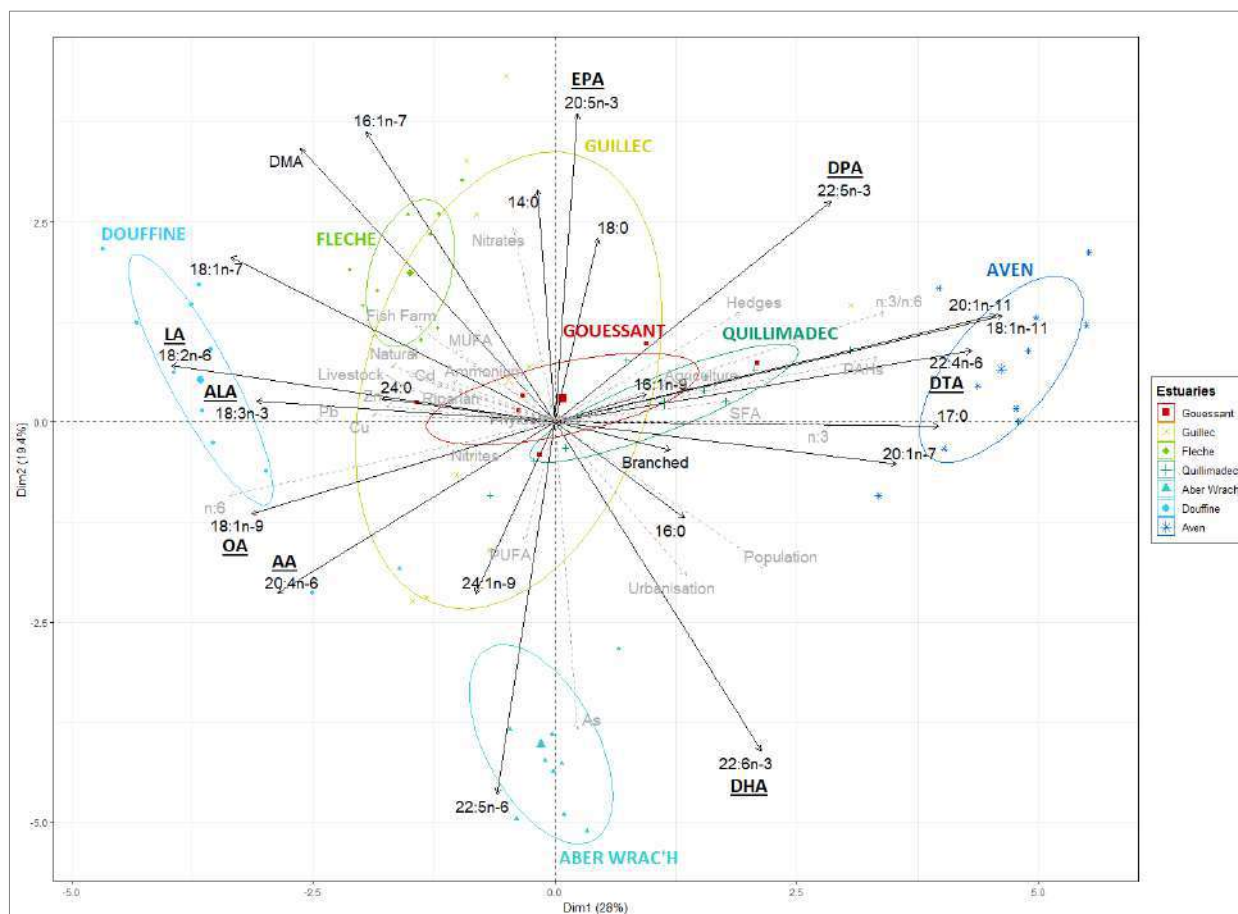


Figure 4. Principal Component Analyses of polar lipids fatty acids in *P. flesus* muscle from Guouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac’h, Douffine and Aven estuaries

3.3.3. Neutral lipid fatty acids profiles

Lastly, we examined neutral lipid fatty acids (NL) in flounder muscle. The NL contents obtained were integrated into a PCA (NL PCA), illustrating the differences between hydrosystems (Fig. 5). According to the PCA results, the first and second principal components explain 42.4 % of the total variance of the data set.

A group of hydrosystems was located in the left part of the NL PCA diagram, including Douffine, Flèche and Guillec. It was discriminated by high levels of OA (18:1n-9), LA (18:2n-6) and ALA (18:3n-3); LA and ALA being positively correlated with level of nitrites, fish farm production, proportion of natural habitats and metallic contamination in the sediment (Fig. S1b). Furthermore, Flèche and Guillec fish showed high levels of MUFA (16:1n-7 and 18:1n-7) that were positively correlated with water nitrate and livestock (Fig. S1b). Moreover, NL PCA showed that fish caught in Aber Wrac’h were enriched with AA (20:4n-6), osbond acid (22:5n-6), DHA (22:6n-3), nervonic acid (24:1n-9) and DMA. Statistical analysis revealed that all these FAs were correlated with As in sediment (Fig. S1b). NL PCA highlighted that individuals from Guouessant located in the lower part of the diagram (Fig. 5) were mainly characterized by Branched FAs negatively correlated with the hedge density (Fig. S1b). Fish from Quillimadec were relatively close to the gravity centre of the NL PCA and showed mainly high levels of 20:1n-7 and 20:1n-11 positively

correlated with levels of PAHs in the sediment (Fig. S1b). Finally, fish from Aven were clearly located in the right part of the NL PCA diagram (Fig. 5), and mainly characterized by high levels of DTA (22:4n-6) and DPA (22:5n-3); these two fatty acids being negatively correlated with livestock and positively correlated with PAHs in sediment (Fig. S1b).

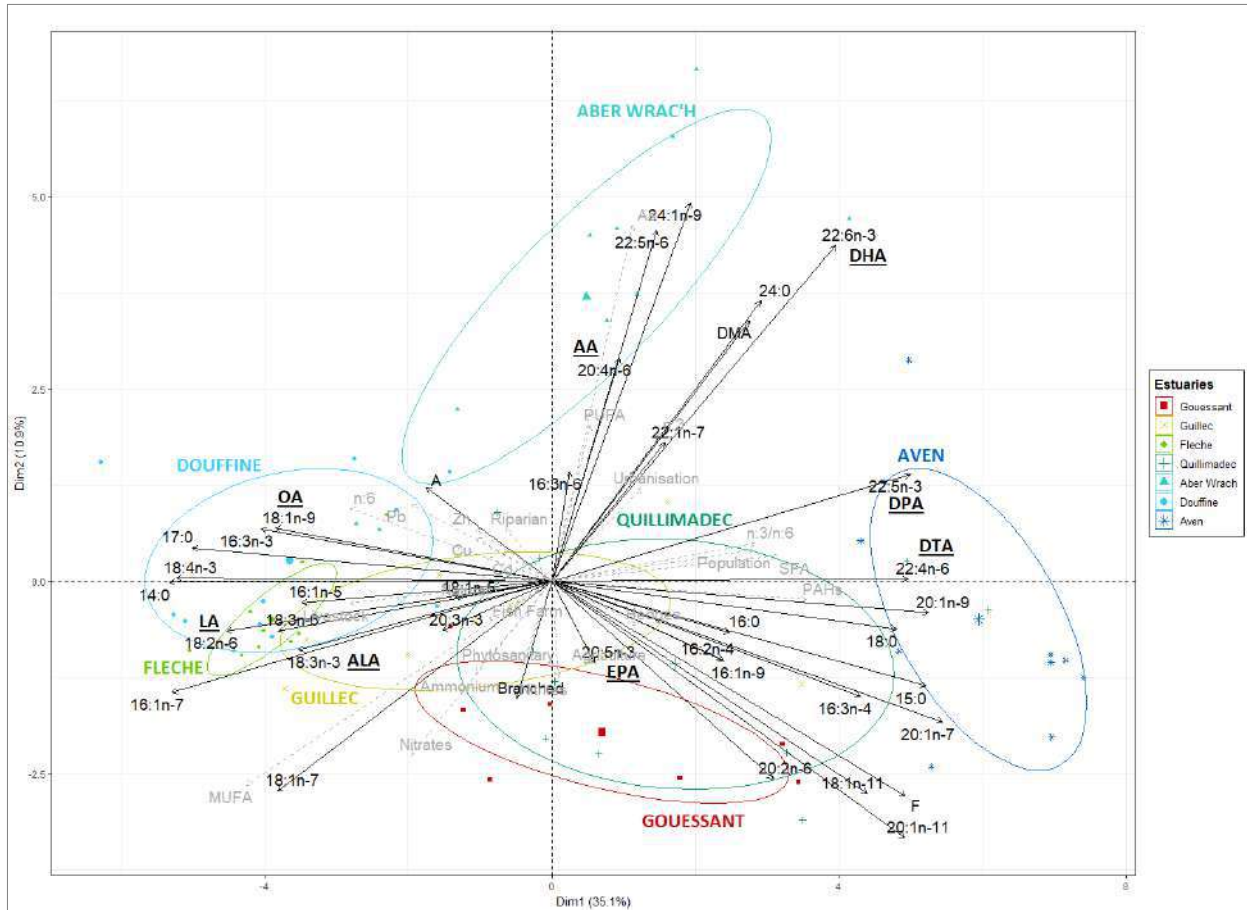


Figure 5. Principal Component Analyses of neutral lipids fatty acids in *P. flesus* muscle from Guouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac'h, Douffine and Aven estuaries

4. Discussion

4.1 Typology of the anthropization in the watersheds

In the present study, the environmental metrics (geography, hydrobiology and contaminants) highlighted that the seven studied hydrosystems were submitted mainly to agricultural pressure, the classical signatures of industrial activities like PCBs levels in sediment and fish being very weak. Significant PAHs concentrations detected in particular systems were related to their high levels of car traffic and in the Aven to the presence of a busy car park close to the estuary.

The high agricultural pressure in Guouessant, Flèche and Guillec was mainly linked to high production of corn for the first and vegetables (potatoes, carrots, shallots,...) for the third and fourth, over more than 70% of the catchment surface; these systems being also impacted by intensive breeding. Quillimadec and Aber

Wrac'h showed a lower agricultural pressure but a higher urbanisation, whereas Aven and Douffine were characterized by highest proportions of preserved areas and riparian vegetation. Furthermore the specificity of the anthropization in the Aven and Douffine was a production of canned vegetables and a high fish farm activity respectively. Thus, over the whole data set, the Aven watershed could be considered the system least impacted by anthropization.

4.2. Total lipids classes in fish muscle

The highest lipid reserves (total lipids, storage lipids) were detected in Douffine and Guillec fish. The highest TG:FS ratio, the lipid storage index commonly used in fish ecology (Kerambrun et al., 2013), was assessed in Douffine. Globally, fish from Douffine and Guillec systems therefore stored more lipids than individuals from other basins, which could indicate a diet richer in lipids. This trend could be related, particularly in the Douffine, to its very high fish farming activity leading to a distribution of lipid-rich feeds and to a heavy eutrophication of the hydrosystem (Pickova & Mørkøre, 2007).

The remaining study sites showed only slight lipid differences between them, which can be explained by variations in the abundance and diversity of prey in the environment. Water pollution can also influence fish body composition, including lipid content, as certain pollutants can disrupt lipid metabolism, leading to lipid accumulation or depletion in fish tissues (Filimonova et al., 2016). The Aber Wrac'h and Aven showed the lowest values for storage lipids and ratio TG:FS that could be a signal of a moderate eutrophication.

The fish condition factor did not differentiate the seven flounder populations, thus underlining that no major fitness loss was detected over the watersheds.

4.3. Fatty acids profiles in fish muscle

4.3.1. Total lipid fatty acids (TL)

Principal component analysis clearly highlighted a gradient of the estuarine environment quality (along horizontal axis), from Douffine to Aven. Fish in Douffine vs Aven showed higher MUFA and lower in PUFA, reflecting poorer lipid quality. The PUFA higher values in Aven indicating a better quality of food web components (Keva et al., 2020). In addition, fish from Douffine showed a combination of oleic, linoleic and alpha-linoleic acids, which are the dominant C18 FAs in terrestrial seeds and animal oils. These FAs are the most relevant biomarkers for linking aquaculture waste in the environment and its potential effects (White et al., 2019). Douffine is characterized by three fish farms producing 900 T.yr⁻¹ of trout. Furthermore, 20:3n-3 was also highly accumulated in fish fed intensively on artificial feeds (Jankowska et al., 2004). On the other hand, PUFA abundant in Aven reflect the marine origin of food sources (Závorka et al., 2022). Fish from Aven were also enriched in omega 3 and 6, such as DHA (22:6n-3), DTA (22:4n-6). The level of HUFAs such as DHA is reduced in highly eutrophicated environments (Taipale et al., 2016) and high in oligotrophic systems, confirming the limited eutrophication in the Aven hydrosystem (Laurent et al., 2023). The other watersheds, Gouessant, Aber Wrac'h, Guillec, Quillimadec and Flèche, showed mesotrophic conditions, between Douffine and Aven (Laurent et al., 2023).

The principal component analysis also revealed a second gradient between DHA-AA and EPA (along vertical axis), respectively from Aber Wrac'h to Flèche. Fish from Aber Wrac'h were characterised by high levels of 20:2n-6 and DHA (22:6n-3), revealing a high quality environment. Fish in Gouessant vs Aber Wrac'h showed a reduced level of PUFA, reflecting a poor quality of the food web components. Furthermore, a reduction in PUFA availability in primary producers in aquatic ecosystems is observed when water temperature increases, negatively affecting fish (Závorka et al., 2021). Fish from Gouessant were characterized by a particular AA abundance, this FA and its metabolites playing a major role in proper functioning of the immune system and inflammatory response (Hanna & Hafez, 2018; Denisenko et al., 2015). Fish from Gouessant also contained high proportions of Branched FAs, commonly used to evaluate the bacterial impact on the marine environment (Prato et al., 2010; Alfaro et al., 2006; Kharlamenko et al., 2001; Virtue et al., 2000; Meziane & Tsuchiya, 2000). Indeed, two successive dams fragment the Gouessant river, which favours an increase in water temperature and the proliferation of cyanobacteria in the reservoirs (Chinyama et al., 2016).

Individuals from Flèche and Guillec both showed high levels of DMA and EPA (20:5n-3) but very reduced levels of DHA that could be harmful for the healthy state of cell membrane (Costa et al., 2015; Saito & Aono, 2014). Furthermore, the high proportion of DMA detected in Flèche and Guillec could be related to the effect of eutrophication and hypoxia in these systems. Indeed, the plasmalogens from which DMA are derived play a protective role during oxidative and hypoxic stress (Nagan & Zoeller, 2001). Individuals from Flèche and Guillec also showed high levels of vaccenic acid (18:1n-7), used to assess the bacterial contribution in the marine food web (Meziane & Tsuchiya, 2000; Kharlamenko et al., 2001; Alfaro et al., 2006). Thus, a very active livestock farming in Flèche and Guillec basins could lead to a bacterial proliferation in the estuaries.

Interestingly, unlike lipid classes, the total lipids (TL) appear to provide substantial insights into the effects of environmental stressors on the lipid profiles of flounder. These results emphasize the influential role of the selected environmental variables as key determinants shaping the composition of fatty acid profiles in fish tissues. Nevertheless, we sought to deepen this information by separating fatty acid: neutral lipid fatty acids (NL) vs polar lipid fatty acids (PL).

4.3.2. Polar lipid fatty acids profiles (PL)

The polar lipid fatty acids (PL) present in fish muscles can reveal information about fish physiology, in particular about the composition of their membrane lipids. The FAs composition of fish cell membrane is important for the maintenance of cellular functions and properties, and therefore for the health of the organism. PLs are essential components of cell membranes and their composition can influence membrane fluidity and permeability, affecting the organism's ability to cope with temperature changes strongly linked to the proportion of PUFA (Delaporte et al., 2005). Thus, analysis of PL in fish muscles can shed light on how fish adapt to their environment.

Aven still showed higher proportions of omega 3 and 6, confirming the good ecological condition of this system, although the PLs provided more information on the status of the other hydrosystems.

Fish from Douffine were invariably characterised by MUFA and OA, LA and ALA correlated with fish farm activity. However, the individuals also showed high proportions of AA. A previous study showed a predominance of AA in several marine fish species, while they were contaminated with various metals such as Cd, Cu and Zn (Ajeeshkumar et al., 2015). Thus, the heavily metallic contamination of the Douffine sediments by ancient mining activities (Chiffolleau, 2017; Lernière & Clozel, 2002) could explain the high level of AA in the flounder, a bottom dwelling-fish. Furthermore, previous studies have already shown that metal exposure acts in an alternative pathway to maintain the level of certain PUFA such as AA (Fadhlaoui & Couture, 2016).

