

Biomarqueur et Biodiversité

Expertise au service de l'utilisation des Biomarqueurs pour la Surveillance Ecologique des Ecosystèmes Aquatiques Continents, Marins et de Transition

Rapport final

Décembre 2020

Document élaboré dans le cadre de :

l'Appel à manifestations d'intérêt : Besoins de développements en appui à
la surveillance et à l'évaluation de l'état des eaux et des milieux
aquatiques

En partenariat avec :

- **AUTEURS**

Delphine Delaunay, directrice (Fondation Rovaltain)

Emilie Egea, chargée de programmes scientifiques (Fondation Rovaltain)

Damien Baudiffier, chargé de programme scientifique (Fondation Rovaltain)

Mathilde Moizo, Responsable communication (Fondation Rovaltain)

- **CONTRIBUTEURS**

Thomas Milinkovitch, chargé de mission, (Fondation Rovaltain), t.milinkovitch@hotmail.fr

Wilfried Sanchez, directeur scientifique adjoint (Ifremer) wilfried.sanchez@ifremer.fr

- **REMERCIEMENTS**

Les partenaires du projet tiennent à remercier les membres du groupe de travail qui ont contribué au projet: Olivier Perceval (OFB), Benoit Xuereb (UMR SEBIO) ; Alain Geffard (UMR SEBIO) ; Catherine Mouneyrac (EA MMS) ; Michel Auffret (UMR LEMAR) ; Wilfried Sanchez (IFREMER), Christophe Minier (UMR SEBIO) ; Olivier Geffard (INRAE) ; Cédric Fisson (GIP Seine-Aval) et Michel Auffret (UMR LEMAR).

Droits d'usage : accès libre

Niveau géographique : national

Couverture géographique : France

Niveau de lecture : citoyens, professionnels, experts

B&B : L'EXPERTISE FRANÇAISE SUR LES BIOMARQUEURS ET LEUR UTILISATION POUR LA SURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES

• RESUME

Depuis les années 80, nombre de laboratoires de recherche en écotoxicologie travaillent, en France et dans le monde, au développement et à la caractérisation de biomarqueurs chez différentes espèces, essentiellement animales. Définis comme un changement observable ou mesurable à différents niveaux d'organisation biologique reflétant l'exposition et/ou les effets d'un ou plusieurs stress chimiques, physiques ou biologiques, les biomarqueurs permettent de statuer sur les effets de la contamination sur la santé des organismes. Ce sont donc des outils complémentaires aux approches chimiques et écologiques classiquement mises en œuvre pour la surveillance réglementaire des milieux aquatiques. Malgré cela, les biomarqueurs sont peu utilisés dans un contexte réglementaire et restent majoritairement des outils de recherche déployés, à différentes échelles géographiques, dans le cadre de projets scientifiques visant à développer des connaissances sur ces outils ou en caractériser le potentiel applicatif. C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet B&B - Biomarqueurs & Biodiversité piloté par la Fondation Rovaltain et financé par l'Office Français de la Biodiversité et dont l'objectif est de promouvoir l'utilisation des biomarqueurs pour la surveillance des milieux aquatiques en s'appuyant sur l'expertise française dans ce domaine.

Financé pour 2 ans (2018-2019), le projet B&B s'appuie sur un consortium piloté par la Fondation Rovaltain et constitué de l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement), de l'UMR-I 2 SEBIO (Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques) et du GIP Seine Aval.

En s'appuyant sur un groupe d'experts scientifiques, le projet B&B a pour objectif :

- D'inventorier les laboratoires français disposant d'une expertise dans le domaine des biomarqueurs et de caractériser leurs compétences en terme de biomarqueurs disponibles, d'espèces sentinelles utilisées et de milieux investigués ;
- D'évaluer la maturité opérationnelle des biomarqueurs préalablement recensés et de caractériser leurs limites, leur spécificité et leur pertinence écologique dans un objectif de surveillance réglementaire des milieux aquatiques ;
- De réaliser un inventaire critique des méthodes disponibles, dans la littérature scientifique, pour agréger les résultats des biomarqueurs ;
- De formuler des recommandations et de définir des besoins de recherche pour une meilleure utilisation des biomarqueurs dans les programmes de surveillance environnementale.

Les travaux réalisés au cours de la première année ont permis d'identifier 23 laboratoires français travaillant dans le domaine des biomarqueurs. Après enquête réalisée auprès de 12 laboratoires, 57 biomarqueurs et 25 espèces représentant 162 couples biomarqueur/espèce ont été identifiés. 99 couples biomarqueur/espèce sont considérés comme opérationnels c'est-à-dire directement déployables dans un réseau de surveillance environnementale. A contrario, 30 couples biomarqueur/espèce nécessitent encore un important travail de caractérisation avant une application en biosurveillance. Ce travail s'est poursuivi, afin de caractériser plus finement la maturité opérationnelle des outils et leur applicabilité au travers d'un questionnaire plus détaillé et a donné lieu à la création d'une base de données (BMK) répertoriant 78 biomarqueurs et 331 couples espèces/biomarqueurs disponibles sur le territoire. Plus qu'un répertoire, la base de données BMK, classe également les couples par ordre de pertinence, en fonction de quatre cas applicatifs répertoriés : La surveillance générale des masses d'eau, la détermination de la qualité du rejet, l'impact du rejet sur les masses d'eaux, et le diagnostic control d'enquête. La pertinence et l'opérationnalité des marqueurs au sein de ces quatre cas d'études a fait l'objet d'un premier classement en fonction de la réponse des laboratoires aux 10 critères suivant : Existence d'une relation dose/réponse (1), Robustesse, caractérisation des facteurs confondants (si nécessaire) (2), Conséquence connue sur les niveaux d'organisation supérieures (3), Existence de littérature en lien avec le biomarqueur (Norme, Publication, Rapport, Autre) (4), Connaissance, ou non, de la valeur seuil (5), Echelle d'application (6), Facilité d'utilisation de l'organisme (7), Ethique (8), Facilité et temps d'acquisition des données (9), Matériel et niveau technique

requis (10). Les réponses obtenues à ces critères pour chaque couples espèce/biomarqueurs ont ensuite été pondérées en fonction de leur importance vis-à-vis des quatre cadre d'étude souhaité. En parallèle de la création de cette base de donnée, une publication sur les méthodes d'analyse et d'agrégation de résultats obtenus à partir de l'utilisation des biomarqueurs est en cours. La base de donnée BMK est également accompagnée d'un guide pratique sur l'utilisation de la base de données, ainsi que sur l'utilisation des biomarqueurs comme outil d'accompagnement dans la détermination du 'bon état écologique'.

In fine, le projet B&B permet de disposer d'un inventaire des biomarqueurs et des espèces disponibles dans les laboratoires de recherche français mais aussi et surtout d'une caractérisation fine de leur opérationnalité en termes de maturité et de conditions d'applications.