Analysis of PL revealed that Aber Wrac'h is clearly distinguished from Gouessant, by high levels of PUFA, and particularly DHA, which is essential to cell membranes (Costa et al., 2015; Saito & Aono, 2014). These high proportions of DHA could indicate an efficient cell membrane physiology in Aber Wrac'h individuals.

Individuals from Gouessant and Quillimadec were located in the centre of the Principal Component Analysis (PCA), thus did not show clear trends in the distribution of their FAs. Fish from Gouessant were particularly close to the gravity centre of the PCA. The fish being very rare in the Gouessant estuary, we suggest that this equilibrium state between the different types of membrane lipids may be the only way the fish have to ensure their survival in this highly stressed system.

Fish from Flèche and Guillec were still characterised by MUFA and DMA. The high proportion of DMA in PL particularly in the Flèche system could be related to the impact of a marked oxidative stress on cell membrane lipids (Nagan & Zoeller, 2001).

4.3.3. Neutral lipid fatty acids profiles (NL)

Neutral lipid fatty acids (NL) stored in muscle tissue serve as energy reserves from the diet, and partly reflect the diet of fish. NL composition of prey, such as plankton (Dalsgaard et al., 2003; Jezyk & Penicnak, 1966), can influence NL composition in fish. Indeed, when invertebrate primary consumers feed on a high-quality source, PUFA contents thus offer a high-quality source to predators, including fish (Brett et al., 2017; Guo et al., 2018). Conversely, when they consume lower-quality foods, such as leaves or cyanobacteria, PUFA content of primary consumers decreases (Kühmayer et al., 2020; Müller-Navarra et al., 2004), negatively impacting food quality for their predators.

NL highlighted that fish from Aber Wrac'h were enriched in PUFA and especially in DHA, an essential HUFA characterizing the presence of diatoms and dinoflagellates. In terrestrial environments, EPA and DHA levels are very low or non-existent (Hixson et al., 2015), but diatoms and dinoflagellates can synthesize EPA and DHA (Strandberg et al., 2015; Guedes et al., 2011). Furthermore, fish from Aber Wrac'h were also characterized by high level of AA. In Laurent et al. (2023), we hypothesized arsenic contamination through the spreading of algal sludge in fields (Greger et al., 2007), resulting from the exploitation of algae in the food industry (Piwowar & Harasym, 2020). Algae naturally concentrate arsenic and a range of metals that are incorporated into enzymes, proteins and vitamins (Wahbeh et al., 1985). In addition, AA and DHA are commonly present in red (*Gracilaria* sp.) and brown (*Sargassum* sp.) algae,

respectively (Kelly and Scheibling, 2012; Shanab et al., 2018; Kumar et al., 2011, 2010; Van Ginneken et al., 2011). However, industrial extraction of molecules of interest generally involves water extraction (Zakaria et al., 2016; Castro-Puyana et al., 2013). The fraction that remains, often considered as a waste product, is liable to contain many lipids, and when algal sludge is spread on fields, these lipids could have an impact on the lipid reserves of the entire trophic chain, including flounder.

Fish from Gouessant and Quillimadec showed a low proportion of DHA. These systems displayed water reservoirs that favour the proliferation of cyanobacteria and green algae that cannot produce HUFAs (Strandberg et al., 2015; Guedes et al., 2011).

The general distribution of NL confirms the results observed with the total lipid classes, *i.e.* a poor quality of fatty acids reserves for Douffine, Guillec and Flèche fish. Fish from Douffine were constantly typified by oleic, linoleic and alpha-linoleic acids, characteristic of terrestrial food sources (White et al., 2019). NL reflect the fish diet, so it appears that the feeds distributed to fish farms may have contaminated the entire trophic chain. Indeed, these same FAs were observed in greater proportion in fish living in waters surrounding aquaculture facilities, suggesting consumption of feed used in aquaculture (Johnson et al., 2018), confirming the trends observed with TL and LP. These three FAs therefore appear to be reliable indicators of fish farming activity, whatever the type of fatty acid. In addition, fish from Douffine were deficient in DHA, another characteristic of the impact of fish farms (Fernandez-Jover et al., 2011). Individuals from Douffine also showed myristic acid and margaric acid, both characteristic of bacterial presence (Prato et al., 2010; Virtue et al., 2000). Intensive aquaculture has expanded in recent years, accompanied by waste discharges that can lead to environmental eutrophication (Amirkolaie, 2011; Talbot & Hole, 1994) and bacterial proliferation. Furthermore, in Le Croizier et al. (2016), margaric acid was correlate with Cd, and Douffine system exhibited high Cd concentration in sediments.

In the case of NL, individuals from Flèche and Guillec showed high levels of oleic, linoleic and alpha-linoleic acids in this fraction. As with Douffine, the Guillec system hosts fish farms (450 T.an⁻¹), which may explain these FA concentrations. The Flèche river, on the other hand, only supports a very small fish farm (20 T.an⁻¹). The proportion of OA, LA and ALA here could be related to a diet composed mainly of prey derived from terrestrial sources.

To conclude, some observed results could be related to environmental stressors, such as eutrophication and pollution by PAHs or metals, which could all exert selective pressures on preys on which flounder feed, influencing their lipid and fatty acid composition. Fish that feed on these preys will then be impacted by these variations in their diet composition, which may have consequences for their own lipid and fatty acid composition (Keva et al., 2019; Rajasilta et al., 2019; Le Croizier et al., 2016).

5. Conclusion

The simple classification of total lipids classes is not sufficient to fully understand the complexity of fatty acid mechanisms in fish ecology and physiology. Different approaches to fatty acid analysis provide more precise informations.

Total fatty acids are relevant, particularly for young fish, such as juvenile flounder, which tends to have few reserve lipids and significant amounts of polar fatty acids. However, it is important to point out that lipid composition can vary between stages and species. Thus, for fatter fish, or even adult flounder, it is imperative to opt for neutral and polar fatty acids, offering a deeper understanding of lipid composition, which is particularly valuable for exploring complex aspects of fish physiology and ecology.

The separation of neutral and polar fatty acids is time-consuming and costly. It is therefore essential to strike a balance between the need for in-depth information and the constraints of time and cost.

Neutral fatty acids are useful for analysing trophic relationships in aquatic ecosystems. However, the analysis of polar fatty acids could be particularly relevant to explore fish response to stressors in the environment. Thus, in the context of stress ecology, it could be highly recommended to integrate the analysis of polar fatty acids in addition to neutral fatty acids, in order to fully grasp the biochemical and physiological interactions at play.

6. Acknowledgment

This work was funded by the “Agence de l’eau Loire-Bretagne” (AELB, project ECOEST) and the “LTSER Zone Atelier Brest-Iroise”, CNRS and AllEnvi (Project STRESS). This project was also supported by ISblue project, Interdisciplinary graduate school for the blue planet: ANR-17-EURE-0015 (Project ESTUARIES), and co-funded by a grant from the French government under the program "Investissements d'Avenir".

Many thanks to M. Mathieu-Resuge and F. Sardenne for their help in reflecting on the results obtained for lipids and fatty acids.

We would like to thank V. Leite Jardim for his precious help and advices about statistical analyses.

Many thanks to P. Mazari for valuable help in the geography part of the work.

7. References

- Ajeeshkumar, K. K., Vishnu, K. V., Kumari, K. R., Navaneethan, R., Asha, K. K., Ganesan, B., Niladri, S. C., Anandan, R. & Mathew, S. (2015). Biochemical composition and heavy metal content of selected marine fish from the Gulf of Mannar, India. *Fishery Technology*, 53, 164-169. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/FT>
- Alfaro, A. C., Thomas, F., Sergeant, L., & Duxbury, M. (2006). Identification of trophic interactions within an estuarine food web (northern New Zealand) using fatty acid biomarkers and stable isotopes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 70(1-2), 271-286. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.06.017>
- Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2021). Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1496-1508. <https://doi.org/10.1111/jfb.14599>
- Amara, R., Selleslagh, J., Billon, G., & Minier, C. (2009). Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia*, 627, 87-98. <https://doi.org/10.1007/s10750-009-9717-9>
- Aminot, A., & Kérouel, R. (2007). *Dosage automatique des nutriments dans les eaux marines: méthodes en flux continu* (Editions Quae, Ed.).
- Amirkolaie, A. K. (2011). Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Reviews in Aquaculture*, 3(1), 19-26. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01040.x>
- Barnes, C., Sweeting, C. J., Jennings, S., Barry, J. T., & Polunin, N. V. (2007). Effect of temperature and ration size on carbon and nitrogen stable isotope trophic fractionation. *Functional Ecology*, 21(2), 356-362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01224.x>
- Bennett, K. A., Robinson, K. J., Armstrong, H. C., Moss, S. E., Scholl, G., Tranganida, A., Eppe, G., Thom e, J.-P., Debier, C. & Hall, A. J. (2021). Predicting consequences of POP-induced disruption of blubber glucose uptake, mass gain rate and thyroid hormone levels for weaning mass in grey seal pups. *Environment international*, 152, 106506. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106506>
- Bernier-Graveline, A., Lesage, V., Cabrol, J., Lair, S., Michaud, R., Rosabal, M., & Verreault, J. (2021). Lipid metabolites as indicators of body condition in highly contaminant-exposed belugas from the endangered St. Lawrence Estuary population (Canada). *Environmental Research*, 192, 110272. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110272>
- Brett, M.T., Bunn, S.E., Chandra, S., Galloway, A.W.E., Guo, F., Kainz, M.J., Kankaala, P., Lau, D.C.P., Moulton, T.P., Power, M.E., Rasmussen, J.B., Taipale, S.J., Thorp, J.H. & Wehr, J.D. (2017). How important are terrestrial organic carbon inputs for secondary production in freshwater ecosystems? *Freshwater Biology*, 62, 833–853. <https://doi.org/10.1111/fwb.12909>
- Borcier, E., Charrier, G., Couteau, J., Maillat, G., Le Grand, F., Bideau, A., Waeles, M., Le Floch, S., Amara, R., Pichereau, V., Laroche, J. (2020). An integrated biomarker approach using flounder to improve chemical risk assessment in the heavily polluted Seine estuary. *Journal of Xenobiotics*, 10, 14-35. <https://doi.org/10.3390/jox10020004>
- Cabral, H., Fonseca, V., Sousa, T., & Costa Leal, M. (2019). Synergistic effects of climate change and marine pollution: An overlooked interaction in coastal and estuarine areas. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(15), 2737. <https://doi.org/10.3390/ijerph16152737>
- Castro-Puyana, M., Herrero, M., Mendiola, J. A., & Ibáñez, E. (2013). Subcritical water extraction of bioactive components from algae. *Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals*, 534-560. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857098689.3.534>
- Chiffolleau, J.-F. (2017). La contamination chimique sur le littoral Loire-Bretagne. Résultats de 35 années de suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique. RST.RBE-BE/2017.02. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00405/51617/>
- Chinyama, A., Snyman, J., Ochieng, G. M., & Nhapi, I. (2016). Occurrence of cyanobacteria genera in the Vaal Dam: implications for potable water production. *Water SA*, 42(3), 415-420. <https://hdl.handle.net/10520/EJC193852>
- Crisan M. (2020). *Pratiques culturelles en grandes cultures 2017, IFT et nombre de traitements, AgresteChiffres et Données*.
- Dalsgaard, J., John, M. S., Kattner, G., Müller-Navarra, D., & Hagen, W. (2003). Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. *Advances in Marine Biology*, 46, 225-340.
- Dando, P. R. (2011). Site fidelity, homing and spawning migrations of flounder *Platichthys flesus* in the Tamar estuary, South West England. *Marine Ecology Progress Series*, 430, 183-196. <https://doi.org/10.3354/meps09116>
- Defo, M. A., Mercier, L., Beauvais, C., Brua, R. B., T etreault, G., Fontaine, A., Couture, P., Verreault, J., Houde, M. (2021). Time-dependent biological responses of juvenile yellow perch (*Perca flavescens*) exposed in situ to a major urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112483>
- Delaporte, M., Soudant, P., Moal, J., Kraffe, E., Marty, Y., & Samain, J. F. (2005). Incorporation and modification of dietary fatty acids in gill polar lipids by two bivalve species *Crassostrea gigas* and *Ruditapes philippinarum*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 140(4), 460-470. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.02.009>

- Dempson, J. B., Braithwaite, V. A., Doherty, D., & Power, M. (2010). Stable isotope analysis of marine feeding signatures of Atlantic salmon in the North Atlantic. *ICES Journal of Marine Science*, 67(1), 52-61. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsp227>
- Denisenko, Y. K., Lobanova, E. G., Novgorodtseva, T. P., Gvozdenko, T. A., & Nazarenko, A. V. (2015). The role of arachidonic acid metabolites (endocannabinoids and eicosanoids) in the immune processes: a review. *International Journal of Chemical and Biomedical Science*, 1(3), 70-78.
- Elliott, M. (2011). Marine science and management means tackling exogenic unmanaged pressures and endogenic managed pressures - A numbered guide. In *Marine Pollution Bulletin*, 62(4), 651-655. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.11.033>
- Fadhlaoui, M., & Couture, P. (2016). Combined effects of temperature and metal exposure on the fatty acid composition of cell membranes, antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquatic Toxicology*, 180, 45-55. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.09.005>
- Fagan, K. A., Koops, M. A., Arts, M. T., & Power, M. (2011). Assessing the utility of C: N ratios for predicting lipid content in fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68(2), 374-385. <https://doi.org/10.1139/F10-119>
- Fernandez-Jover, D., Martinez-Rubio, L., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J. T., Jimenez, J. A. L., Lopez, F. J. M., Bjørn, P. A., Uglem, I. & Dempster, T. (2011). Waste feed from coastal fish farms: a trophic subsidy with compositional side-effects for wild gadoids. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91(4), 559-568. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.12.009>
- Filimonova, V., Goncalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., & Goncalves, A. M. (2016). Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: a review. *Ecological Indicators*, 67, 657-672. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.044>
- Folch, J., Lees, M., & Sloane Stanley, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509.
- Galloway, A. W., & Budge, S. M. (2020). The critical importance of experimentation in biomarker-based trophic ecology. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 375(1804), 20190638. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0638>
- Gonçalves, A. M. M., Azeiteiro, U. M., Pardal, M. A., & De Troch, M. (2012). Fatty acid profiling reveals seasonal and spatial shifts in zooplankton diet in a temperate estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 109, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.05.020>
- Gonçalves, A. M. M., Mesquita, A. F., Verdelhos, T., Coutinho, J. A. P., Marques, J. C., & Gonçalves, F. (2016). Fatty acids' profiles as indicators of stress induced by of a common herbicide on two marine bivalves species: *Cerastoderma edule* (Linnaeus, 1758) and *Scrobicularia plana* (da Costa, 1778). *Ecological Indicators*, 63, 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.12.006>
- Gonçalves, A. M., Rocha, C. P., Marques, J. C., & Gonçalves, F. J. (2021). Fatty acids as suitable biomarkers to assess pesticide impacts in freshwater biological scales—A review. *Ecological Indicators*, 122, 107299. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107299>
- Greger, M., Malm, T., & Kautsky, L. (2007). Heavy metal transfer from composted macroalgae to crops. *European Journal of Agronomy*, 26(3), 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.10.003>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Barbosa, C. R., Pereira, R. D., & Malcata, F. X. (2011). Fatty acid composition of several wild microalgae and cyanobacteria, with a focus on eicosapentaenoic, docosahexaenoic and α -linolenic acids for eventual dietary uses. *Food Research International*, 44(9), 2721-2729. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.020>
- Guo, F., Bunn, S. E., Brett, M. T., Fry, B., Hager, H., Ouyang, X., & Kainz, M. J. (2018). Feeding strategies for the acquisition of high-quality food sources in stream macroinvertebrates: Collecting, integrating, and mixed feeding. *Limnology and Oceanography*, 63(5), 1964-1978. <https://doi.org/10.1002/lno.10818>
- Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of advanced research*, 11, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>
- Hixson, S. M., Sharma, B., Kainz, M. J., Wacker, A., & Arts, M. T. (2015). Production, distribution, and abundance of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids: a fundamental dichotomy between freshwater and terrestrial ecosystems. *Environmental Reviews*, 23(4), 414-424. <https://doi.org/10.1139/er-2015-0029>
- Huang, Z., Qadeer, A., Zheng, S., Ge, F., Zhang, K., Yin, D., Zheng, B., & Zhao, X. (2022). Fatty acid profile as an efficient bioindicator of PCB bioaccumulation in a freshwater lake food web: a stable isotope guided investigation. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127121. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127121>
- Jankowska, B., Zakęs, Z., Żmijewski, T., Ulikowski, D., & Kowalska, A. (2004). Impact of diet on the fatty acids profile of European catfish (*Silurus glanis* L.). *Fisheries & Aquatic Life*, 12(2), 99-100.
- Jezyk, P. F., & Penicnak, A. J. (1966). Fatty acid relationship in an aquatic food chain. *Lipids*, 1(6), 427-429. <https://doi.org/10.1007/BF02532547>
- Johnson, L. E., McMeans, B., Rooney, N., Gutgesell, M., Moccia, R., & McCann, K. S. (2018). Asymmetric assimilation of an anthropogenic resource subsidy in a freshwater food web. *Food Webs*, 15, e00084.

<https://doi.org/10.1016/j.fooweb.2018.e00084>

- Kajiwara, K., Muneoka, T., Watanabe, Y., Karashima, T., Kitagaki, H., & Funato, K. (2012). Perturbation of sphingolipid metabolism induces endoplasmic reticulum stress-mediated mitochondrial apoptosis in budding yeast. *Molecular microbiology*, *86*(5), 1246-1261. <https://doi.org/10.1111/mmi.12056>
- Kelly, J. R., & Scheibling, R. E. (2012). Fatty acids as dietary tracers in benthic food webs. *Marine Ecology Progress Series*, *446*, 1-22. <https://doi.org/10.3354/meps09559>
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., & Amara, R. (2013). A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere*, *91*, 498-505. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.010>
- Keva, O., Taipale, S. J., Hayden, B., Thomas, S. M., Vesterinen, J., Kankaala, P., & Kahilainen, K. K. (2021). Increasing temperature and productivity change biomass, trophic pyramids and community-level omega-3 fatty acid content in subarctic lake food webs. *Global change biology*, *27*(2), 282-296. <https://doi.org/10.1111/gcb.15387>
- Keva, O., Tang, P., Käkälä, R., Hayden, B., Taipale, S. J., Harrod, C., & Kahilainen, K. K. (2019). Seasonal changes in European whitefish muscle and invertebrate prey fatty acid composition in a subarctic lake. *Freshwater Biology*, *64*(11), 1908-1920. <https://doi.org/10.1111/fwb.13381>
- Kharlamenko, V. I., Kiyashko, S. I., Imbs, A. B., & Vyshkvartzev, D. I. (2001). Identification of food sources of invertebrates from the seagrass *Zostera marina* community using carbon and sulfur stable isotope ratio and fatty acid analyses. *Marine Ecology Progress Series*, *220*, 103-117. <https://doi.org/10.3354/meps220103>
- Kühmayer, T., Guo, F., Ebm, N., Battin, T. J., Brett, M. T., Bunn, S. E., Fry, B., & Kainz, M. J. (2020). Preferential retention of algal carbon in benthic invertebrates: Stable isotope and fatty acid evidence from an outdoor flume experiment. *Freshwater Biology*, *65*(7), 1200-1209. <https://doi.org/10.1111/fwb.13492>
- Kumar, M., Gupta, V., Trivedi, N., Kumari, P., Bijo, A. J., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2011). Desiccation induced oxidative stress and its biochemical responses in intertidal red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta). *Environmental and Experimental Botany*, *72*(2), 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.03.007>
- Kumar, M., Kumari, P., Gupta, V., Reddy, C. R. K., & Jha, B. (2010). Biochemical responses of red alga *Gracilaria corticata* (Gracilariales, Rhodophyta) to salinity induced oxidative stress. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *391*(1-2), 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.06.001>
- Lacroix, C., le Cuff, N., Receveur, J., Moraga, D., Auffret, M., & Guyomarch, J. (2014). Development of an innovative and “green” stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–tandem mass spectrometry method for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in marine biota. *Journal of Chromatography A*, *1349*, 1–10. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2014.04.094>
- Laroche, J., Quiniou, L., Juhel, G., Auffret, M., & Moraga, D. (2002). Genetic and physiological responses of flounder (*Platichthys flesus*) populations to chemical contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, *21*(12), 2705-2712. <https://doi.org/10.1002/etc.5620211225>
- Laurent, J., Lavergne, E., Couteau, J., Le Floch, S., Ouddane, B., Cachot, J., Davail, B., Clérandeau, C., Fisson, C., Devaux, A., Amara, R., Diop, M., Pichereau, V. & Laroche, J. (2022). Impacts of chemical stress, season, and climate change on the flounder population of the highly anthropised Seine estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-20000-y>
- Laurent, J., Le Berre, I., Armengaud, J., Kailasam, S., Couteau, J., Waeles, M., Le Floch, S., Laroche, J. & Pichereau, V. (2023). Integration of environmental signatures and omics-based approaches on the European flounder to assist with health assessment of estuarine ecosystems in Brittany, France. *Science of The Total Environment*, 163195. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.163195>
- Le Croizier, G., Schaal, G., Gallon, R., Fall, M., Le Grand, F., Munaron, J. M., Rouget, M.-L., Machu, E., Le Loc'h, F., Laë, R., & De Morais, L. T. (2016). Trophic ecology influence on metal bioaccumulation in marine fish: Inference from stable isotope and fatty acid analyses. *Science of the Total Environment*, *573*, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.035>
- Le Grand, F., Soudant, P., Siah, A., Tremblay, R., Marty, Y., & Kraffe, E. (2014). Disseminated neoplasia in the soft-shell clam *Mya arenaria*: membrane lipid composition and functional parameters of circulating cells. *Lipids*, *49*(8), 807-818. <https://doi.org/10.1007/s11745-014-3917-4>
- Lernière, B., & Clozel, B. (2002). Etude de l'origine des pollutions métalliques naturelles du bassin versant de la Rade de Brest. 29. <http://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-51566-FR.pdf>
- Lesser, J. S., James, W. R., Stallings, C. D., Wilson, R. M., & Nelson, J. A. (2020). Trophic niche size and overlap decreases with increasing ecosystem productivity. *Oikos*, *129*(9), 1303-1313. <https://doi.org/10.1111/oik.07026>
- Leventis, P. A., & Grinstein, S. (2010). The distribution and function of phosphatidylserine in cellular membranes. *Annual review of biophysics*, *39*, 407-427. <https://doi.org/10.1146/annurev.biophys.093008.131234>

- Liu, F., Xie, Q., Yu, R. Q., Xie, Z., Wu, J., Zhang, X., & Wu, Y. (2023). Fatty acids as bioindicators of organohalogen exposure in marine fish from a highly polluted estuary: First insight into small-scale regional differences. *Journal of Hazardous Materials*, 452, 131337. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131337>
- Maazouzi, C., Masson, G., Izquierdo, M. S., & Pihan, J. C. (2007). Fatty acid composition of the amphipod *Dikerogammarus villosus*: feeding strategies and trophic links. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 147(4), 868-875. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.02.010>
- Marchand, J., Tanguy, A., Laroche, J., Quiniou, L., & Moraga, D. (2003). Responses of European flounder *Platichthys flesus* populations to contamination in different estuaries along the Atlantic coast of France. *Marine Ecology Progress Series*, 260, 273-284. <https://doi.org/10.3354/meps260273>
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M. T., & Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquatic Toxicology*, 70(4), 327-343. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.001>
- Mathieu-Resuge, M., Kraffe, E., Le Grand, F., Boens, A., Bideau, A., Lluch-Cota, S.E., Racotta, I.S., Schaal, G. (2019). Trophic ecology of suspension-feeding bivalves inhabiting a north-eastern Pacific coastal lagoon: Comparison of different biomarkers. *Marine Environmental Research*, 145, 155-163. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2019.02.016>
- Meziane, T., & Tsuchiya, M. (2000). Fatty acids as tracers of organic matter in the sediment and food web of a mangrove/intertidal flat ecosystem, Okinawa, Japan. *Marine Ecology Progress Series*, 200, 49-57. <https://doi.org/10.3354/meps200049>
- Müller-Navarra, D. C., Brett, M. T., Park, S., Chandra, S., Ballantyne, A. P., Zorita, E., & Goldman, C. R. (2004). Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. *Nature*, 427(6969), 69-72. <https://doi.org/10.1038/nature02210>
- Nagan, N., & Zoeller, R. A. (2001). Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Progress in lipid research*, 40(3), 199.
- Neves, M. F. J. V., Castro, B. B., Vidal, T., Vieira, R. H. S. D. F., Marques, J. C., Coutinho, J. A. P., & Gonçalves, A. M. M. (2015). Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecological indicators*, 53, 220-230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.01.031>
- Pédrón, N., Le Du, J., Charrier, G., Zambonino-Infante, J.L., Le Bayon, N., Vasconcelos, R.P., Fonseca, V.F., Le Grand, F., Laroche, J. (2017). Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Marine Environmental Research*, 129, 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.06.010>
- Pickova, J., & Mørkøre, T. (2007). Alternate oils in fish feeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(3), 256-263. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600222>
- Piwowar, A., & Harasym, J. (2020). The importance and prospects of the use of algae in agribusiness. *Sustainability*, 12(14), 5669. <https://doi.org/10.3390/su12145669>
- Post, D. M., Layman, C. A., Arrington, D. A., Takimoto, G., Quattrochi, J., & Montana, C. G. (2007). Getting to the fat of the matter: models, methods and assumptions for dealing with lipids in stable isotope analyses. *Oecologia*, 152, 179-189. <https://doi.org/10.1007/s00442-006-0630-x>
- Prato, E., Danieli, A., Maffia, M., & Biandolino, F. (2010). Lipid and fatty acid compositions of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the Mar Grande of Taranto (Southern Italy): feeding strategies and trophic relationships. *Zoological Studies*, 49(2), 211-219.
- Pujol, J. (2015). *Enquête : Pratiques culturelles sur les légumes 2013, Nombre de traitements phytosanitaires, Agreste Les Dossiers*.
- Rajasilta, M., Hänninen, J., Laaksonen, L., Laine, P., Suomela, J. P., Vuorinen, I., & Mäkinen, K. (2019). Influence of environmental conditions, population density, and prey type on the lipid content in Baltic herring (*Clupea harengus membras*) from the northern Baltic Sea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 76(4), 576-585. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2017-0504>
- Ramírez, B., Montero, D., Izquierdo, M., & Haroun, R. (2013). Aquafeed imprint on bogue (*Boops boops*) populations and the value of fatty acids as indicators of aquaculture-ecosystem interaction: Are we using them properly?. *Aquaculture*, 414, 294-302. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.08.010>
- Rao, C. R. (1964). The use and interpretation of principal component analysis in applied research. *Sankhyā: The Indian Journal of Statistics Series A*, 26(4), 329-358.
- Saito, H., & Aono, H. (2014). Characteristics of lipid and fatty acid of marine gastropod *Turbo cornutus*: High levels of arachidonic and n-3 docosapentaenoic acid. *Food Chemistry*, 145, 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.011>

- Sánchez-Muros, M. J., Villacreces, S., Miranda-de la Lama, G., de Haro, C., & García-Barroso, F. (2013). Effects of chemical and handling exposure on fatty acids, oxidative stress and morphological welfare indicators in gilt-head sea bream (*Sparus aurata*). *Fish physiology and biochemistry*, 39, 581-591. <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9721-2>
- Shanab, S. M., Hafez, R. M., & Fouad, A. S. (2018). A review on algae and plants as potential source of arachidonic acid. *Journal of advanced research*, 11, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.004>
- Silva, C. O., Simões, T., Novais, S. C., Pimparel, I., Granada, L., Soares, A. M., Barat, C., & Lemos, M. F. (2017). Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution. *Science of the total environment*, 586, 542-550. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.015>
- Strandberg, U., Taipale, S. J., Hiltunen, M., Galloway, A. W. E., Brett, M. T., & Kankaala, P. (2015). Inferring phytoplankton community composition with a fatty acid mixing model. *Ecosphere*, 6(16).
- Sun, L., Li, J., Zuo, Z., Chen, M., & Wang, C. (2013). Chronic exposure to paclobutrazol causes hepatic steatosis in male rockfish *Sebastes marmoratus* and the mechanism involved. *Aquatic toxicology*, 126, 148-153. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.11.002>
- Svanbäck, R., & Bolnick, D. I. (2007). Intraspecific competition drives increased resource use diversity within a natural population. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1611), 839-844. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.0198>
- Sweeting, C. J., Polunin, N. V. C., & Jennings, S. (2006). Effects of chemical lipid extraction and arithmetic lipid correction on stable isotope ratios of fish tissues. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(4), 595-601. <https://doi.org/10.1002/rcm.2347>
- Taipale, S. J., Vuorio, K., Strandberg, U., Kahilainen, K. K., Järvinen, M., Hiltunen, M., Peltomaa, E., & Kankaala, P. (2016). Lake eutrophication and brownification downgrade availability and transfer of essential fatty acids for human consumption. *Environment International*, 96, 156-166. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.08.018>
- Talbot, C., & Hole, R. (1994). Fish diets and the control of eutrophication resulting from aquaculture. *Journal of Applied Ichthyology*, 10(4), 258-270. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1994.tb00165.x>
- Teichert, N., Lizé, A., Tabouret, H., Roussel, J. M., Bareille, G., Trancart, T., Acou, A., Virag, L.-S., Pécheyran, C., Carpentier, A., & Feunteun, E. (2022). European flounder foraging movements in an estuarine nursery seascape inferred from otolith microchemistry and stable isotopes. *Marine Environmental Research*, 182, 105797. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2022.105797>
- Tetreault, G. R., Kleywegt, S., Marjan, P., Bragg, L., Arlos, M., Fuzzen, M., Smith, B., Moon, T., Massarsky, A., Metcalfe, C., Oakes, K., McMaster, M. E., & Servos, M. R. (2021). Biological responses in fish exposed to municipal wastewater treatment plant effluent in situ. *Water Quality Research Journal*, 56(2), 83-99. <https://doi.org/10.2166/WQRJ.2021.031>
- Van Ginneken, V. J., Helsper, J. P., de Visser, W., van Keulen, H., & Brandenburg, W. A. (2011). Polyunsaturated fatty acids in various macroalgal species from north Atlantic and tropical seas. *Lipids in health and disease*, 10(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-10-104>
- Virtue, P., Mayzaud, P., Albessard, E., & Nichols, P. (2000). Use of fatty acids as dietary indicators in northern krill, *Meganyctiphanes norvegica*, from northeastern Atlantic, Kattegat, and Mediterranean waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(S3), 104-114. <https://doi.org/10.1139/f00-182>
- Wahbeh, M. I., Mahasneh, D. M., & Mahasneh, I. (1985). Concentrations of zinc, manganese, copper, cadmium, magnesium and iron in ten species of algae and sea water from Aqaba, Jordan. *Marine environmental research*, 16(2), 95-102. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90011-X)
- White, C. A., Woodcock, S. H., Bannister, R. J., & Nichols, P. D. (2019). Terrestrial fatty acids as tracers of finfish aquaculture waste in the marine environment. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 133-148. <https://doi.org/10.1111/raq.12230>
- Williams, T. D., Davies, I. M., Wu, H., Diab, A. M., Webster, L., Viant, M. R., Chipman, J. K., Leaver, M. J., George, S. G., Moffat, C. F., & Robinson, C. D. (2014). Molecular responses of European flounder (*Platichthys flesus*) chronically exposed to contaminated estuarine sediments. *Chemosphere*, 108, 152-158. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.01.028>
- Xie, Z., Zhang, X., Xie, Y., Wu, J., & Wu, Y. (2023). Occurrences and potential lipid-disrupting effects of phthalate metabolites in humpback dolphins from the South China Sea. *Journal of Hazardous Materials*, 441, 129939. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129939>
- Zakaria, S. M., & Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Engineering Reviews*, 8, 23-34. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9119-x>
- Závorka, L., Blanco, A., Chaguaceda, F., Cucherousset, J., Killen, S. S., Liénart, C., Mathieu-Resuge, M., Némec, P., Pilecky, M., Scharnweber, K., Twining, C. W., & Kainz, M. J. (2023). The role of vital dietary biomolecules in eco-evo-devo dynamics. *Trends in ecology & evolution*, 38(1), 72-84. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.08.010>
- Závorka, L., Crespel, A., Dawson, N. J., Papatheodoulou, M., Killen, S. S., & Kainz, M. J. (2021). Climate change-induced

- deprivation of dietary essential fatty acids can reduce growth and mitochondrial efficiency of wild juvenile salmon. *Functional Ecology*, 35(9), 1960-1971. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13860>
- Zhang, K., Fu, Q., Ge, F., Jin, X., Guo, R., Qiao, X., Zhao, X., & Zheng, X. (2019). The correlation study between fatty acids and organochlorine pesticides or $\delta^{15}\text{N}$ values in fish tissues from Dongting Lake, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109358. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.041>
- Zhang, X., Yu, R., Xie, Y., Yu, R. Q., & Wu, Y. (2022). Organotins Remain a Serious Threat to the Indo-Pacific Humpback Dolphins in the Pearl River Estuary. *Environmental Science & Technology*, 56(18), 13046-13057. <https://doi.org/10.1021/acs.est.2c02780>

Supplementary data

Table S1. Samples description, geographical metrics and environmental signatures in Guouessant, Guillec, Flèche, Quillimadec, Aber Wrac’h, Douffine and Aven.