En termes de stratégies de déploiement, l'inventaire des couples biomarqueur/espèce réalisé grâce à ce projet pourrait être dans un premier temps expliquer et proposer à l'utilisation aux différents acteurs de l'eau à un niveau national, au premier rang desquels les agences de l'eau et gestionnaires de l'eau. Pour cela, il est nécessaire d'identifier des sites pilotes et de lever les interrogations des acteurs de l'eau sur la pertinence des biomarqueurs (valeurs de référence, valeurs seuils ...). Pour aller plus loin et se rapprocher de la DCE et de la DSCMM, il est nécessaire de faire converger les travaux du projet B&B avec les travaux (en cours de réalisation) du groupe de travail national sur les bio-essais afin de disposer d'un panel plus global d'outils complémentaires aux autres outils de biosurveillance. Quelle place pour les biomarqueurs à côté des autres outils de biosurveillance ? Quel type de réseau, quelle échelle géographique privilégier pour la mise en œuvre des biomarqueurs ? Biosurveillance passive ou active ? Comment faire se rapprocher DCE et DCSMM autour des biomarqueurs ?, il s'agit là de quelques une des questions qui structureront une réflexion qui sera partagée avec le groupe de travail national sur les bio-essais piloté par l'OFB.

MOTS CLES Biosurveillance ; Biomarqueurs ; DCE ;Base de données ; Biodiversité

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| Introduction..... | 6 |
| Objectifs du projet B&B | 7 |
| Présentation du groupe de travail et méthode de travail | 7 |
| Résultats | 9 |
| | |
| ▶ OBJECTIF 1 : Inventaire français disposant d’une expertise dans le domaine des biomarqueurs et caractérisation de leurs compétences en terme de biomarqueurs, d’espèces sentinelles utilisées et de milieux investigués..... | 9 |
| Présentation du questionnaire 1 et bilan des réponses au 31/12/2018: | 11 |
| Recensement des outils de biosurveillance développés par les laboratoires français..... | 11 |
| | |
| ▶ OBJECTIF 2 : évaluation de la maturité opérationnelle des biomarqueurs | 17 |
| Présentation du questionnaire approfondi..... | 17 |
| | |
| ▶ OBJECTIF 3 : Inventaire critique des méthodes d’agrégation des résultats des biomarqueurs..... | 19 |
| | |
| ▶ OBJECTIF 4 : Discuter la pertinence écologique de ces marqueurs et leurs spécificités..... | 20 |
| | |
| ▶ OBJECTIF 5 : Base de donnée biomarqueurs (BMK), et guide pratique d’aide à l’utilisation des biomarqueurs et à la prise de décision. | 24 |
| | |
| Conclusion | 25 |
| Glossaire | 26 |
| Sigles & Abréviations..... | 26 |
| Bibliographie..... | 27 |
| Annexe 1 : liste des références collectées dans le questionnaire 1 | 28 |

B&B : L'EXPERTISE FRANÇAISE SUR LES BIOMARQUEURS ET LEUR UTILISATION POUR LA SURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES

Introduction

La caractérisation de l'état écologique des masses d'eau telle que décrite par la DCE est basée sur une évaluation des perturbations au niveau des populations et des communautés. Il s'agit donc d'une évaluation *a posteriori* qui ne permet pas d'identifier les causes de non atteinte du bon état et de ce fait de guider efficacement la restauration des milieux. La mesure de l'état de santé des individus à l'aide de biomarqueurs permet d'acquérir ce niveau d'information et de renseigner sur les causes chimiques, voire biologiques, de perturbations populationnelles ou communautaires. Cette approche est particulièrement féconde lorsqu'elle est associée, de façon séquentielle, à la mesure de bioessais couplée à des analyses chimiques. Il existe toutefois un nombre très important de biomarqueurs développés dans les laboratoires de recherche ; un foisonnement qui rend nécessaire un inventaire mais aussi une caractérisation du potentiel de ces outils, voire des besoins de recherche.

Depuis les années 80, nombre de laboratoires de recherche en écotoxicologie travaillent, en France et dans le monde, au développement et à la caractérisation de biomarqueurs chez différentes espèces, essentiellement animales, permettant de statuer sur l'impact de la contamination sur la santé des organismes. Ainsi, les biomarqueurs sont donc des outils complémentaires aux approches chimiques et écologiques classiquement mises en œuvre pour la surveillance réglementaire des milieux aquatiques. Malgré cela, ils sont peu utilisés dans un contexte réglementaire et restent majoritairement des outils de recherche déployés, à différentes échelles géographiques, dans le cadre de projets scientifiques visant à développer des connaissances sur ces outils ou en caractériser le potentiel applicatif (Sanchez et Porcher, 2009). C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet B&B (Biomarqueurs & Biodiversité) piloté par la Fondation Rovaltain et financé par l'Office Français de la Biodiversité (OFB) et dont l'objectif est de promouvoir l'utilisation des biomarqueurs pour la surveillance des milieux aquatiques en s'appuyant sur l'expertise française dans ce domaine.

Au niveau européen, deux directives visent à préserver ou à reconquérir le bon état des milieux aquatiques en s'appuyant sur la mise en œuvre de réseaux de surveillance : la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/EC) d'une part qui s'adresse aux eaux continentales, aux eaux souterraines et aux eaux littorales, et la Directive Cadre Stratégie Milieu Marin (DCSMM, 2008/56/CE) qui porte sur les eaux marines. La mise en œuvre de ces deux textes s'appuie sur des stratégies différentes.

La DCE est basée sur une approche d'évaluation des risques. L'évaluation du bon état repose sur la mesure de substances chimiques dans différentes matrices environnementales et sur celle d'indicateurs biocénotiques dont les résultats sont comparés à des valeurs de référence. La DCE n'intègre pas la mesure de biomarqueurs parmi les paramètres permettant de statuer sur le bon état des masses d'eau. Cette absence s'explique en grande partie par le manque de maturité de ces outils lors de la préparation et de la publication de la directive en 2000. Depuis, plusieurs publications se sont attachées à mettre en évidence le potentiel des biomarqueurs et à proposer des stratégies d'application dans les programmes de surveillance de la DCE (Sanchez et Porcher, 2009). Des travaux ont également été menés dans ce sens au niveau européen (Wernersson et al., 2014, Brack et al. 2019) et se poursuivent afin d'intégrer des outils de surveillance basés sur la mesure des effets biologiques dans la DCE.

La DCSMM propose une approche écosystémique basée sur la mesure de 11 descripteurs qualitatifs qui permettent de statuer sur le bon fonctionnement des écosystèmes. Parmi eux, le descripteur 8 intitulé « Le niveau de concentration des contaminants ne provoque pas d'effets dus à la pollution » repose sur la mesure de contaminants chimiques et de plusieurs biomarqueurs parmi lesquels figurent la stabilité de la membrane lysosomale, l'imposex ou les malformations embryonnaires. L'introduction des biomarqueurs dans la DCSMM est due aux travaux préalablement réalisés dans le cadre d'OSPAR qui ont permis la détermination de valeurs seuil et la mise en place d'un système d'assurance qualité autour de ces outils.

Objectifs du projet B&B

Financé pour 2 ans (2018-2019) par l'Office Français de la Biodiversité, le projet B&B s'appuie sur un consortium piloté par la Fondation Rovaltain et constitué de l'INRAE (Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'Environnement), de l'UMR-I 2 SEBIO (Stress Environnementaux et BIo-surveillance des milieux aquatiques) et du GIP Seine Aval.

En s'appuyant sur un groupe d'experts scientifiques, le projet B&B a pour objectif :

- **OBJECTIF 1** : inventorier les laboratoires français disposant d'une expertise dans le domaine des biomarqueurs et de caractériser leurs compétences en terme de biomarqueurs disponibles, d'espèces sentinelles utilisées et de milieux investigués ;
- **OBJECTIF 2** : évaluer la maturité opérationnelle des biomarqueurs préalablement recensés et de caractériser leurs limites, leur spécificité et leur pertinence écologique dans un objectif de surveillance réglementaire des milieux aquatiques ;
- **OBJECTIF 3** : réaliser un inventaire critique des méthodes disponibles, dans la littérature scientifique, pour agréger les résultats des biomarqueurs ;
- **OBJECTIF 4** : formuler des recommandations et définir des besoins de recherche pour une meilleure utilisation des biomarqueurs dans les programmes de surveillance environnementale.
- **OBJECTIF 5** : Fournir une base de donnée opérationnelle et un guide pratique d'accompagnement dans le choix des biomarqueurs comme outils d'aide à la prise de décision.

Présentation du groupe de travail et méthode de travail

Le comité de pilotage (COPIL) est composé d'un représentant de chaque établissement partenaire et d'un correspondant de l'AFB, nominativement :

- **Wilfried Sanchez**, directeur adjoint scientifique (Ifremer) - siégeant au GT Métrologie du Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire.
- **Olivier Geffard**, chargé de recherches (INRAE) - membres du GDR d'Ecotoxicologie Aquatique « Intégrer la diversité des populations et des espèces pour mieux comprendre l'impact des polluants dans les milieux aquatiques » siégeant dans le groupe européen sur les outils de surveillance basés sur la mesure des effets
- **Christophe Minier**, maître de conférence (UMR SEBIO, Université du Havre)
- **Cédric Fisson**, chargé de mission (GIP Seine Aval), membre du projet ECOTONES "Effets de la contamination sur les organismes de l'estuaire de la Seine"
- **Olivier Perceval**, Chargé de mission écotoxicologie (OFB)

Le COPIL s'est adjoint un groupe d'experts composé de :

- **Benoit Xuereb**, UMR-SEBIO, Université du Havre, coordinateur du projet ECOTONES "Effets de la contamination sur les organismes de l'estuaire de la Seine"
- **Alain Geffard**, UMR-SEBIO, Université de Reims
- **Catherine Mouneyrac**, EA MMS; Université Catholique de l'Ouest
- **Michel Auffret**, UMR LEMAR; Université Bretagne Occidentale

ayant pour mandat :

- ↳ D'établir la méthode de cartographie des biomarqueurs afin de garantir une vision exhaustive de ces outils sur le territoire national et une homogénéité de la collecte des informations

- ↪ De définir les critères permettant de statuer sur le degré de maturité des biomarqueurs et de valider leur application pour les différents biomarqueurs identifiés.
- ↪ De formuler des propositions visant à intégrer les biomarqueurs dans la surveillance opérationnelle des masses d'eau et de valider les documents de présentation de ces propositions.
- ↪ De formuler des propositions d'actions visant à promouvoir les travaux réalisés.

Durant 6 mois (juin à décembre 2018), le COPIL a été conduit par Thomas MILINKOVITCH, chargé de mission recruté spécifiquement pour B&B.

Résultats

► **OBJECTIF 1 : Inventaire français disposant d'une expertise dans le domaine des biomarqueurs et caractérisation de leurs compétences en terme de biomarqueurs, d'espèces sentinelles utilisées et de milieux investigués.**

La première réunion du groupe de travail a permis d'identifier, à ce jour, 23 laboratoires publics français montrant des compétences en écotoxicologie.

Au sein de ces laboratoires, ont été identifiées : les équipes de recherches menant actuellement des recherches sur la thématique « biomarqueur » ainsi que les personnes référentes à contacter pour construire un inventaire quantitatif et qualitatif des biomarqueurs disponibles (tableau 1).

En parallèle, une « carte biomarqueurs interactive » des laboratoires permet de visualiser ces informations à l'échelle géographique nationale (Figure 1)

Les personnes référentes identifiées au cours de cette phase du projet ont été contactées afin d'obtenir une description de leur(s) biomarqueur(s) et de définir la maturité méthodologique ainsi que les critères d'application des biomarqueurs (cf. § Questionnaire 1).

Figure 1 : Extrait de la cartographie interactive

*Carte biomarqueurs interactive: A visionner en mode « diaporama »
Cliquez sur les villes*