Estuaries		GOUESSAN T	GUILLEC	FLÈCHE	QUILLIMADE C	ABER WRAC’H	DOUFFINE	AVEN
Samples description	Collection date	08/10/2020	16/09/2020	30/09/2020	22/09/2020	28/09/2020	29/09/2020	23/09/2020
	Location	48°31'14.4"N 2°37'21.9"W	48°40'15.7"N 4°03'23.2"W	48°37'16.3"N 004°16'15.9"W	48°38'14.2"N 4°23'52.0"W	48°34'23.7"N 4°28'54.8"W	48°15'21.2"N 4°05'45.9"W	47°51'06.9"N 3°44'49.9"W
Geographical Metrics	Catchment area (km ²)	420.2	72.5	73.5	79.2	95.6	173.9	193.7
	Livestock (UGBTA.ha ⁻¹)	284.7	328.9	533.5	361.4	362.2	221.7	187.9
	Agricultural surfaces (% of catchment)	74.9	74.4	77.7	72.2	71.4	59.1	70.3
	Phytosanitary treatment (IFT.catchment ⁻¹)	2.7	3.8	2.5	2.5	2.4	1.8	2.1
	Fish farm (T.year ⁻¹)	0	450	20	50	0	900	430
	Population density (inhab.km ⁻²)	84.3	85.7	45.9	172.4	117.8	31.3	77.8
	Urbanised surfaces (% of catchment)	10.9	18.2	12.9	19.1	18.7	5.6	10.9
	Natural surfaces (% of catchment)	14.2	7.5	9.5	8.7	9.9	35.3	18.8
	Hedges density (m.km ⁻²)	5628	7546	9554	9555	7724	7970	9839
Riparian vegetation (% 100 m river band)	16.6	17.6	16.9	12.9	18.3	33.3	25.4	
Nitrogen concentration s (mg.L⁻¹) in water samples*	NO ₂ ⁻	0.16 ± 0.03 ^(a) (0.11)**	0.14 ± 0.03 ^(a) (0.17)**	0.06 ± 0.01 ^(abc) (0.00029)**	0.07 ± 0.03 ^(abc) (0.14)**	0.05 ± 0.01 ^(bc) (0.06)**	0.12 ± 0.04 ^(ab) (0.08)**	0.03 ± 0.002 ^(c) (0.016)**
	NO ₃ ⁻	21.11 ± 3.55 ^(ad) (25.17)**	50.80 ± 1.51 ^(b) (48.05)**	36.83 ± 2.70 ^(c) (51.19)**	33.75 ± 2.75 ^(ac) (32.09)**	32.81 ± 1.76 ^(acd) (19.23)**	12.00 ± 0.91 ^(d) (18.52)**	24.00 ± 1.51 ^(acd) (25.00)**
	NH ₄ ⁺	0.15 ± 0.03 ^(ab)	0.4 ± 0.09 ^(a)	0.06 ± 0.01 ^(bcd)	0.09 ± 0.02 ^(abc)	0.07 ± 0.02 ^(cd)	0.1 ± 0.03 ^(abc)	0.03 ± 0.01 ^(d)
Organic pollutants concentration s (ng.g⁻¹ d.w.) in sediment	PAHs	117.1 ± 5.4 ^(a)	105.1 ± 67.7 ^(a)	300.5 ± 102.7 ^(ab)	488.5 ± 39.9 ^(ab)	273.7 ± 42.6 ^(ab)	535.9 ± 161.6 ^(ab)	1481.6 ± 268.9 ^(b)
	PCBs	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL	<DL
Organic pollutants concentration s (ng.g⁻¹ d.w.) in fish tissue	PCBs	3.97 ± 1.2 ^(a)	0.67 ± 0.7 ^(a)	11.57 ± 0.5 ^(abc)	22.77 ± 4.4 ^(bc)	4.30 ± 1.2 ^(ab)	27.70 ± 0.2 ^(c)	22.13 ± 4.6 ^(c)
Trace elements concentration s (µg.g⁻¹ d.w.) in sediment	Arsenic	4.26 ± 0.37 ^(a)	8.41 ± 0.16 ^(ac)	4.14 ± 0.66 ^(a)	9.19 ± 0.73 ^(ab)	27.43 ± 3.42 ^(b)	14.26 ± 0.44 ^(bc)	13.08 ± 0.65 ^(bc)
	Cadmium	0.11 ± 0.01 ^(a)	0.58 ± 0.01 ^(bc)	0.15 ± 0.02 ^(ab)	0.32 ± 0.03 ^(abd)	0.29 ± 0.06 ^(abd)	2.18 ± 0.3 ^(c)	0.87 ± 0.03 ^(cd)
	Copper	5.92 ± 0.55 ^(ab)	7.02 ± 0.08 ^(abd)	2.66 ± 0.47 ^(a)	7.45 ± 0.54 ^(abd)	13.79 ± 2.14 ^(bc)	69.2 ± 13.33 ^(c)	25.43 ± 1.25 ^(cd)
	Lead	9.83 ± 0.95 ^(ad)	11.62 ± 0.29 ^(ab)	5.5 ± 0.53 ^(a)	11.52 ± 0.56 ^(ab)	34.7 ± 5.59 ^(bc)	261.7 ± 56.9 ^(c)	31.65 ± 0.94 ^(bcd)
	Zinc	23.49 ± 2.27 ^(ab)	69.59 ± 1.52 ^(ac)	16.19 ± 2.7 ^(b)	47.71 ± 3.28 ^(abd)	60.16 ± 8.56 ^(abc)	326.1 ± 51.47 ^(c)	110.9 ± 5.71 ^(cd)
Trace elements concentration s (µg.g⁻¹ d.w.) in fish muscle	Arsenic	1.72 ± 0.38 ^(ac)	2.16 ± 0.24 ^(a)	0.39 ± 0.01 ^(b)	2.83 ± 0.33 ^(a)	3.12 ± 0.51 ^(a)	0.8 ± 0.09 ^(bc)	6.02 ± 0.32 ^(d)
	Cadmium	0.001 ± 0.0002 ^(ace)	0.003 ± 0.0002 ^(bd)	0.004 ± 0.0004 ^(be)	0.001 ± 0.0001 ^(a)	0.002 ± 0.0003 ^(cd)	0.003 ± 0.001 ^(bd)	0.001 ± 0.0002 ^(e)
	Copper	1.06 ± 0.08 ^(a)	1.07 ± 0.04 ^(a)	0.93 ± 0.15 ^(b)	0.96 ± 0.05 ^(ab)	0.96 ± 0.07 ^(ab)	1.03 ± 0.05 ^(a)	0.81 ± 0.04 ^(b)
	Lead	0.03 ± 0.02 ^(ab)	0.02 ± 0.005 ^(ab)	0.01 ± 0.01 ^(a)	0.02 ± 0.003 ^(bc)	0.02 ± 0.003 ^(bcd)	0.05 ± 0.01 ^(c)	0.01 ± 0.001 ^(ad)
	Zinc	44.46 ± 9.79 ^(a)	33.56 ± 3.09 ^(a)	27.91 ± 0.98 ^(a)	28.43 ± 3.18 ^(ab)	34.31 ± 4.18 ^(a)	32.26 ± 2.90 ^(a)	21.87 ± 1.46 ^(b)

* Data provided by the Regional Directorate for the Environment, Development and Housing (DREAL) of Rennes for 2019 water samples, excepted for Aven (2016).

** Additional values in brackets correspond to nitrites and nitrates concentrations measured the sampling day in 2020.

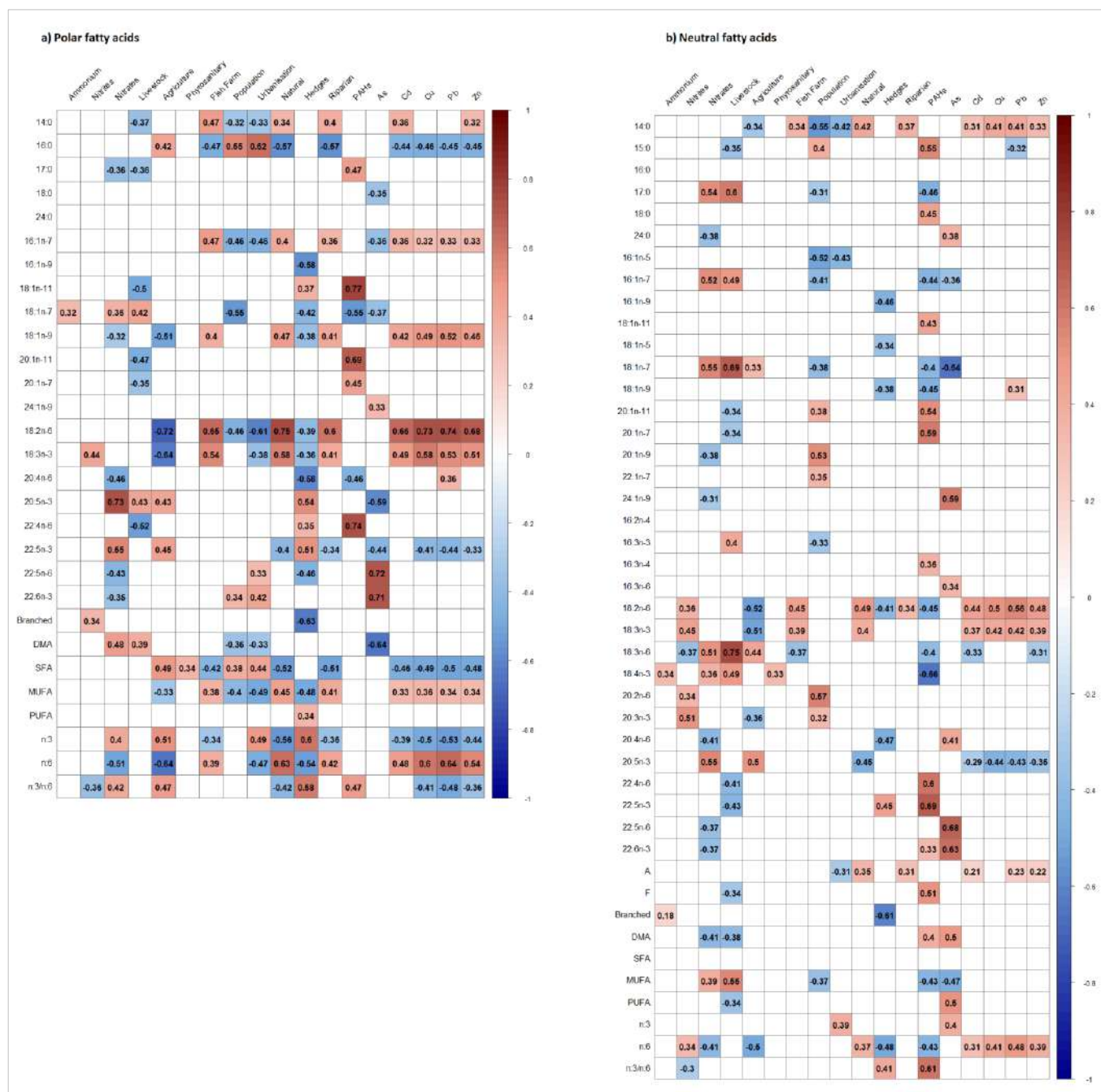


Figure S1. Correlations between geographic metrics, chemical measures, metals in sediments and fatty acids in *P. flesus* muscle (Spearman's test). a) Polar fatty acids. b) Neutral fatty acids. Coloured boxes represent significant correlations between two tracers (p-value < 0.05). The numbers inside cells are the associated Spearman's correlation (r_s).

5. Références

- Ajeeshkumar, K. K., Vishnu, K. V., Kumari, K. R., Navaneethan, R., Asha, K. K., Ganesan, B., Niladri, S. C., Anandan, R. & Mathew, S. (2015). Biochemical composition and heavy metal content of selected marine fish from the Gulf of Mannar, India. *Fishery Technology*, 53, 164-169. <http://epubs.icar.org.in/ejournal/index.php/FT>
- Alfaro, A. C., Thomas, F., Sergent, L., & Duxbury, M. (2006). Identification of trophic interactions within an estuarine food web (northern New Zealand) using fatty acid biomarkers and stable isotopes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 70(1-2), 271-286. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2006.06.017>
- Amirkolaie, A. K. (2011). Reduction in the environmental impact of waste discharged by fish farms through feed and feeding. *Reviews in Aquaculture*, 3(1), 19-26. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2010.01040.x>
- Bernier-Graveline, A., Lesage, V., Cabrol, J., Lair, S., Michaud, R., Rosabal, M., & Verreault, J. (2021). Lipid metabolites as indicators of body condition in highly contaminant-exposed belugas from the endangered St. Lawrence Estuary population (Canada). *Environmental Research*, 192, 110272. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110272>
- Chiffolleau, J.-F. (2017). La contamination chimique sur le littoral Loire-Bretagne. Résultats de 35 années de suivi du Réseau d'Observation de la Contamination Chimique. RST.RBE-BE/2017.02. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00405/51617/>
- Chinyama, A., Snyman, J., Ochieng, G. M., & Nhapi, I. (2016). Occurrence of cyanobacteria genera in the Vaal Dam: implications for potable water production. *Water SA*, 42(3), 415-420. <https://hdl.handle.net/10520/EJC193852>
- De Carvalho, C. C., & Caramujo, M. J. (2018). The various roles of fatty acids. *Molecules*, 23(10), 2583. <https://doi.org/10.3390/molecules23102583>
- Fernandez-Jover, D., Martinez-Rubio, L., Sanchez-Jerez, P., Bayle-Sempere, J. T., Jimenez, J. A. L., Lopez, F. J. M., Bjørn, P. A., Uglem, I. & Dempster, T. (2011). Waste feed from coastal fish farms: a trophic subsidy with compositional side-effects for wild gadoids. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 91(4), 559-568. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2010.12.009>
- Filimonova, V., Goncalves, F., Marques, J. C., De Troch, M., & Goncalves, A. M. (2016). Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: a review. *Ecological indicators*, 67, 657-672. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.044>
- Gonçalves, A. M. M., Azeiteiro, U. M., Pardal, M. A., & De Troch, M. (2012). Fatty acid profiling reveals seasonal and spatial shifts in zooplankton diet in a temperate estuary. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 109, 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.05.020>
- Gonçalves, A. M., Rocha, C. P., Marques, J. C., & Gonçalves, F. J. (2021). Fatty acids as suitable biomarkers to assess pesticide impacts in freshwater biological scales—A review. *Ecological Indicators*, 122, 107299. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.107299>
- Greger, M., Malm, T., & Kautsky, L. (2007). Heavy metal transfer from composted macroalgae to crops. *European Journal of Agronomy*, 26(3), 257-265. <https://doi.org/10.1016/j.eja.2006.10.003>
- Hanna, V. S., & Hafez, E. A. A. (2018). Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. *Journal of advanced research*, 11, 23-32. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.005>
- Iverson, S. J. (2009). Tracing aquatic food webs using fatty acids: from qualitative indicators to quantitative determination. *Lipids in aquatic ecosystems*, 281-308, Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2_12
- Jeffreys, R. M., Wolff, G. A., & Murty, S. J. (2009). The trophic ecology of key megafaunal species at the Pakistan Margin: evidence from stable isotopes and lipid biomarkers. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 56(10), 1816-1833. <https://doi.org/10.1016/j.dsr.2009.05.001>
- Johnson, G. B., Raven, P. H., Masson, K. A., Losos, J. B., & Singer, S. R. (2011). Biologie-Version luxe. France: De Boeck Supérieur, 53-57.
- Kainz, M. J., & Fisk, A. T. (2009). Integrating lipids and contaminants in aquatic ecology and ecotoxicology. *Lipids in aquatic ecosystems*, 93-114. https://doi.org/10.1007/978-0-387-89366-2_5
- Kerambrun, E., Henry, F., Cornille, V., Courcot, L., & Amara, R. (2013). A combined measurement of metal bioaccumulation and condition indices in juvenile European flounder, *Platichthys flesus*, from European estuaries. *Chemosphere*, 91, 498-505. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.010>