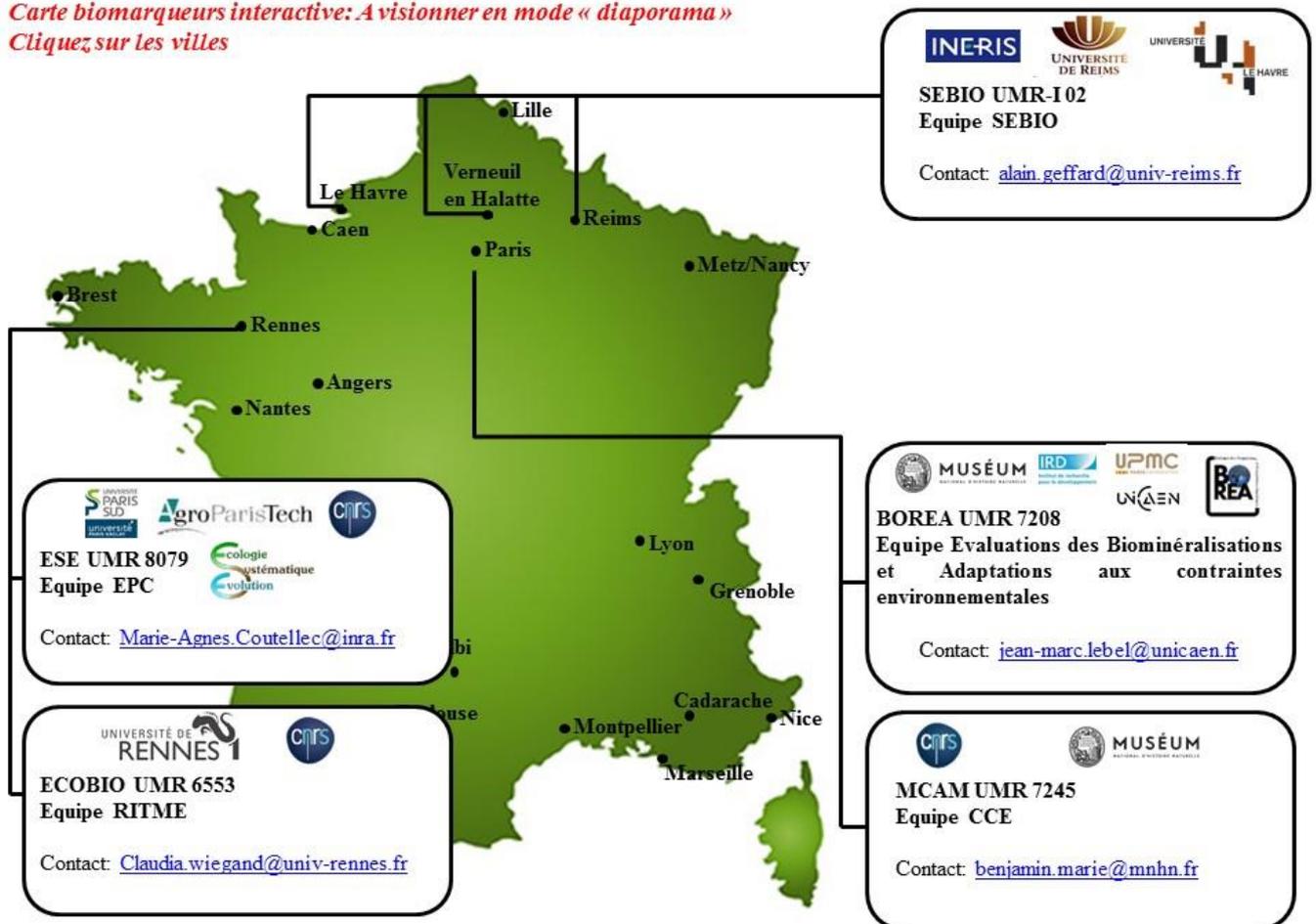


Tableau 1 : Inventaire des laboratoires et équipes avec une expertise en écotoxicologie.

| Ville | Laboratoire | Tutelle | Equipe | Contact |
|--|--------------------------------|------------------------------------|---|--|
| Brest | LEMAR (UMR6539) | IRD; CNRS; Ifremer | PANORAMA | Michel.Auffret@univ-brest.fr |
| Paris / Caens / Antilles françaises | BOREA (UMR 7208) | IRD; MNHN; UPMC; UNCaen | Evaluations des Biominéralisations et Adaptations aux contraintes environnementales | jean-marc.lebel@unicaen.fr |
| Bordeaux | EPOC (UMR5805) | CNRS; U. Bx | Ecotoxicologie Aquatique | magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr |
| Verneuil en Halatte / Le Havre / Reims | SEBIO (UMR-1 02) | INERIS; U. Reims; U. Le Havre | SEBIO | alain.geffard@univ-reims.fr |
| Metz / Nancy | LIEC (UMR 7360) | CNRS; U. Lorraine | EDEC | laure.giamberini@univ-lorraine.fr |
| Metz / Nancy | UR AFPA 340 | INRAE; U. Lorraine | MRCA | damien.banas@univ-lorraine.fr |
| La Rochelle | LIENSs (UMR7266) | CNRS; U. La Rochelle | AMARE | paco.bustamante@univ-lr.fr |
| Lyon | LEHNA (UMR 5023) | CNRS; U. Lyon; ENTPE | IPE | sylvie.BONY@entpe.fr |
| Lyon | RIVERLY | INRAE | Ecotoxicologie | olivier.geffard@inrae.fr |
| Angers | MMS (EA 2160) | U.Nantes; UCO; U. Le Mans | ECEm | Catherine.Mouneyrac@univ-nantes.fr |
| Nantes | Biogéochimie et Ecotoxicologie | ifremer; | LEX | farida.akcha@ifremer.fr |
| Montpellier | MARBEC (UMR9190) | ifremer; CNRS; IRD; U. Montpellier | Contaminants: Devenir et réponse | emilie.farcy@umontpellier.fr |
| Toulouse | ECOLAB (UMR 5245) | CNRS; U. Toulouse III; INP ENSAT | ECI | laury.gauthier@univ-tlse3.fr |
| Cadarache | IRSN Unité environnement | IRSN | LECO | christelle.adam-quillermain@irsn.fr |
| Montpellier | HSM (UMR 5569) | CNRS; IRD; U. Montpellier | ContEm | egomez@univ-montp2.fr |
| Rennes | ECOBIO (UMR 6553) | CNRS; U. Rennes 1 | RITME | Claudia.wiegand@univ-rennes.fr |
| Rennes | ESE (UMR 8079) | CNRS; AgroParisTech; U. Paris Sud | EPC | Marie-Agnes.Coutellec@inrae.fr |
| Nice | ECOMERS (EA 4228) | U. Nice Sophia Antipolis | Ecotoxicologie | francour@unice.fr |
| Paris | MCAM (UMR 7245) | CNRS; MNHN | CCE | benjamin.marie@mnhn.fr |
| Marseille | IMBE (UMR 7263) | CNRS; IRD; U. Aix Marseille; UPVD | Biomarqueurs, Environnement santé | julien.issartel@imbe.fr |
| Albi | GEODE (UMR 5602) | CNRS; U. Toulouse Jean Jaures | | florence.geret@univ-jfc.fr |
| Lille | LOG (UMR 8187) | CNRS; ULCO | Diversité, processus et interactions dans les écosystèmes marins | sami.souissi@univ-lille1.fr |
| Lille | LOG (UMR 8187) | CNRS; ULCO | Ecosystème, biodiversité et changements globaux | Rachid.amara@univ-littoral.fr |
| Grenoble | LECA (UMR 5553) | CNRS; IAE; UGA | DivAdapt | stephane.reynaud@univ-grenoble-alpes.fr |

NB : Concernant le laboratoire TOXEM, spécialiste de l'analyse des biomarqueurs réglementaires en milieu marin de la convention OSPAR, celui-ci ne figure pas dans la liste des laboratoires, mais est indiqué sur la carte interactive finale et est répertorié dans la base de donnée BMK.

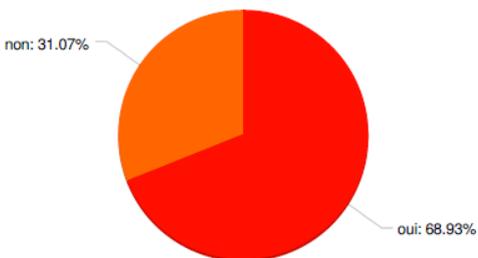
► **Questionnaire 1 : construction et réponses**

Un premier questionnaire (ci-dessous) a été envoyé aux 24 équipes recensées, ayant pour but de dresser l’inventaire des biomarqueurs (et de l’espèce associée) disponibles dans les laboratoires mais également d’avoir un premier aperçu de l’état d’avancement opérationnel, des conditions d’utilisation (milieu aquatique, échelle géographique, type de biosurveillance), de la pertinence écologique et de la spécificité aux contaminants de chaque biomarqueur.

Sur les 23 laboratoires interrogés, les 17 ayant répondu ont permis de recenser 174 couples biomarqueur/espèce dont une large majorité utilisable en milieux continentaux (comparé aux biomarqueurs utilisables en milieux aquatiques, de transitions ou marins), les résultats du questionnaire ont confirmé la difficulté à estimer la pertinence écologique d’un biomarqueur et mis en avant 85 biomarqueurs démontrant un état d’avancement opérationnel suffisant (niveau 4) pour une utilisation immédiate en biosurveillance. Sur ces 108 biomarqueurs, 75 sont exclusivement utilisables en milieu continentaux, 5 sont utilisables en milieux continentaux et de transitions, 18 sont utilisables en milieux marins et/ou de transitions.

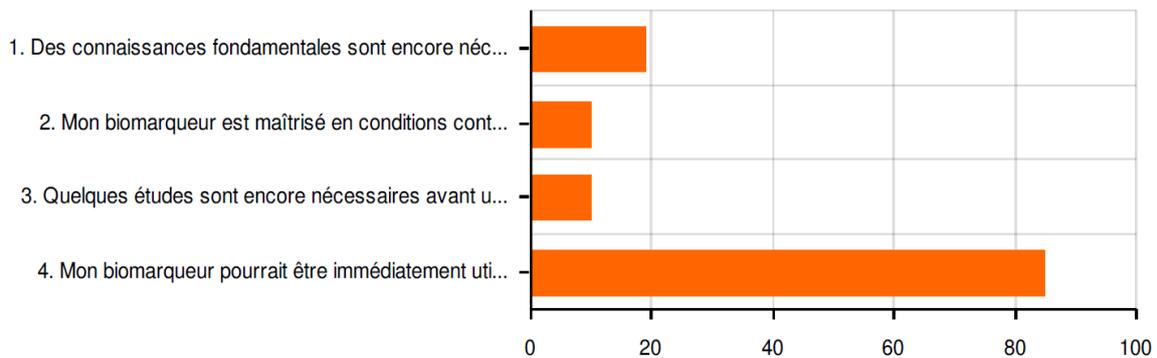
Présentation du questionnaire 1 et bilan des réponses au 31/12/2018:

Recensement des outils de biosurveillance développés par les laboratoires français

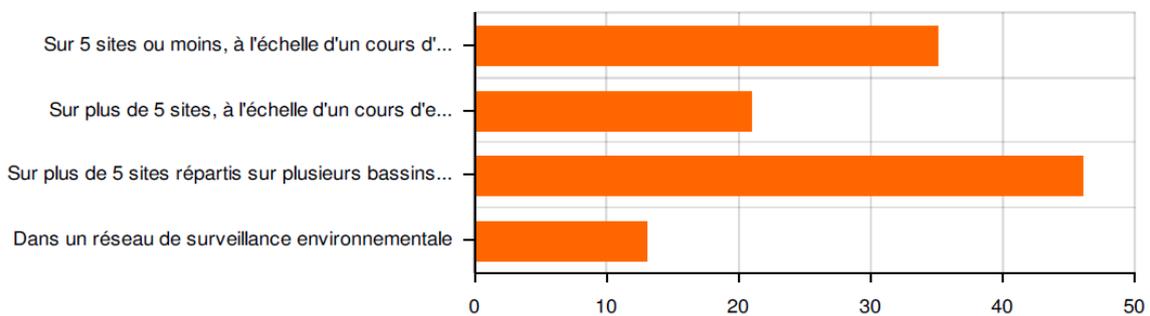
| | |
|--|---|
| Introduction | |
| <p>Dans l’objectif de réexamen de la DCE en 2019 visant à développer des approches plus robustes pour l’évaluation de l’état des eaux, l’Office Français de la Biodiversité a mandaté un consortium de recherche, porté par la Fondation Rovaltain, pour réaliser un recensement des biomarqueurs développés ou en cours de développement dans les laboratoires français. Nous vous sollicitons afin d’identifier les biomarqueurs qui sont utilisés dans votre laboratoire. Pour ce faire, merci de remplir le questionnaire suivant. Une synthèse sera communiquée à tous les participants. Merci d’avance pour vos réponses</p> | |
| Informations générales | |
| 1. Nom Prénom | |
| 2. Unité de recherche | 44 répondants dont 34 ont terminé le questionnaire |
| 3. Email | |
| 4. Téléphone | |
| 5. Couple Biomarqueur/Espèce* | 177 couples biomarqueur/espèce recensés |
| 6. Utilisez-vous ce couple biomarqueur/espèce en milieu aquatique continental (cours d'eau, plans d'eau) ? * |  <p>non: 31.07% oui: 68.93%</p> |

En milieu aquatique continental...

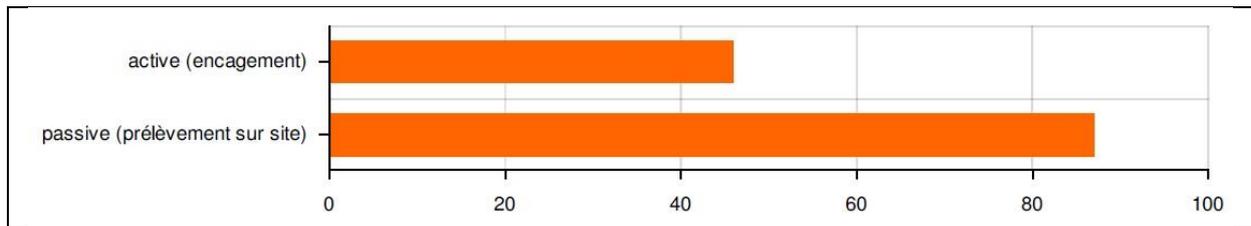
1. Comment évalueriez-vous l'état d'avancement opérationnel de votre biomarqueur (chez l'espèce concernée) ? * (cochez plusieurs cases si nécessaire)
- 1 - Des connaissances fondamentales sont encore nécessaires avant l'utilisation de mon biomarqueur en conditions contrôlées
 - 2 - Mon biomarqueur est maîtrisé en conditions contrôlées et doit être évalué sur le terrain dans un contexte de biosurveillance
 - 3 - Quelques études sont encore nécessaires avant une utilisation à court terme en biosurveillance
 - 4 - Mon biomarqueur pourrait être immédiatement utilisé dans un réseau de biosurveillance



2. Si le biomarqueur a été utilisé sur le terrain, à quelle échelle géographique a-t-il été déployé ? (cochez plusieurs cases si nécessaire)
- Sur 5 sites ou moins, à l'échelle d'un cours d'eau, d'un plan d'eau ou d'un bassin hydrographique
 - Sur plus de 5 sites, à l'échelle d'un cours d'eau, d'un plan d'eau ou d'un bassin hydrographique
 - Sur plus de 5 sites répartis sur plusieurs bassins hydrographiques
 - Dans un réseau de surveillance environnementale