- Keva, O., Tang, P., Käkälä, R., Hayden, B., Taipale, S. J., Harrod, C., & Kahilainen, K. K. (2019). Seasonal changes in European whitefish muscle and invertebrate prey fatty acid composition in a subarctic lake. *Freshwater Biology*, 64(11), 1908-1920. <https://doi.org/10.1111/fwb.13381>
- Laurent, J., Le Grand, F., Bideau, A., Le Berre, I., S., Le Floch, S., Pichereau, V., Laroche, J. (2024c). Fatty acids in European flounder muscle: promising tools to assess the impact of eutrophication on estuarine health. (En préparation)
- Le Croizier, G., Schaal, G., Gallon, R., Fall, M., Le Grand, F., Munaron, J. M., Rouget, M.-L., Machu, E., Le Loc'h, F., Laë, R., & De Morais, L. T. (2016). Trophic ecology influence on metal bioaccumulation in marine fish: Inference from stable isotope and fatty acid analyses. *Science of the Total Environment*, 573, 83-95. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.035>
- Liu, F., Xie, Q., Yu, R. Q., Xie, Z., Wu, J., Zhang, X., & Wu, Y. (2023). Fatty acids as bioindicators of organohalogen exposure in marine fish from a highly polluted estuary: First insight into small-scale regional differences. *Journal of Hazardous Materials*, 452, 131337. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131337>
- Müller-Navarra, D. C., Brett, M. T., Park, S., Chandra, S., Ballantyne, A. P., Zorita, E., & Goldman, C. R. (2004). Unsaturated fatty acid content in seston and tropho-dynamic coupling in lakes. *Nature*, 427(6969), 69-72. <https://doi.org/10.1038/nature02210>
- Nagan, N., & Zoeller, R. A. (2001). Plasmalogens: biosynthesis and functions. *Progress in lipid research*, 40(3), 199.
- Neves, M. F. J. V., Castro, B. B., Vidal, T., Vieira, R. H. S. D. F., Marques, J. C., Coutinho, J. A. P., & Gonçalves, A. M. M. (2015). Biochemical and populational responses of an aquatic bioindicator species, *Daphnia longispina*, to a commercial formulation of a herbicide (Primextra® Gold TZ) and its active ingredient (S-metolachlor). *Ecological indicators*, 53, 220-230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.01.031>
- Olivares-Rubio, H. F., & Vega-López, A. (2016). Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. *Environmental Pollution*, 218, 297-312. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.005>
- Parrish, C. C. (2013). Lipids in marine ecosystems. *International Scholarly Research Notices*, 2013. <https://doi.org/10.5402/2013/604045>
- Pickova, J., & Mørkøre, T. (2007). Alternate oils in fish feeds. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(3), 256-263. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600222>
- Piwowar, A., & Harasym, J. (2020). The importance and prospects of the use of algae in agribusiness. *Sustainability*, 12(14), 5669. <https://doi.org/10.3390/su12145669>
- Prato, E., Danieli, A., Maffia, M., & Biandolino, F. (2010). Lipid and fatty acid compositions of *Mytilus galloprovincialis* cultured in the Mar Grande of Taranto (Southern Italy): feeding strategies and trophic relationships. *Zoological Studies*, 49(2), 211-219.
- Saito, H., & Aono, H. (2014). Characteristics of lipid and fatty acid of marine gastropod *Turbo cornutus*: High levels of arachidonic and n-3 docosapentaenoic acid. *Food Chemistry*, 145, 135-144. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.08.011>
- Silva, C. O., Simões, T., Novais, S. C., Pimparel, I., Granada, L., Soares, A. M., Barat, C., & Lemos, M. F. (2017). Fatty acid profile of the sea snail *Gibbula umbilicalis* as a biomarker for coastal metal pollution. *Science of the total environment*, 586, 542-550. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.015>
- Rossi, S., Sabatés, A., Latasa, M., & Reyes, E. (2006). Lipid biomarkers and trophic linkages between phytoplankton, zooplankton and anchovy (*Engraulis encrasicolus*) larvae in the NW Mediterranean. *Journal of Plankton Research*, 28(6), 551-562. <https://doi.org/10.1093/plankt/fbi140>
- Shan, Q., Li, H., Chen, N., Qu, F., & Guo, J. (2020). Understanding the multiple effects of PCBs on lipid metabolism. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity*, 13, 3691-3702. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S264851>
- Shanab, S. M., Hafez, R. M., & Fouad, A. S. (2018). A review on algae and plants as potential source of arachidonic acid. *Journal of advanced research*, 11, 3-13. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2018.03.004>
- Strandberg, U., Taipale, S. J., Hiltunen, M., Galloway, A. W. E., Brett, M. T., & Kankaala, P. (2015). Inferring phytoplankton community composition with a fatty acid mixing model. *Ecosphere*, 6(16).
- Taipale, S. J., Vuorio, K., Strandberg, U., Kahilainen, K. K., Järvinen, M., Hiltunen, M., Peltomaa, E., & Kankaala, P. (2016). Lake eutrophication and brownification downgrade availability and transfer of essential fatty acids for human consumption. *Environment International*, 96, 156-166. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.08.018>

- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in fisheries science*, 11(2), 107-184. <https://doi.org/10.1080/713610925>
- Wahbeh, M. I., Mahasneh, D. M., & Mahasneh, I. (1985). Concentrations of zinc, manganese, copper, cadmium, magnesium and iron in ten species of algae and sea water from Aqaba, Jordan. *Marine environmental research*, 16(2), 95-102. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(85\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0141-1136(85)90011-X)
- White, C. A., Woodcock, S. H., Bannister, R. J., & Nichols, P. D. (2019). Terrestrial fatty acids as tracers of finfish aquaculture waste in the marine environment. *Reviews in Aquaculture*, 11(1), 133-148. <https://doi.org/10.1111/raq.12230>
- Zakaria, S. M., & Kamal, S. M. M. (2016). Subcritical water extraction of bioactive compounds from plants and algae: Applications in pharmaceutical and food ingredients. *Food Engineering Reviews*, 8, 23-34. <https://doi.org/10.1007/s12393-015-9119-x>
- Závorka, L., Blanco, A., Chaguaceda, F., Cucherousset, J., Killen, S. S., Liénart, C., Mathieu-Resuge, M., Němec, P., Pilecky, M., Scharnweber, K., Twining, C. W., & Kainz, M. J. (2023). The role of vital dietary biomolecules in eco-evo-devo dynamics. *Trends in ecology & evolution*, 38(1), 72-84. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2022.08.010>
- Závorka, L., Crespel, A., Dawson, N. J., Papatheodoulou, M., Killen, S. S., & Kainz, M. J. (2021). Climate change-induced deprivation of dietary essential fatty acids can reduce growth and mitochondrial efficiency of wild juvenile salmon. *Functional Ecology*, 35(9), 1960-1971. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13860>
- Zhao, H., & Lappalainen, P. (2012). A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein–lipid interactions. *Molecular biology of the cell*, 23(15), 2823-2830. <https://doi.org/10.1091/mbc.e11-07-0645>
- Zhang, K., Fu, Q., Ge, F., Jin, X., Guo, R., Qiao, X., Zhao, X., & Zheng, X. (2019). The correlation study between fatty acids and organochlorine pesticides or $\delta^{15}\text{N}$ values in fish tissues from Dongting Lake, China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 182, 109358. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.041>

**DISCUSSION GENERALE
&
PERSPECTIVES**

1. Discussion générale

1.1. Pertinence et limites de l'approche multi-biomarqueurs sur le Flet adulte en Seine

L'approche de **biosurveillance passive** menée sur des flets capturés dans l'estuaire de Seine a permis d'établir un diagnostic de la qualité écologique de cet hydrosystème.

La comparaison des populations de Flet adultes *in natura* de Seine vs Canche par des biomarqueurs classiques en écotoxicologie (activité EROD, cassures à l'ADN, activité AChE, perturbations endocriniennes, histopathologie) indique une **diminution** globale du **stress chimique** en Seine ces vingt dernières années (Seine-Aval HQ Fish). En effet, le niveau de contamination chimique semble décroître sur cette période dans l'estuaire de Seine (Azimi & Rocher, 2016 ; Romero *et al.*, 2016).

Néanmoins, la pollution en Seine reste toujours marquée pour les **contaminants** dits "**historiques**", et plus particulièrement les HAPs, les PCBs et les métaux.

Cependant, notre étude n'a pas pris en compte une multitude d'autres polluants, et notamment les **contaminants émergents** (Taheran *et al.*, 2018). En effet, plusieurs travaux ont mis en évidence une pollution significative de la Seine par certains composés **organo-halogénés**, comme les substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS) et les isomères de l'hexabromocyclododécane (HBCDD), qui contaminent notamment la macrofaune benthique et les juvéniles de Sole (Pulster *et al.*, 2022 ; Labadie *et al.*, 2021). L'estuaire de Seine est aussi contaminé par divers **produits pharmaceutiques** (Tamtam *et al.*, 2008 ; Togola & Budzinski, 2007), car les systèmes conventionnels de traitement des eaux usées ne sont pas conçus pour éliminer totalement les composés pharmaceutiques présents dans les rejets domestiques (Sandre *et al.*, 2023 ; Chiffre *et al.*, 2016). Enfin, la Seine apparaît aussi caractérisée par une contamination importante de l'eau, des sédiments et du biote, par les **microplastiques** (Gaspéri *et al.*, 2021), également considérés comme des contaminants émergents (Wagner & Lambert, 2018).

De plus, la biosurveillance passive menée sur les flets adultes en période hivernale et estivale a mis en évidence un impact significatif du **changement climatique** sur les populations de poissons en Seine et en Canche. En effet, les hivers plus doux observés ces dernières années modifient la phénologie de la **reproduction** du Flet en Manche. Ces importants changements pourraient avoir des répercussions non négligeables sur le recrutement des juvéniles au sein des estuaires et sur la dynamique des populations de Flet.

Plusieurs études ont identifié des modifications dans la phénologie de la reproduction des poissons, avec des conséquences potentielles sur les populations et sur l'écosystème aquatique dans son ensemble (Inouye, 2022 ; Woods *et al.*, 2022 ; Peer & Miller, 2014). Des températures plus élevées peuvent entraîner un décalage dans la ponte et ainsi altérer la synchronisation entre les ressources alimentaires disponibles dans le milieu marin (plancton) et l'arrivée des larves et petits juvéniles. De plus, l'augmentation de la température de l'eau peut aussi impacter significativement la survie des œufs et des larves. De ce fait, il est essentiel de prendre en compte l'impact du changement climatique dans les futures études sur l'état écologique de l'estuaire de Seine.

1.2. Apports des outils moléculaires –omiques sur le Flet pour la biosurveillance en Seine et dans les petits estuaires bretons

Protéomique et caging : biosurveillance active en Seine lors d'une pollution accidentelle

Le **couplage engagement** de flets juvéniles - **protéomique hépatique** de ces poissons confirme la pertinence de la biosurveillance active, précédemment exploré par Borcier *et al.* (2019), pour évaluer la qualité de l'eau estuarienne à micro-échelle.

Suite à l'incendie de "Lubrizon" et "NORMANDIE-Logistique", les analyses chimiques des polluants organiques et métalliques menées dans l'estuaire en aval de Rouen n'ont révélé **aucune contamination chimique majeure**, à l'exception du Bassin au Bois où les eaux d'extinction contaminées ont été retenues pour limiter la pollution en Seine (Fisson *et al.*, 2020).

De plus, le rapport de Fisson *et al.* (2020) n'a révélé qu'un **impact très limité** de cet incendie sur le **biote** estuarien. Ainsi, les crevettes blanches mises en cage dans l'estuaire à Rouen n'ont pas présenté de réponse significative suite à l'incendie.

Par contre, notre méthodologie **caging - protéomique**, déployée un mois après l'incendie et maintenue pendant 15 et 30 jours, a permis d'identifier un impact probable de la contamination des eaux sur les flets juvéniles, suite à l'incendie. Nous avons ainsi mis en évidence une **perturbation du métabolisme du cholestérol** dans le foie, associée à une augmentation concomitante des lipides de réserve dans le muscle du poisson.

Nous avons suggéré, à partir des données acquises dans la principale station d'épuration de la ville de Rouen, qu'une **pollution diffuse** par les **dioxines** et les **furanes**, avait vraisemblablement contaminé les eaux de la Seine. Ces deux familles de molécules sont issues de la combustion des produits chimiques industriels lors de l'incendie. Ces substances ont été libérées dans l'atmosphère sous forme de panaches de fumée, puis déposées au sol et lessivées par les eaux de lavage et les pluies. Les eaux de ruissellement ont abouti à la **contamination** des eaux de l'estuaire de la Seine, puis ont été transférées aux proies des flets encagés.

Au final, le couplage caging des juvéniles de flet – protéomique shotgun s'est avéré particulièrement pertinent pour évaluer la qualité écologique du milieu estuarien à **micro-échelle**, suite à la **pollution accidentelle** de la Seine.

Protéomique et transcriptomique : biosurveillance passive dans les petits estuaires bretons

Avant le développement des techniques -omiques, l'analyse du **génome** et du **protéome** se limitait à des méthodes telles que l'électrophorèse, la RT q-PCR ou les tests ELISA (Tom & Auslander, 2005). Ces méthodes étaient efficaces pour des analyses ciblées à petite échelle, mais elles étaient limitées dans la capacité à analyser de vastes quantités de données de manière exhaustive.

Les **outils moléculaires** de type -omiques modernes ont révolutionné ces analyses en permettant une exploration globale et détaillée du génome et du protéome sans *a priori*, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour la recherche en écotoxicologie et en écologie du stress (Ebner, 2021).

Les **approches -omiques** nous ont permis de séquencer le génome et le protéome complet du Flet. De plus, grâce à cette méthode, nous avons pu établir un **inventaire** détaillé de **gènes** et de **protéines**, ce qui nous a permis d'explorer les **réponses** des poissons face au **multistress**.

Ainsi, les approches moléculaires, et plus particulièrement la **protéomique shotgun**, ont été d'une grande pertinence (1) pour identifier les différents stressseurs interagissant dans les estuaires bretons et (2) pour produire un premier bilan sur leur état écologique.

Cependant, il est important de relever que les analyses du **protéome hépatique** des flets capturés dans l'Aven ont mis en évidence des **différences** très significatives dans les quantités de protéines estimées pour plusieurs marqueurs moléculaires, d'une année à l'autre. En effet, la comparaison du protéome des flets **Aven 2018 vs Aven 2020** a montré plus de protéines dérégulées que lors de la comparaison du protéome Aven 2020 (estuaire considéré comme système de référence) vs Gouessant 2020 (estuaire lourdement impacté par le multistress).

Cette importante variabilité temporelle dans les réponses moléculaires, pour le même hydrosystème, pourrait être influencée par les **variations hydroclimatiques** d'une année à l'autre, affectant significativement les signatures protéomiques du poisson.

Cependant, les marqueurs non moléculaires (signatures environnementales et signatures phénotypiques sur le flet) mesurés en 2018 et en 2020 varient faiblement, suggérant que l'Aven est un **système de référence a priori relativement stable** dans le temps. Néanmoins, il est très possible que certains éléments importants de la variabilité hydroclimatique de l'Aven n'aient pas été pris en compte lors de notre caractérisation de cet hydrosystème.

Il est également probable que cette variabilité temporelle intra-estuaire dans les signatures moléculaires soit davantage associée à des **problèmes techniques** liés à la technologie -omique en elle-même, tels que des différences dans les méthodes de collecte et d'analyse des échantillons, ou encore des différences dans les réglages des appareils d'une année à l'autre.

Ces observations soulignent un aspect crucial de la recherche en écologie du stress dans cette approche multi-estuaires : la **variabilité temporelle**. En effet, si l'on souhaite comparer différents systèmes ou évaluer l'impact du multistress sur les populations de poissons au cours du temps, il est impératif de tenir compte de ces variations environnementales interannuelles. De plus, le changement climatique risque d'accentuer davantage ces fluctuations hydroclimatiques, ce qui pourrait compliquer les comparaisons entre les années. De ce fait, lors d'une approche multi-estuaires, il est essentiel de réaliser l'ensemble des **échantillonnages** sur la **même année** pour obtenir des résultats écologiquement pertinents.

1.3. Intérêt de l'approche multi-estuariennes et multidisciplinaire pour le diagnostic écologique des petits estuaires bretons

Les **approches multidisciplinaires** et **multi-estuariennes** dans le domaine de l'écologie du stress permettent d'acquérir des **connaissances** approfondies et **holistiques** sur les écosystèmes (Sarkis *et al.*, 2020). Néanmoins, il s'agit d'une méthodologie exigeante en terme de quantité de données à acquérir, et donc encore peu mise en œuvre sur les bassins versants à l'échelle à laquelle nous l'avons développée en Bretagne, soit en considérant un ensemble de onze fleuves côtiers.

L'**approche intégrative** a pris en compte : la géographie des bassins versants, l'hydrobiologie, la chimie des polluants dans les sédiments et les poissons, et enfin les réponses biologiques du Flet en combinant biomarqueurs et analyses -omiques. Cette méthode s'est révélée très efficace pour établir un premier **diagnostic** sur la nature des **stresseurs** et sur la **qualité écologique** des fleuves côtiers bretons, des hydrosystèmes encore très peu étudiés.

De manière générale, les petits estuaires subissent relativement peu d'altérations directes de leurs habitats (perte de vasières intertidales, chenalisation, endiguement, dragage, barrage...) relativement aux grands systèmes (Seine, Loire ou Gironde). Les principaux **stresseurs** dans ces petits estuaires sont principalement liés à une altération de la qualité de l'eau induite par une **anthropisation** plus ou moins marquée **des bassins versants**.