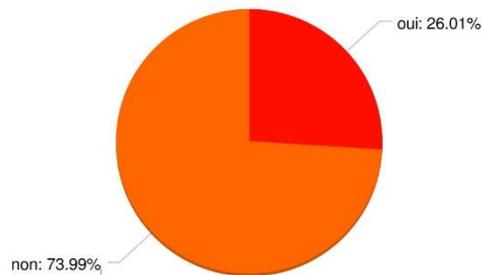
3. Si le biomarqueur a été déployé pour de la biosurveillance, quel était le type de biosurveillance ? (cochez plusieurs cases si nécessaire)
- active (engagement)
 - passive (prélèvement sur site)



4. Si vous le souhaitez, insérez une référence de publication en lien avec votre expertise sur ce couple biomarqueur/espèce utilisé en milieu aquatique continental

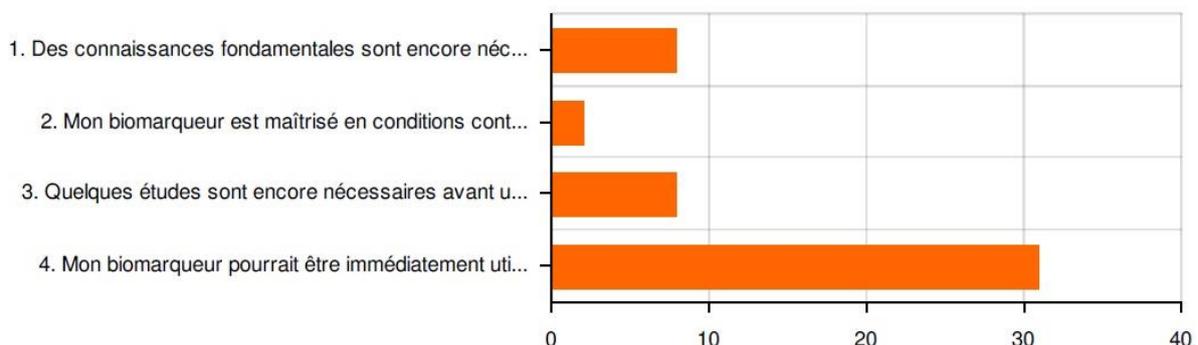
Voir liste des références en annexe 1

5. Utilisez-vous ce couple biomarqueur/espèce en milieu aquatique de transition ? *

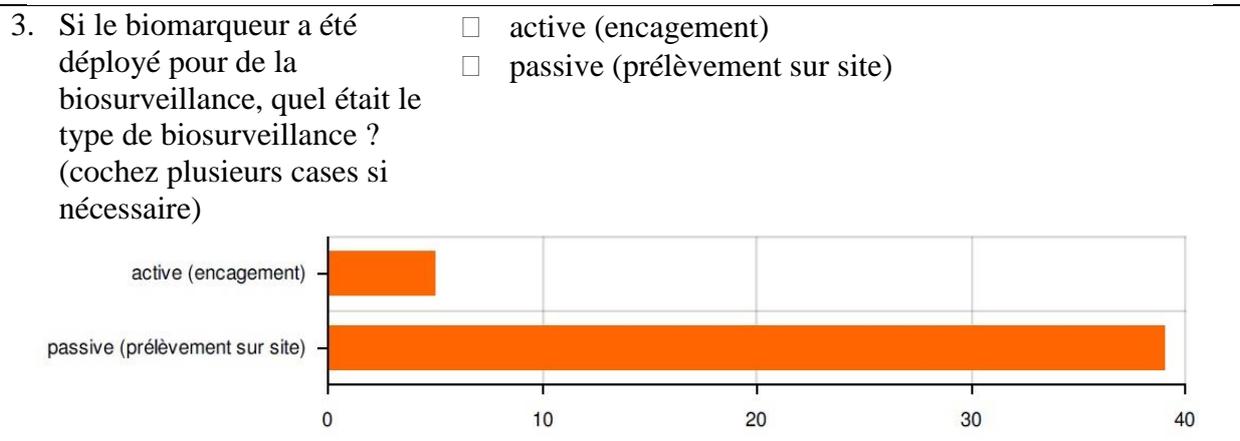
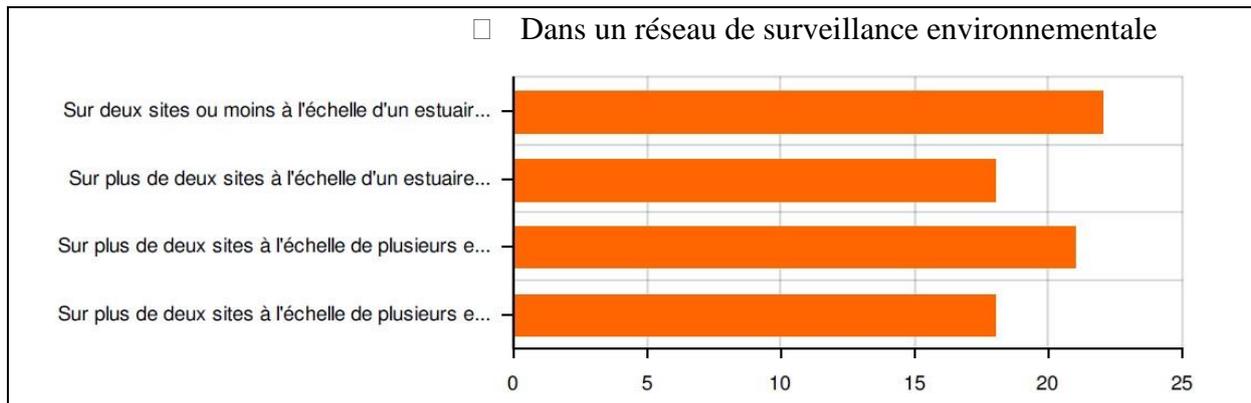


En milieu aquatique de transition...

1. Comment évalueriez-vous l'état d'avancement opérationnel de votre biomarqueur (chez l'espèce concernée) ? * (cochez plusieurs cases si nécessaire)
- 1 - Des connaissances fondamentales sont encore nécessaires avant l'utilisation de mon biomarqueur en conditions contrôlées
 - 2 - Mon biomarqueur est maîtrisé en conditions contrôlées et doit être évalué sur le terrain dans un contexte de biosurveillance
 - 3 - Quelques études sont encore nécessaires avant une utilisation à court terme en biosurveillance
 - 4 - Mon biomarqueur pourrait être immédiatement utilisé dans un réseau de biosurveillance