De plus, les **analyses lipidiques** réalisées sur le muscle de flet ont mis en évidence l'importance des profils en **acides gras** comme **bio-indicateurs** de l'état de santé des systèmes estuariens. L'analyse des **acides gras neutres et polaires** permet une compréhension plus nuancée de l'écologie et de la physiologie des poissons dans le contexte de l'**écologie du stress**.

Dans notre étude sur les acides gras du Flet, les analyses ont été effectuées sur le **muscle**, or le **foie** et le cerveau pourraient être des organes plus pertinents pour produire du diagnostic écologique. Notons que dans nos travaux le foie de poisson a été destiné aux analyses de protéomique, la masse du foie d'un flet juvénile (≈ 20 mg) n'étant pas suffisante pour mener à bien les analyses lipidiques au niveau individuel.

Un autre défi réside dans le choix d'un **système de référence**. En effet, l'identification d'un estuaire « de référence », *i.e.* présentant un faible niveau d'eutrophisation et de contamination chimique par les micropolluants est parfois très difficile, en raison de la multiplicité des actions anthropiques présentes sur l'ensemble de l'hydrosystème, du bassin versant à l'estuaire. Le problème est rendu particulièrement complexe par le manque de données historiques sur l'état de santé des petits systèmes, encore très peu étudiés au niveau national.

Pour ce faire, il est donc impératif de collecter un maximum de **données environnementales** afin de sélectionner le système de référence le plus approprié, en veillant à ce que tous les hydrosystèmes retenus s'inscrivent dans le même **contexte hydroclimatique régional**.

Toutefois, nos travaux révèlent qu'en intégrant les données de géographie, d'hydrobiologie, de chimie des polluants, ainsi que les réponses phénotypiques du poisson, les risques de prendre une décision erronée concernant le système de référence sont *a priori* faibles.

2. Perspectives

2.1. Perspectives pour la biosurveillance passive et active en Seine

Développement de biomarqueurs d'exposition à des contaminants émergents chez le Flet

Aux vues de la multitude de **contaminants émergents** présents en Seine, il serait pertinent de mettre en place et de développer de **nouveaux biomarqueurs** chez le Flet, afin d'appréhender l'ensemble des stressseurs d'origine chimique.

Les connaissances actuelles sur les réponses des poissons aux **PFAS** sont encore insuffisantes et nécessitent donc des recherches plus approfondies. Les réponses antioxydantes semblent être un biomarqueur pertinent des PFAS, telles que la **peroxydation lipidique** déterminée par la quantification du malondialdéhyde (MDA) ou le test de **capacité antioxydante totale** (TAC) qui mesure la capacité d'un échantillon à neutraliser les radicaux libres et à lutter contre le stress oxydatif (Piva *et al.*, 2022 ; Wielsøe *et al.*, 2015).

De la même manière, les **produits pharmaceutiques** et leur impact sur la qualité environnementale dans les milieux aquatiques sont encore peu connus. Des biomarqueurs, tels que les mesures d'activités enzymatiques ou les changements histologiques, peuvent être mis en œuvre pour évaluer l'exposition des poissons aux médicaments (Gallego-Ríos *et al.*, 2021), mais ce sont des marqueurs d'exposition aux xénobiotiques en général.

Le dosage des **métabolites** des produits pharmaceutiques dans le foie, le muscle ou les branchies des poissons par chromatographie liquide à dilution isotopique, en tandem avec la spectrométrie de masse, permettrait de détecter une exposition à la caféine, aux antibiotiques ou encore aux antidépresseurs (Gallego-Ríos *et al.*, 2021 ; Ondarza *et al.*, 2019).

Les **microplastiques** sont également de plus en plus abondants dans les environnements aquatiques, il est par conséquent nécessaire de les prendre en compte dans de futures recherches. En outre, les microplastiques représentent un risque en raison de leur ingestion et de leur impact sur le comportement alimentaire, mais aussi par rapport à leur capacité à adsorber des polluants pouvant entraîner des perturbations sur la physiologie et la reproduction des poissons (Hollerová *et al.*, 2021 ; Wang *et al.*, 2020). De ce fait, les poissons exposés aux microplastiques répondent aux mêmes biomarqueurs classiques d'exposition à des xénobiotiques, tels que les activités enzymatiques ou le stress oxydatif (Capó *et al.*, 2022).

Le moyen le plus efficace de mettre en évidence une contamination aux microplastiques est de **quantifier l'ingestion** par les poissons. Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour révéler la présence de microplastiques (Li *et al.*, 2018 ; Silva *et al.*, 2018), telles que la digestion enzymatique (Capó *et al.*, 2022), la chromatographie en phase gazeuse par pyrolyse couplée à la spectrométrie de masse (Nuelle *et al.*, 2014 ; Fries *et al.*, 2013), la spectroscopie de Raman (Zhao *et al.*, 2017 ; Wiesheu *et al.*, 2016), la spectroscopie à infrarouge transformée de Fourier (Qiu *et al.*, 2016 ; Besseling *et al.*, 2015), la chromatographie liquide (Elert *et al.*, 2017 ; Hintersteiner *et al.*, 2015) et les méthodes de marquage (Shim *et al.*, 2016). Chaque méthode a ses avantages et ses limites, et le choix dépendra des besoins spécifiques de l'étude.

Enfin, il serait très pertinent de maintenir les explorations sur les **outils moléculaires** (transcriptomique et/ou protéomique) en **biosurveillance passive**, pour suivre dans les décennies à venir l'évolution des réponses des poissons face aux cocktails polluants. En effet, la nature de ces mélanges est

vraisemblablement en évolution rapide dans les grands estuaires. Les approches -omiques pourraient ainsi identifier de nouveaux **gènes** ou des **protéines candidates** impliqués dans la réponse des organismes face aux polluants émergents dans les grands estuaires.

Méthodologie pour évaluer la capacité de résistance des flets juvéniles face au changement climatique en estuaire de Seine

Plusieurs études ont démontré que les individus vivant dans des **systèmes lourdement contaminés** peuvent présenter une **tolérance** au **stress thermique** plus **faible** que les organismes issus d'environnements peu pollués. Une première exploration en ce sens a été menée sur le Flet en Seine (Lavergne *et al.*, 2015). Cette étude a détecté une **perte de fitness** chez des flets juvéniles de Seine vs de Vilaine (moins stressés), les deux lots de poissons ayant été soumis simultanément à un stress thermique durant un mois, dans le cadre d'une expérience de jardin commun.

Le développement d'un nouveau protocole de **jardin commun** sur le Flet permettrait d'approfondir nos connaissances sur l'impact du **multistress** (chimique et thermique) sur les poissons estuariens. Des flets juvéniles, prélevés dans trois estuaires présentant des niveaux de contamination chronique contrastés, pourraient être acclimatés au laboratoire, puis soumis à différents régimes thermiques sur une période longue de 4 mois, correspondant au séjour estival des flets juvéniles 0+ dans la partie oligohaline-mésohaline des estuaires. A la fin de l'expérience, les poissons seront sacrifiés et les dérégulations physiologiques mesurées par biomarqueurs et par protéomique shotgun seront comparées pour identifier les populations les plus sensibles au changement climatique.

Par ailleurs, des études menées en laboratoire ont démontré les effets de l'augmentation de la température de l'eau sur la physiologie des poissons, suggérant que des **températures plus élevées** imposent une **charge physiologique** qui peut compromettre la capacité des poissons à gérer d'autres facteurs de stress, altérant ainsi leur condition physique (Alfonso *et al.*, 2021).

Amélioration du protocole de caging en cas de pollution accidentelle

L'expérimentation de caging mise en place en Seine suite à l'incendie de "Lubrizon" et "NORMANDIE-Logistique" s'est avérée très efficace et révélatrice de l'impact de l'accident sur les populations de Flet. Cependant, nous pouvons faire plusieurs suggestions pour **améliorer** la conception et la mise en œuvre d'une future expérimentation de **caging** lors d'une **pollution accidentelle** en estuaire.

Tout d'abord, il faudrait réagir plus rapidement suite à une pollution accidentelle et déployer les cages en moins d'**une semaine après** les déversements.

De plus, il serait pertinent de maintenir les flets en cage pendant une période d'au moins **deux mois**, avec des prélèvements à quinze, trente, et soixante jours, pour connaître l'impact de la pollution à plus **long terme**. D'autant plus que nous avons réglé le problème d'alimentation des flets engagés, observé dans Borcier *et al.* (2019), grâce à des naissains d'huîtres qui attirent les gammares dont se nourrissent les Flets.

Il serait également intéressant de placer des cages plus **en aval** du site de pollution afin de déterminer l'impact de la diffusion de la pollution le long du cours d'eau.

2.2. Perspectives pour la biosurveillance passive sur les petits estuaires

La **protéomique haut débit** s'est révélée très efficace pour identifier des protéines dérégulées chez le flet soumis au multistress dans les fleuves côtiers bretons. Cependant, la protéomique ciblée MRM (Multiple Reaction Monitoring) (Espeyte *et al.*, 2019) permettrait d'optimiser nos approches moléculaires *in situ* en Bretagne.

La **protéomique ciblée MRM** est une technique de spectrométrie de masse utilisée pour quantifier spécifiquement des protéines dans des échantillons biologiques. Plutôt que de rechercher un grand nombre de protéines de manière non ciblée, la MRM se concentre sur un ensemble de **protéines d'intérêt préalablement identifiées** et sélectionnées par la protéomique shotgun sans *a priori*.

La protéomique MRM est utilisée pour quantifier des **peptides biomarqueurs** de manière absolue. Cette analyse est réalisée à l'aide d'un spectromètre de masse équipé d'une source d'ionisation et d'un analyseur de masse (Figure 34). Les transitions spécifiques des réactions ions-molécules sont alors surveillées pour chaque **peptide cible**, ce qui permet de les quantifier précisément. Cette méthode offre une grande **sensibilité** et **spécificité**, permettant la quantification précise des protéines dans les échantillons, même à des niveaux très faibles.

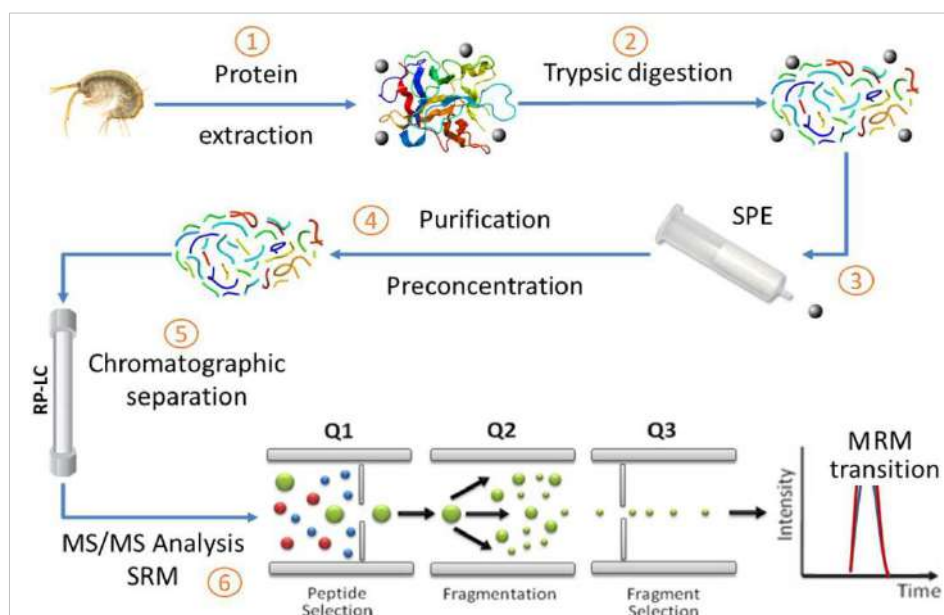


Figure 34. Schéma représentant l'identification de peptides biomarqueurs par protéomique MRM.

Les protéines sont (1) extraites et dosées, (2) digérées à la trypsine pour récupérer les peptides. Ensuite, (3) les peptides sont purifiés par extraction en phase solide (SPE), (4) concentrés par évaporation, (5) séparés par chromatographie et (6) analysés en MRM par le spectromètre de masse en tandem.

© Espeyte *et al.* (2019).

La **protéomique ciblée MRM** est couramment utilisée en recherche biomédicale pour étudier des voies de signalisation cellulaire et des protéines impliquées dans des maladies.

Dans notre cas, la protéomique ciblée MRM nous permettrait d'identifier et de quantifier de manière absolue des **peptides rapporteurs de protéines d'intérêt**, et ainsi de valider définitivement les méthodes -omiques *in situ*.

En outre, il est essentiel de **diversifier nos méthodologies** en explorant des approches plus classiques en ce qui concerne la quantification des protéines. Cela inclut l'utilisation d'approches immunologiques, telles que les tests ELISA, qui a déjà fait ses preuves dans l'étude de la VTG, ou encore les dosages enzymatiques, comme le test EROD pour les CYP450. Les techniques de qPCR, ou des méthodes, équivalentes pourraient également nous permettre d'évaluer l'expression de gènes spécifiques.

Toutes ces approches pourraient être **adaptées** pour répondre aux particularités des **métabolismes** que nous avons **identifiés** au cours de nos études, notamment le cycle de l'urée, le métabolisme des stéroïdes, ou encore la réponse à l'hypoxie. Leur intégration dans nos travaux pourrait significativement améliorer notre capacité à évaluer l'impact du multistress.

En dernier lieu, il est indispensable de souligner l'importance de la **transcriptomique** et du **RNAseq**, qui constituent une avancée majeure qui a considérablement enrichi nos connaissances sur le génome de cette espèce. Toutes ces données génomiques constituent de nouvelles perspectives de recherche et d'exploration en écologie du stress.

2.3. Approfondissement de l'approche multidisciplinaire intégrative dans les petits estuaires

Propositions pour améliorer l'identification des stressors dans les petits hydrosystèmes

Il est impératif d'approfondir notre compréhension du fonctionnement des hydrosystèmes, afin d'augmenter l'efficacité de l'**approche intégrative** développée sur les fleuves côtiers bretons.

Lors de notre étude sur les petits hydrosystèmes, nous avons effectué des **mesures ponctuelles** de différents **paramètres hydrobiologiques** dans la partie amont de chaque estuaire, à marée basse, le jour du prélèvement des poissons.

Ainsi, nous avons mesuré ponctuellement dans les eaux de chaque estuaire la température, l'oxygène dissous, la salinité, les nitrites et nitrates. Ces données doivent être considérées avec précaution, car les eaux de transition où vivent les flets juvéniles sont caractérisées par une **hyper-variabilité temporelle** des conditions hydrobiologiques. Nos mesures ponctuelles reflètent donc probablement assez mal la tendance hydrobiologique du point d'échantillonnage, au cours de la saison estivale.

En complément, nous avons donc examiné les **données hydrobiologiques** fournies par la **DREAL** pour les hydrosystèmes étudiés, pour élargir notre perception sur les paramètres hydrobiologiques propres à chaque estuaire. Notons que les stations de mesures ne se trouvaient pas toujours à proximité de nos sites d'étude, ce qui ne permettait pas toujours d'obtenir des données précises pour la zone de capture du poisson.

La pose de **sondes *in situ*** dans les estuaires permettrait d'améliorer notre suivi et de **surveiller en temps réel** la température et l'oxygène dissous dans les estuaires, offrant ainsi une image plus complète des régimes thermiques et de la qualité de l'eau. Toutefois, pour garantir la fiabilité des données, il serait recommandé de positionner ces sondes *in situ* un à trois mois avant les prélèvements de poissons.

De plus, nous suggérons de doser dans l'eau les **phosphates** parallèlement aux nitrites et nitrates, pour développer un indicateur complémentaire sur l'état d'eutrophisation des petits hydrosystèmes (Correll, 1998).

De plus, aux cours de nos travaux, nous avons observé pour certains systèmes estuariens une augmentation parfois rapide de la **turbidité** des eaux, même lors d'épisodes pluvieux modérés. Par ailleurs, les témoignages des riverains de zones estuariennes relatent tous une augmentation générale de la turbidité des eaux en saison hivernale, sur l'ensemble de la Bretagne.

La turbidité, principalement induite par les particules en suspension, est surtout liée à l'**érosion des sols**, aggravée par l'agriculture intensive, les sols nus en hiver et la dégradation du bocage et de la ripisylve (Woodward & Foster, 1997).

Ainsi, le suivi de la turbidité dans l'eau estuarienne pourrait être un moyen efficace d'évaluer le risque d'érosion des sols dans les hydrosystèmes (Sader, 2017). Rappelons par ailleurs qu'une turbidité de l'eau élevée affecte la vie aquatique, en diminuant notamment la photosynthèse des végétaux aquatiques, et donc en réduisant les capacités d'épuration des estuaires vis-à-vis des nutriments de type azote et phosphore.

Le **suivi des polluants** dans l'eau des estuaires est difficile à mettre en place, de par l'extrême diversité des molécules présentes, les différentes formes chimiques de ces molécules dans des conditions de salinité variables, les fluctuations de la présence de ces polluants liées à la pluviométrie, et les besoins de surveillance à long terme. La **chimie analytique ciblée** est efficace pour analyser de nombreux polluants organiques dans les eaux, mais elle est très coûteuse pour des suivis en routine.

La mise en place d'**Echantillonneurs Intégratifs Passifs** (EIP) dans la partie amont des petits estuaires bretons nous paraît la plus envisageable. En effet, les EIP offrent une **solution économique**, permettant de collecter des données sur une gamme variée de polluants de manière continue, réduisant ainsi les coûts et améliorant l'efficacité de la **surveillance environnementale** (Roll & Halden, 2016).

Propositions pour la mise en place d'une étude bi-taxa dans les fleuves côtiers bretons

Les **études multi-taxa** peuvent être très efficaces pour la classification des masses d'eau, notamment de transition. En effet, plusieurs modèles biologiques utilisés en biosurveillance ont permis d'intégrer différents modes d'exposition et d'action des contaminants (Xuereb *et al.*, 2023 ; Duarte *et al.*, 2017).

Dans le contexte des fleuves côtiers bretons, une **comparaison des réponses du Flet** en tant que modèle intra-estuarien vs l'**Huître creuse** (*Crassostrea gigas*) à l'embouchure des estuaires pourrait être pertinente.

Cette approche consisterait à introduire des huîtres issues d'un même lot d'ostréiculture dans tous les estuaires étudiés, et de les stocker en poches sur des tables ostréicoles, quatre mois avant les prélèvements de flets (réalisés à la mi-septembre). Le sacrifice et les prélèvements sur flets et huîtres seraient menés en parallèle. L'objectif serait de mettre en vis-à-vis les signatures biologiques du flet vs différents marqueurs de fitness sur les huîtres. Au final, cette démarche permettrait

d'établir des liens entre le **statut écologique** de l'estuaire, déterminé par l'approche intégrée (de la géographie du bassin versant à la réponse du Flet), et la capacité de l'estuaire à fournir un **habitat propice à la conchyliculture**, un enjeu de première importance en Bretagne.

Proposition pour étendre l'approche intégrée à des hydrosystèmes de tailles intermédiaires

Les onze fleuves côtiers bretons étudiés présentent des surfaces de bassin versant comprises entre 70 et 400 km². Il pourrait être pertinent d'appliquer l'approche intégrée développée dans nos travaux à des **hydrosystèmes de taille intermédiaire** (de 500 à 1 200 km²), dans d'autres régions françaises.

Cette démarche permettrait d'**éprouver notre méthode** sur une échelle spatiale plus large, tout en conservant une complexité environnementale plus gérable que dans les grands estuaires de la façade Atlantique (Seine, Vilaine, Loire ou Gironde). Cette transition vers des estuaires de taille intermédiaire permettrait ainsi de démontrer la **polyvalence** ou les **limites** de notre approche intégrative.

2.4. Développement d'une analyse statistique multivariée sur l'ensemble du jeu de données

Nous prévoyons de réaliser une **analyse multivariée** approfondie sur notre jeu de données couvrant les **onze hydrosystèmes bretons**, afin d'extraire les marqueurs clés de notre approche intégrative.

Notre jeu de données inclut un large éventail de variables : 13 variables de **géographie** basées sur les données SIG explorant les différentes formes de l'anthropisation dans les bassins versants, 4 variables d'**hydrobiologie** sur une période de vingt ans, 20 variables de **chimie** liées à la contamination, toutes les variables issues des données de **biologie ciblée** sur le Flet, et enfin tous les **gènes** et **protéines** dérégulés obtenus **sans a priori** par les outils moléculaires.

En outre, étant donné que les **acides gras** se sont révélés être des marqueurs très pertinents pour identifier les réponses du poisson dans les **estuaires eutrophisés**, ils seront aussi intégrés aux données de **biologie ciblée** et donc à l'analyse multivariée.

Cette analyse multivariée nous permettra d'identifier de manière statistique les signatures environnementales les plus pertinentes pour estimer la **qualité écologique** des **systèmes estuariens** en région Bretagne. Elle permettra aussi de sélectionner les **gènes** et/ou **protéines candidats** en liaison forte avec les différents stressseurs dans les fleuves côtiers, parmi les milliers de gènes et protéines identifiés par la biologie moléculaire.

Les **signatures environnementales** et les **marqueurs moléculaires** retenus seront la base de nouveaux **outils de diagnostic** pour le monitoring de l'état de santé des écosystèmes estuariens.

2.5. Développement de l'approche protéomique dans le cadre d'une contamination expérimentale du Flet par un cocktail de pesticides

Dans le cadre de cette thèse, les recherches menées sur la qualité écologique des onze petits estuaires bretons ont clairement mis en évidence une **contamination chronique** aux **pesticides**.

Ces études ont également révélé que l'hydrosystème de l'**Horn** est le plus **contaminé** aux **produits phytosanitaires**. En effet, les métriques géographiques ont mis en évidence dans ce bassin versant une forte pression agricole due à la culture maraîchère consommatrice d'une grande diversité de pesticides tout au long de l'année. En outre les réponses moléculaires des poissons de l'Horn se traduisent notamment par une forte mobilisation des mécanismes de détoxification des xénobiotiques, en réponse à la présence de **pesticides dans l'eau**.

De plus, le **réseau "CORPEP"**, un outil développé par la DREAL de Rennes pour suivre les niveaux de contamination des eaux superficielles bretonnes par les résidus de produits phytosanitaires (Figure 35), semble confirmer que l'Horn est l'un des systèmes les plus impactés par les pesticides en région Bretagne.

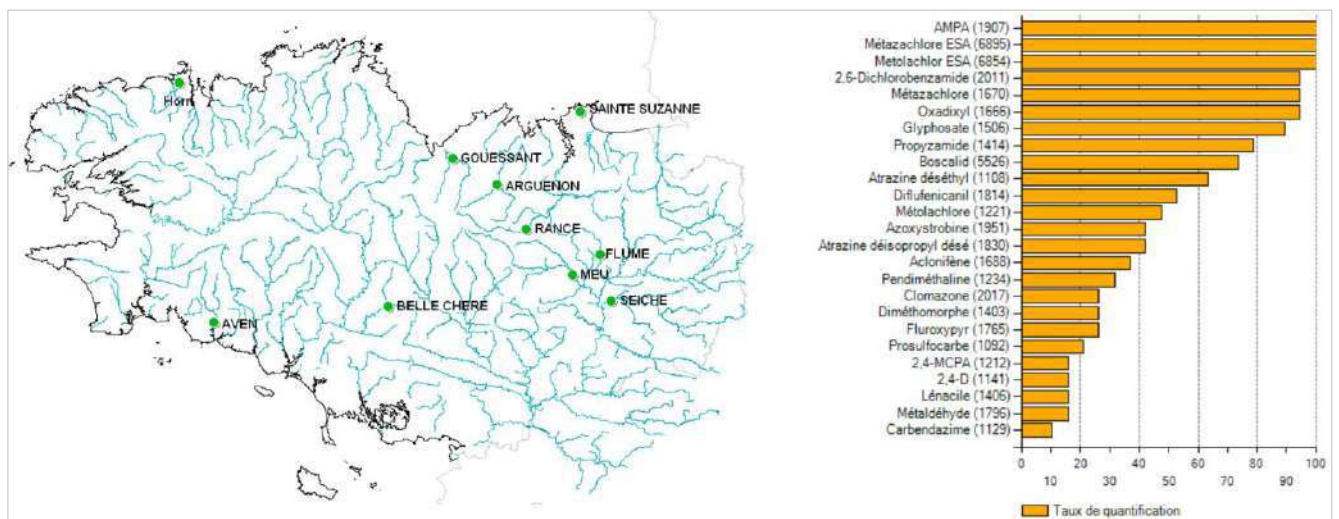


Figure 35. Présentation du Réseau CORPEP en Bretagne.

Pesticides les plus fréquents détectés dans l'eau à la Station CORPEP de l'Horn à Saint Pol de Léon, en 2019.

© Yves-Marie Heno, DREAL Bretagne

Nous avons mené au CEDRE une expérimentation sur le flet afin d'étudier les **réponses** du poisson suite à une exposition à un **cocktail de pesticides**.

Au travers de cette approche, nous ciblons (1) les dérégulations moléculaires identifiées par la **protéomique**, (2) la **réponse immunitaire**, et plus particulièrement les activités de phagocytose et du complément, et enfin (3) le **métabolisme énergétique**, en mesurant l'activité mitochondriale.

Aux vues des concentrations mesurées dans l'Horn (Saint Pol) par le Réseau CORPEP, nous avons exposé les flets juvéniles à un cocktail de pesticides composé d'**AMPA**, de **Métazachlore ESA**, de **Métolachlore ESA** et de **Glyphosate** (Figure 32).

Des flets juvéniles ont été capturés début octobre 2022 dans l'estuaire du Goyen, un petit fleuve côtier peu anthropisé, situé dans le sud du Finistère près d'Audierne.

L'expérimentation a été **menée aux CEDRE**, dans des installations et des conditions conformes à la réglementation. Les flets juvéniles ont été acclimatés deux semaines au laboratoire, avant d'être placés dans des bassins pour être exposés pendant un mois à deux concentrations de pesticides (5 et 15 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), par baignation. Tout au long de l'exposition, les individus ont été nourris à satiété (Figure 36).

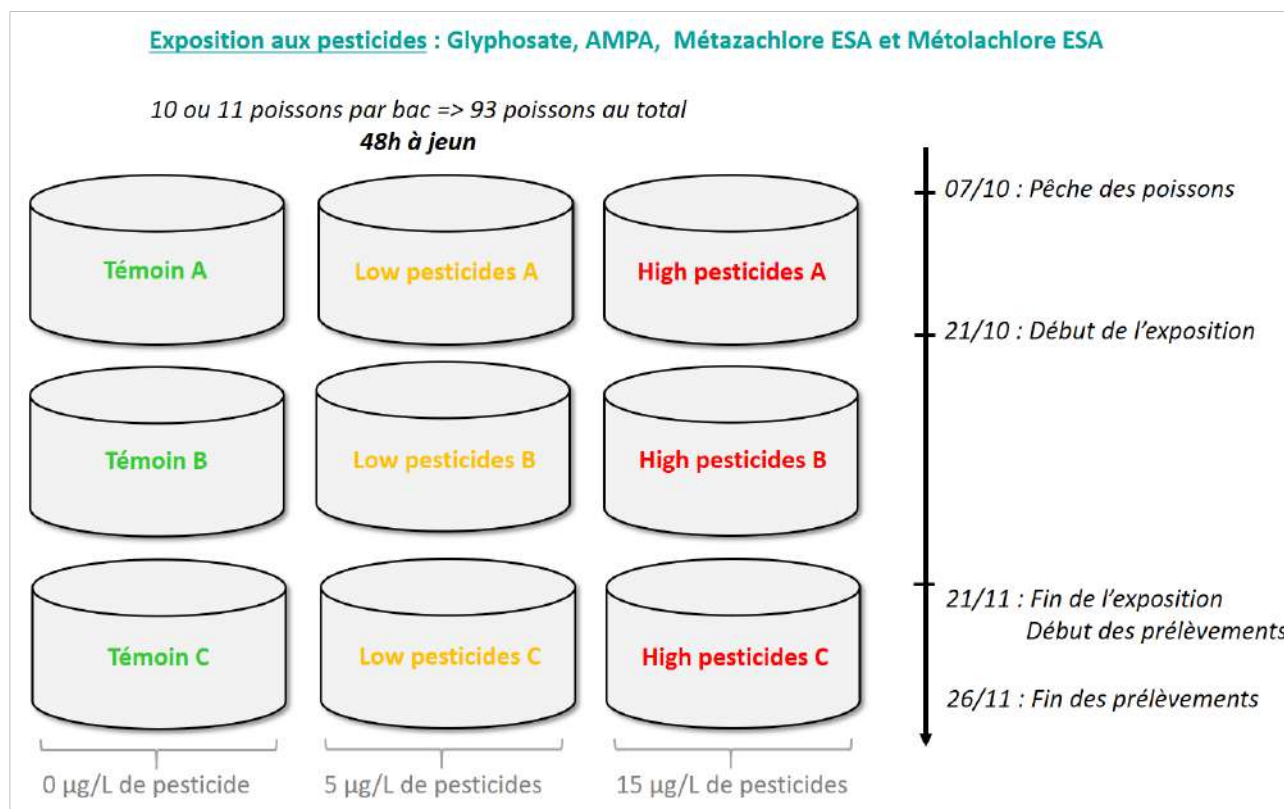


Figure 36. Schéma représentant le design de l'expérimentation animale menée en 2022 au CEDRE et le plan de prélèvements des échantillons. © Jennifer Laurent

Les résultats n'ont pas encore été traités ni analysés, mais ces données permettront de mieux appréhender les réponses des poissons face à un mélange de pesticides, en faisant **abstraction des autres stressés** communément identifiés *in natura*.

L'objet de cette expérimentation est aussi d'identifier potentiellement de **nouveaux acteurs moléculaires** impliqués dans la réponse du poisson à un **cocktail de pesticides** typiquement utilisé en Bretagne. Ces marqueurs moléculaires pourraient d'ailleurs être intégrés dans un futur programme de **biosurveillance** des hydrosystèmes en région Bretagne.

3. Conclusion

Ce travail de recherche a mis en évidence les relations entre l'**anthropisation** des bassins versants, la **qualité de l'eau**, la présence de **polluants** dans les sédiments et les poissons, et enfin les **dérégulations moléculaires** et **physiologiques** chez le Flet, une espèce sentinelle de la qualité des systèmes estuariens.

Ainsi, l'**approche intégrative** développée dans cette étude a fourni des informations précieuses pour le diagnostic de l'**état écologique** des **estuaires** et la compréhension des effets du multistress sur le poisson. Nous pensons que cette méthodologie peut contribuer de manière significative à la **conservation** et à la **gestion** efficace des hydrosystèmes.

C'est la raison pour laquelle nous avons travaillé en **collaboration** étroite avec les **gestionnaires de l'eau** et les **syndicats mixtes**, porteurs des SAGE et responsables des différents bassins versants retenus en Bretagne. En effet, ces **acteurs locaux** ont une connaissance fine de l'occupation des sols des systèmes dont ils ont la gestion. De ce fait, leur expertise nous est très précieuse pour mieux appréhender les **dynamiques environnementales** spécifiques à chaque bassin versant et les **stresseurs** qui interagissent *in fine* sur l'exutoire du bassin versant, l'estuaire.

De plus, cette collaboration nous a permis de **mutualiser les connaissances** sur les hydrosystèmes et de tirer parti de ces données locales pour mieux interpréter nos résultats intégrant la géographie, l'hydrobiologie, la chimie et la biologie.

L'objectif final de cette collaboration est maintenant de s'inscrire pleinement à l'**interface** entre Science et Société, en sélectionnant parmi nos métriques les **outils de diagnostic** les plus pertinents pour **évaluer** et **surveiller** l'état de santé des écosystèmes estuariens.

Notons que les opérations de **restauration** entreprises sur les **bassins versants** telles que la remise en état des zones humides, de la ripisylve et du bocage, doivent être suivies pour évaluer leur efficacité. Ainsi, fournir aux gestionnaires des bassins versants des outils de suivi permettra de mesurer l'impact de ces opérations sur la qualité environnementale et si nécessaire d'**ajuster leurs stratégies**.

Au final, cette collaboration entre scientifiques et porteurs des SAGE doit apporter une contribution significative (1) à la mise en place d'**outils novateurs et intégrateurs** pour caractériser l'exposition des organismes aquatiques aux stresseurs et (2) à la production de **marqueurs robustes de l'environnement** soutenant l'aide à la décision pour les gestionnaires des hydrosystèmes.