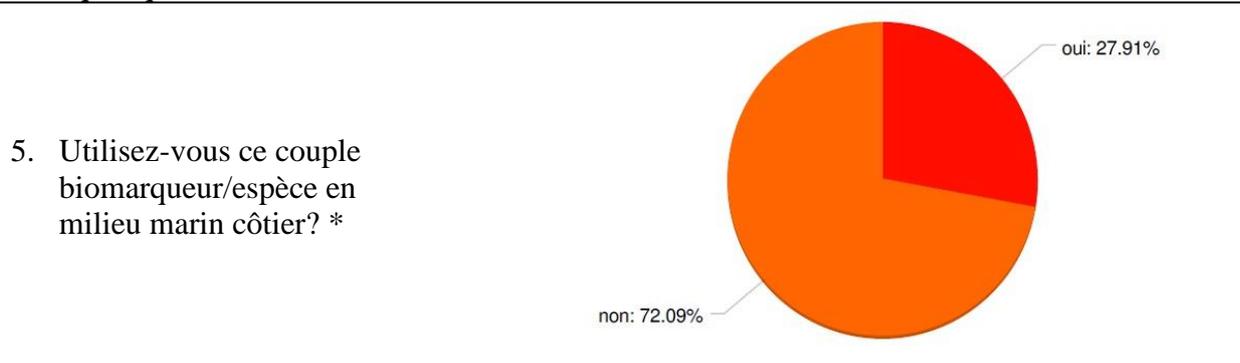


2. Si le biomarqueur a été utilisé sur le terrain, à quelle échelle géographique a-t-il été déployé ? (cochez plusieurs cases si nécessaire)
- Sur 5 sites ou moins, à l'échelle d'un cours d'eau, d'un plan d'eau ou d'un bassin hydrographique
 - Sur plus de 5 sites, à l'échelle d'un cours d'eau, d'un plan d'eau ou d'un bassin hydrographique
 - Sur plus de 5 sites répartis sur plusieurs bassins hydrographiques



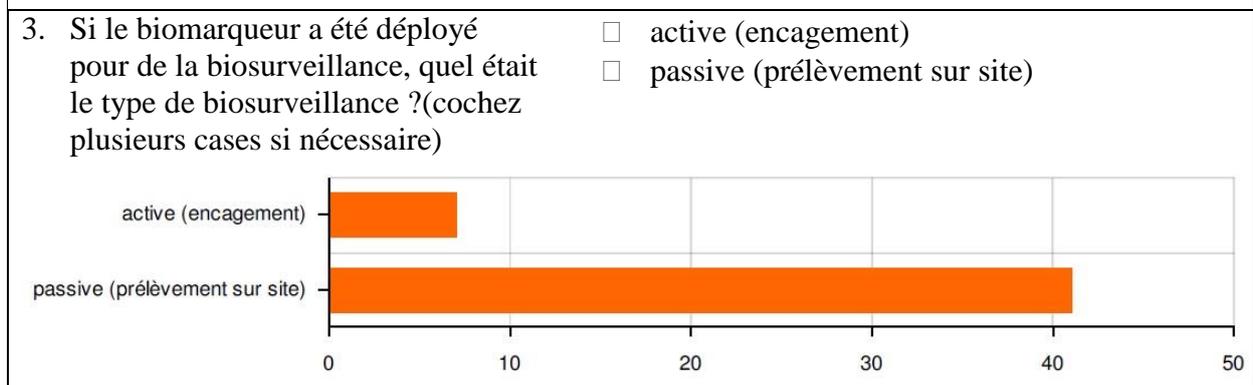
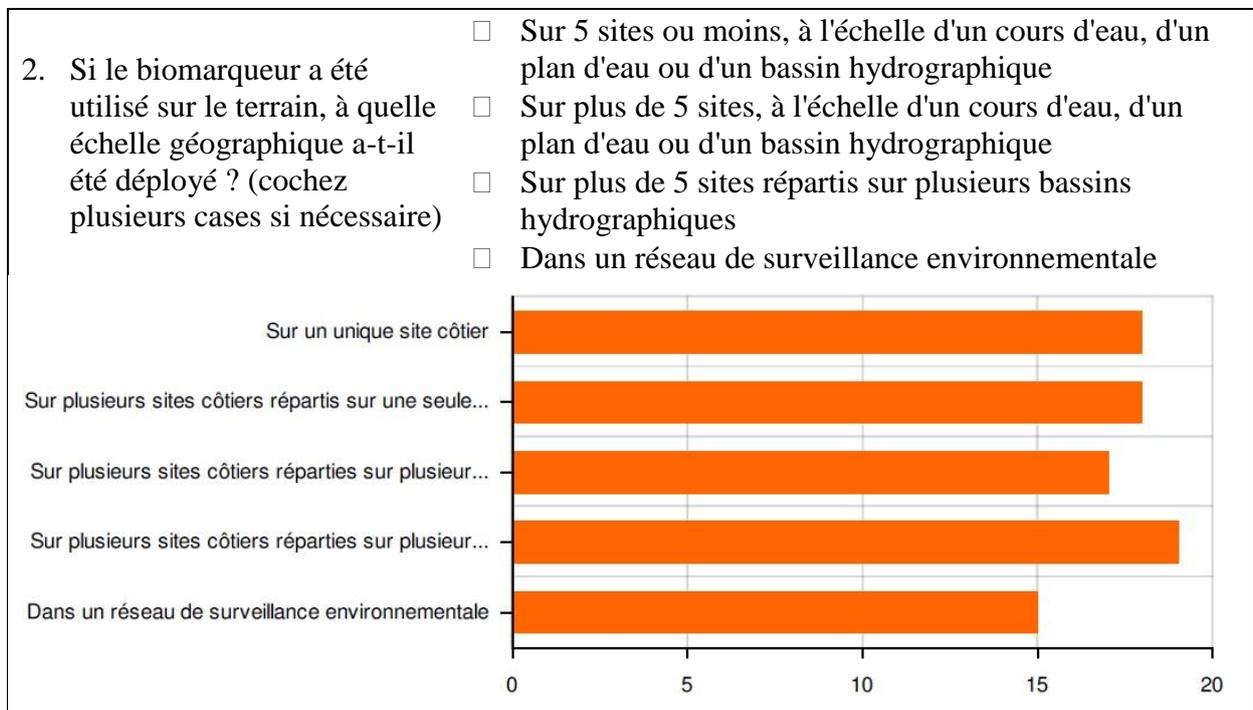
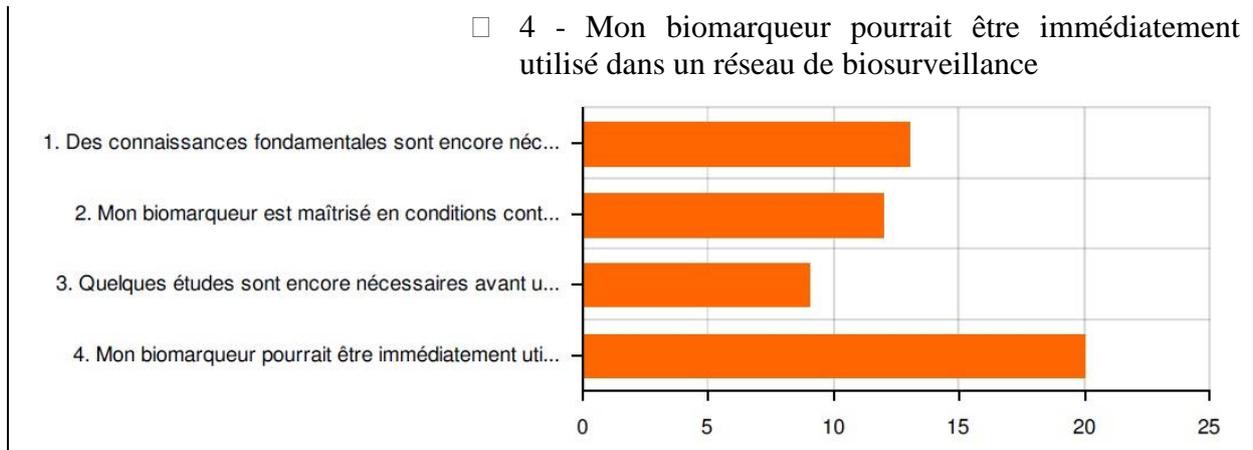
4. Si vous le souhaitez, insérez une référence de publication en lien avec votre expertise sur ce couple biomarqueur/espèce utilisé en milieu aquatique de transition

Voir liste des références en annexe 1



En milieu marin côtier...