4. Références

- Alfonso, S., Gesto, M., & Sadoul, B. (2021). Temperature increase and its effects on fish stress physiology in the context of global warming. *Journal of Fish Biology*, 98(6), 1496-1508. <https://doi.org/10.1111/jfb.14599>
- Azimi, S., & Rocher, V. (2016). Influence of the water quality improvement on fish population in the Seine River (Paris, France) over the 1990–2013 period. *Science of the total environment*, 542, 955-964. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.094>
- Besseling, E., Foekema, E. M., Van Franeker, J. A., Leopold, M. F., Kühn, S., Rebolledo, E. B., Heße, E., Mielke, L., IJzer, J., Kamminga, P. & Koelmans, A. A. (2015). Microplastic in a macro filter feeder: humpback whale *Megaptera novaeangliae*. *Marine pollution bulletin*, 95(1), 248-252. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.04.007>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.133760>
- Cameron, P., Berg, J., & Von Westernhagen, H. (1996). Biological effects monitoring of the North Sea employing fish embryological data. *Environmental monitoring and assessment*, 40, 107-124. <https://doi.org/10.1007/BF00414385>
- Cameron, P., Berg, J., Dethlefsen, V., & Von Westernhagen, H. (1992). Developmental defects in pelagic embryos of several flatfish species in the southern North Sea. *Netherlands Journal of Sea Research*, 29(1-3), 239-256. [https://doi.org/10.1016/0077-7579\(92\)90024-9](https://doi.org/10.1016/0077-7579(92)90024-9)
- Capó, X., Morató, M., Alomar, C., Rios-Fuster, B., Valls, M., Compa, M., & Deudero, S. (2022). A Biomarker Approach as Responses of Bioindicator Commercial Fish Species to Microplastic Ingestion: Assessing Tissue and Biochemical Relationships. *Biology*, 11(11), 1634. <https://doi.org/10.3390/biology11111634>
- Chiffre, A., Degiorgi, F., Buleté, A., Spinner, L., & Badot, P. M. (2016). Occurrence of pharmaceuticals in WWTP effluents and their impact in a karstic rural catchment of Eastern France. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 25427-25441. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7751-5>
- Correll, D. L. (1998). The role of phosphorus in the eutrophication of receiving waters: A review. *Journal of environmental quality*, 27(2), 261-266. <https://doi.org/10.2134/jeq1998.00472425002700020004x>
- Duarte, I. A., Reis-Santos, P., França, S., Cabral, H., & Fonseca, V. F. (2017). Biomarker responses to environmental contamination in estuaries: A comparative multi-taxa approach. *Aquatic Toxicology*, 189, 31-41. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.05.010>
- Ebner, J. N. (2021). Trends in the application of “omics” to ecotoxicology and stress ecology. *Genes*, 12(10), 1481. <https://doi.org/10.3390/genes12101481>
- Elert, A. M., Becker, R., Duemichen, E., Eisentraut, P., Falkenhagen, J., Sturm, H., & Braun, U. (2017). Comparison of different methods for MP detection: what can we learn from them, and why asking the right question before measurements matters?. *Environmental Pollution*, 231, 1256-1264. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.08.074>
- Espeyte, A., Degli-Esposti, D., Faugère, J., Aycirieux, S., Salvador, A., Geffard, O., & Chaumot, A. (2019). Protéomique ciblée pour la quantification multiplexée de biomarqueurs: perspectives pour la surveillance environnementale. INRAE RiverLy. 2023. <https://hal.inrae.fr/hal-04138910>
- Fisson, C., Aït-Aïssa, S., & Amara, R. (2020). Incendie du 26 septembre 2019 des installations «Lubrizol/NL-Logistique»: Quel impact sur la Seine. *Rapport d'étude réalisé par le GIP Seine-Aval*.
- Fries, E., Dekiff, J. H., Willmeyer, J., Nuelle, M. T., Ebert, M., & Remy, D. (2013). Identification of polymer types and additives in marine microplastic particles using pyrolysis-GC/MS and scanning electron microscopy. *Environmental science: processes & impacts*, 15(10), 1949-1956. <https://doi.org/10.1039/C3EM00214D>
- Gallego-Ríos, S. E., Peñuela, G. A., & Martínez-López, E. (2021). Updating the use of biochemical biomarkers in fish for the evaluation of alterations produced by pharmaceutical products. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 88, 103756. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2021.103756>
- Gaspéri, J., Cachot, J., Alligant, S., Amara, R., Begout, M.L., Bialais, C., Bruneau, M., Chatel, A., Clérandeau, C., Coulaud, R., Cousin, X., Dreanno, C., Dris, R., Dufлот, Dutertre, M.L., El Rakwe, M., Gangnery, A., Halm-Lemeille, M.P., Kazour, M., Le Bihanic, F., Maheux, F., Mazeas, F., Métais, I., Misurale, F., Morin, B., Motus, T., Mouloud, M.,

- Mouneyrac, C., Pannetier, P., Pedriat, Perrein-Ettajani, H., Prado, E., Revel, M., Simon, B., Souissi, S., Tardivel, M., Tassin, B., Thery, J., Vignet, C., & Xuereb, B. (2021). Projet Plastic-Seine : Flux et impacts des microplastiques dans l'estuaire de la Seine. *Rapport de recherche du programme Seine-Aval 6*.
- Hintersteiner, I., Himmelsbach, M., & Buchberger, W. W. (2015). Characterization and quantitation of polyolefin microplastics in personal-care products using high-temperature gel-permeation chromatography. *Analytical and bioanalytical chemistry*, *407*, 1253-1259. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8318-2>
- Hollerová, A., Hodkovicová, N., Blahová, J., Faldyna, M., Maršálek, P., & Svobodová, Z. (2021). Microplastics as a potential risk for aquatic environment organisms—a review. *Biomarkers*, *26*(1), 13-25. <https://doi.org/10.1080/1354750X.2020.1863470>
- Inouye, D. W. (2022). Climate change and phenology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Climate Change*, *13*(3), e764. <https://doi.org/10.1002/wcc.764>
- Labadie, P., Aminot, Y., Budzinski, H., Champagnat, J., Chouquet, B., Couteau, J., Douchet, L., Duhamel, S., Gallien, M., Grasso, F., Lecomte, J. B., Le Pape, O., Lobry, J., Loizeau, V., Mounier, F., Munsch, C., Martin, N., & Rivot, E. (2021). Projet CHOPIN : Contaminants organoHalogénés histORIques et d'intérêt émergent : Présence et transfert vers la sole commune – Impact de la contamination sur la Nourricerie et conséquences sur la population. *Rapport de recherche du programme Seine-Aval 6*.
- Lavergne, E., Pedron, N., Calves, I., Claireaux, G., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Le Bayon, N., Cahu, C. & Laroche, J. (2015). Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance?. *Marine Pollution Bulletin*, *95*(2), 658-664. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.01.006>
- Li, J., Liu, H., & Chen, J. P. (2018). Microplastics in freshwater systems: A review on occurrence, environmental effects, and methods for microplastics detection. *Water research*, *137*, 362-374. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.12.056>
- Nuelle, M. T., Dekiff, J. H., Remy, D., & Fries, E. (2014). A new analytical approach for monitoring microplastics in marine sediments. *Environmental pollution*, *184*, 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.027>
- Ondarza, P. M., Haddad, S. P., Avigliano, E., Miglioranza, K. S., & Brooks, B. W. (2019). Pharmaceuticals, illicit drugs and their metabolites in fish from Argentina: implications for protected areas influenced by urbanization. *Science of the total Environment*, *649*, 1029-1037. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.383>
- Peer, A. C., & Miller, T. J. (2014). Climate change, migration phenology, and fisheries management interact with unanticipated consequences. *North American Journal of Fisheries Management*, *34*(1), 94-110. <https://doi.org/10.1080/02755947.2013.847877>
- Piva, E., Schumann, S., Dotteschini, S., Brocca, G., Radaelli, G., Marion, A., Irato, P., Bertotto, D. & Santovito, G. (2022). Antioxidant responses induced by PFAS exposure in freshwater fish in the Veneto Region. *Antioxidants*, *11*(6), 1115. <https://doi.org/10.3390/antiox11061115>
- Pulster, E. L., Rullo, K., Gilbert, S., Ash, T. M., Goetting, B., Campbell, K., Markham, S., & Murawski, S. A. (2022). Assessing per-and polyfluoroalkyl substances (PFAS) in sediments and fishes in a large, urbanized estuary and the potential human health implications. *Frontiers in Marine Science*, *9*, 1046667. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.1046667>
- Qiu, Q., Tan, Z., Wang, J., Peng, J., Li, M., & Zhan, Z. (2016). Extraction, enumeration and identification methods for monitoring microplastics in the environment. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, *176*, 102-109. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.04.012>
- Roll, I. B., & Halden, R. U. (2016). Critical review of factors governing data quality of integrative samplers employed in environmental water monitoring. *Water research*, *94*, 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.048>
- Romero, E., Le Gendre, R., Garnier, J., Billen, G., Fisson, C., Silvestre, M., & Riou, P. (2016). Long-term water quality in the lower Seine: Lessons learned over 4 decades of monitoring. *Environmental Science & Policy*, *58*, 141-154. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2016.01.016>
- Sader, M. (2017). Turbidity measurement: A simple, effective indicator of water quality change. *OTT Hydromet*. Retrieved from <http://www.ott.com/en-us/products/download/turbidity-white-paper>.
- Sahin, T., Gunes, A., Aydin, I., & Polat, M. (2008). Reproductive characteristics and egg development in flounder (*Pleuronectes flesus luscus*) in the southern Black Sea.
- Sandre, F., Huynh, N., Caupos, E., El-Mrabet, L., Partibane, C., Lachaise, I., Pommier, C., Rivard, M., Morin, C., Moilleron, R., Le Roux, J., & Garrigue-Antar, L. (2023). Occurrence and fate of an emerging drug pollutant and its by-products during

- conventional and advanced wastewater treatment: Case study of furosemide. *Chemosphere*, 322, 138212. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138212>
- Sarkis, N., Geffard, O., Souchon, Y., Chandesris, A., Ferréol, M., Valette, L., Alric, B., François, A., Piffady, J., Chaumot, A., & Villeneuve, B. (2020). How to quantify the links between bioavailable contamination in watercourses and pressures of anthropogenic land cover, contamination sources and hydromorphology at multiple scales?. *Science of The Total Environment*, 735, 139492. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139492>
- Shim, W. J., Song, Y. K., Hong, S. H., & Jang, M. (2016). Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. *Marine pollution bulletin*, 113(1-2), 469-476. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.049>
- Silva, A. B., Bastos, A. S., Justino, C. I., da Costa, J. P., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A. (2018). Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry-A review. *Analytica chimica acta*, 1017, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.043>
- Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S. K., Verma, M., & Surampalli, R. Y. (2018). Emerging contaminants: here today, there tomorrow!. *Environmental nanotechnology, monitoring & management*, 10, 122-126. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.010>
- Tamtam, F., Mercier, F., Le Bot, B., Eurin, J., Dinh, Q. T., Clément, M., & Chevreuil, M. (2008). Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions. *Science of the total environment*, 393(1), 84-95. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.12.009>
- Togola, A., & Budzinski, H. (2007). Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 388(3), 627-635. <https://doi.org/10.1007/s00216-007-1251-x>
- Tom, M., & Auslander, M. (2005). Transcript and protein environmental biomarkers in fish—a review. *Chemosphere*, 59(2), 155-162. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.10.063>
- Syafrudin, M., Kristanti, R. A., Yuniarto, A., Hadibarata, T., Rhee, J., Al-Onazi, W. A., Algarni, T. S., Almarri, A. H. & Al-Mohaimed, A. M. (2021). Pesticides in drinking water—a review. *International journal of environmental research and public health*, 18(2), 468. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020468>
- Wagner, M., & Lambert, S. (2018). Freshwater microplastics: emerging environmental contaminants?. *Springer Nature*.
- Walsh, B. S., Parratt, S. R., Hoffmann, A. A., Atkinson, D., Snook, R. R., Bretman, A., & Price, T. A. (2019). The impact of climate change on fertility. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(3), 249-259. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2018.12.002>
- Wang, W., Ge, J., & Yu, X. (2020). Bioavailability and toxicity of microplastics to fish species: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 189, 109913. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109913>
- Wielsøe, M., Long, M., Ghisari, M., & Bonefeld-Jørgensen, E. C. (2015). Perfluoroalkylated substances (PFAS) affect oxidative stress biomarkers in vitro. *Chemosphere*, 129, 239-245. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.10.014>
- Wiesheu, A. C., Anger, P. M., Baumann, T., Niessner, R., & Ivleva, N. P. (2016). Raman microspectroscopic analysis of fibers in beverages. *Analytical Methods*, 8(28), 5722-5725. <https://doi.org/10.1039/C6AY01184E>
- Woods, T., Kaz, A., & Giam, X. (2022). Phenology in freshwaters: A review and recommendations for future research. *Ecography*, 2022(6), e05564. <https://doi.org/10.1111/ecog.05564>
- Woodward, J., & Foster, I. A. N. (1997). Erosion and suspended sediment transfer in river catchments: environmental controls, processes and problems. *Geography*, 353-376. <https://www.jstor.org/stable/40572952>
- Xuereb, B., Fisson, C., Geffard, A., Amara, R., Auffret, M., Bado-Nilles, A., Bonnard, M., Bonneville-Normand, M., Chaumot, A., Costil, K., Geffard, O., Le Foll, F., Palos-Ladeiro M. (2023). Projet BIOSURVEILLANCE : Proposition d'un pilote basé sur l'utilisation de biomarqueurs pour un appui à la surveillance de la qualité des masses d'eau du district Seine-Normandie. *Rapport de recherche du programme Seine-Aval 6 et de la Zone Atelier Seine*, 49p.
- Zhao, S., Danley, M., Ward, J. E., Li, D., & Mincer, T. J. (2017). An approach for extraction, characterization and quantitation of microplastic in natural marine snow using Raman microscopy. *Analytical methods*, 9(9), 1470-1478. <https://doi.org/10.1039/C6AY02302A>

*« L'avenir n'est pas ce qui va arriver,
mais ce que nous allons faire »*

de Henri Bergson

Titre : Ecologie du stress & qualité écologique de l'estuaire de Seine et des fleuves côtiers bretons : signatures environnementales et moléculaires chez une espèce sentinelle, le Flet (*Platichthys flesus*)

Mots clés : Estuaires, Qualité de l'eau, Utilisation des sols, Pollution, Outils moléculaires - omiques, *Platichthys flesus*

Résumé :

Les différentes approches menées au cours de cette thèse, sur les réponses des populations de flet face au multistress dans des environnements contrastés, ont permis d'évaluer la qualité écologique des estuaires de grande et de petite tailles.

La biosurveillance passive menée en Seine a mis en évidence des indicateurs de contamination, notamment des atteintes au niveau hépatique, une augmentation de la neurotoxicité, ainsi qu'une possible altération du métabolisme des lipides. Nous avons également observé un impact du changement climatique sur la phénologie de la reproduction du flet. En parallèle, la biosurveillance active menée en Seine, suite à la pollution accidentelle induite par l'incendie de Lubrizol et de NORMANDIE-Logistique, a mis en avant la pertinence de l'encagement du flet couplé à la protéomique shotgun. Les résultats du caging, comparés à une étude menée à Rouen avant l'accident, ont révélé une accumulation des protéines liées au métabolisme du cholestérol dans le foie, ainsi qu'une perturbation de la voie de signalisation des PPARs impliquée dans le métabolisme des lipides.

La biosurveillance passive menée dans les petits estuaires bretons a intégré la géographie des bassins versant, l'hydrobiologie, la chimie des polluants, les biomarqueurs et les outils moléculaires chez le flet; elle a révélé des dérégulations pour les protéines liées à la détoxification des xénobiotiques, au cycle de l'urée, à l'hypoxie, au stress thermique, au métabolisme des lipides ou encore au système immunitaire.

Enfin, les analyses lipidiques réalisées sur le flet ont mis en évidence l'intérêt des profils en acides gras du muscle comme bio-indicateurs pertinents pour évaluer l'impact des stressseurs et l'état écologique des estuaires.

Cette approche multidisciplinaire a approfondi notre compréhension des réponses du poisson au multistress à l'échelle de l'hydrosystème, en soulignant l'importance de l'intégration des données environnementales et moléculaires pour identifier les principaux facteurs de stress.

Title: Stress ecology & ecological quality of the Seine estuary and Brittany coastal rivers: environmental and molecular signatures in a sentinel species, the Flounder (*Platichthys flesus*)

Keywords: Estuaries, Water quality, Land use, Pollution, Molecular -omics tools, *Platichthys flesus*

Abstract :

The different approaches developed during this thesis, on the responses of flounder populations to multistress in contrasting environments, enabled us to assess the ecological quality of large and small estuaries.

Passive biomonitoring in Seine revealed indicators of contamination, including liver damage, increased neurotoxicity and possible alteration of lipid metabolism. We have also observed the impact of global warming on the phenology of the flounder reproduction.

In parallel, active biomonitoring in Seine, following the accidental pollution induced by the Lubrizol and NORMANDIE-Logistique fire highlighted the relevance of flounder caging coupled with proteomics. The caging results, compared with a study carried out in Rouen before the accident, revealed an accumulation of proteins linked to cholesterol metabolism in liver, as well as a disruption of the PPAR signalling pathway involved in lipid metabolism.

Passive biomonitoring in small Breton estuaries integrating watershed geography, hydrobiology, pollutant chemistry, biomarkers and molecular tools in flounder, revealed deregulations in proteins linked to xenobiotic detoxification, urea cycle, hypoxia, thermal stress, lipid metabolism and immune system.

Finally, lipid analyses performed on flounder have highlighted the importance of fatty acid profiles as relevant indicators to assess the impact of stressors and the ecological status of estuaries.

This multidisciplinary approach has deepened our understanding of fish responses to multi-stress at the hydrosystem scale, emphasizing the importance of integrating environmental and molecular data to identify key stressors.