1. Comment évalueriez-vous l'état d'avancement opérationnel de votre biomarqueur (chez l'espèce concernée) ? * (cochez plusieurs cases si nécessaire)
- 1 - Des connaissances fondamentales sont encore nécessaires avant l'utilisation de mon biomarqueur en conditions contrôlées
 - 2 - Mon biomarqueur est maîtrisé en conditions contrôlées et doit être évalué sur le terrain dans un contexte de biosurveillance
 - 3 - Quelques études sont encore nécessaires avant une utilisation à court terme en biosurveillance



4. Si vous le souhaitez, insérez une référence de publication en lien avec votre expertise sur ce couple biomarqueur/espèce utilisé en milieu marin côtier

Voir liste des références en annexe 1

Questions optionnelles

- 1.** Comment décririez-vous votre biomarqueur en terme de pertinence écologique ? Si vous le souhaitez, insérez une référence de publication en lien avec la pertinence écologique de ce biomarqueur
- 2.** Comment décririez-vous la spécificité de votre biomarqueur aux contaminants ? Si vous le souhaitez, insérez une référence de publication en lien avec la spécificité aux polluants de ce biomarqueur

► **OBJECTIF 2 : évaluation de la maturité opérationnelle des biomarqueurs**

Les 120 biomarqueurs précédemment recensés ont fait l'objet d'un second questionnaire, conduit lors d'entretiens téléphoniques ou de visu par Thomas Milinkovitch, permettant (i) d'approfondir la description du biomarqueur (ii) d'évaluer plus précisément l'état d'avancement opérationnel en questionnant la validation méthodologique réalisée par le laboratoire, (iii) de connaître les conditions d'utilisation et les techniques de dosage du biomarqueur.

Présentation du questionnaire approfondi

Introduction

1. Nom Prénom :
2. Unité de recherche :
3. Email :
4. Téléphone :
5. Couple biomarqueur/Espèce (B/E) :
6. Sur quels organes/tissus cibles, a été mesuré votre biomarqueur ? (* indiquer l'organe sur lequel la méthodologie est la plus avancée et sur lequel porte la suite du questionnaire)
7. La mesure de ce biomarqueur est-elle invasive ?

Description du biomarqueur

1. A quel niveau d'observation est mesuré votre biomarqueur ?
 Moléculaire Cellulaire Tissulaire/organe Individuel
2. Votre biomarqueur traduit-il une défense ou un dommage ?
3. Traduit-il un mécanisme de toxicité ?
 oui non
4. Si oui choisissez :
 Stress oxydant Neurotoxicité Immunotoxicité
 Génotoxicité Perturbation endocrinienne Perturbation métabolique
 Autres : précisez
5. Quelle fonction biologique est impactée par la modulation du biomarqueur ?
 Reproduction Comportement Développement
 Gestion de l'énergie Immunité Homéostasie
 Autres : précisez
6. Comment interprétez-vous les modulations de votre biomarqueur ?

Validation de la réponse biologique du biomarqueur

1. Avez-vous examiné la relation dose/réponse de votre biomarqueur ? en laboratoire sur le terrain ?
 oui en laboratoire sur le terrain non
2. Connaissez-vous le profil de votre réponse biomarqueur aux contaminants (ex : induction, inhibition, autres) ?

3. Connaissez-vous la cinétique de réponse de votre biomarqueur aux contaminants?
 oui non
4. Si oui quel est son type ?
 Réponse lente (induction ou inhibition) puis adaptation (retour à un niveau de base bien que l'exposition persiste)
 Réponse rapide puis adaptation (retour à un niveau de base bien que l'exposition persiste)
 Réponse lente et récupération lente
 Réponse lente et récupération rapide
 Réponse rapide et récupération lente
 Réponse rapide et récupération rapide
 Autres, précisez :
5. Quelles connaissances avez-vous de l'effet de facteurs confondants (extrinsèques et intrinsèques) sur la modulation de votre biomarqueur ?
 Aucune connaissance n'est disponible à ce sujet
 La littérature a montré qu'il n'y a pas d'effets de facteurs confondants
 La littérature a montré qu'il y a un effet des facteurs confondants suivant :
 L'effet des facteurs confondants suivants a été caractérisé par le laboratoire :
 L'effet des facteurs confondants suivants a été caractérisé par le laboratoire et je suis capable de le corriger :
6. Avez-vous déterminé des valeurs de références pour votre biomarqueur ?
 oui : précisez la méthodologie utilisée ;
 non
7. Avez-vous déterminé des valeurs seuils pour votre biomarqueur ?
 oui : précisez la méthodologie utilisée ;
 non

Méthodologie associée au couple B/E

1. Quelle est la méthode de référence de votre dosage (référence de publication : nom auteur, journal, issue) ?
2. Avez-vous déterminé les limites de quantification et/ou les limites de détection de votre biomarqueur ?
 oui non
3. Avez-vous déterminé des coefficients de variations inter et intra essais ?
 oui non
4. Votre méthode est-elle normalisée ?
 oui : dans ce cas indiquer la norme

non : dans ce cas, seriez-vous intéressé pour normaliser votre biomarqueur oui
non

Indications pratiques

1. Votre dosage est-il automatisé/robotisé ? oui non
2. Sinon, votre dosage est-il automatisable/robotisable ? oui non
3. Quel est le temps d'acquisition des résultats (temps pour l'obtention de résultats sans compter la phase expérimentale préalable d'exposition par encagement ou de prélèvement et sans compter la phase de traitement statistique consécutive)
4. Quel niveau d'expertise est nécessaire à la réalisation du dosage?
 - Facile : ne nécessite pas de formation spéciale
 - Intermédiaire : nécessite une formation spéciale
 - Difficile : nécessite une formation spéciale et une expérience dans le domaine

► OBJECTIF 3 : Inventaire critique des méthodes d'agrégation des résultats des biomarqueurs

Dans le cadre de l'évaluation du bon état écologique des masses d'eau, les biomarqueurs permettent de (i) révéler les effets du contaminant exclusif et des cocktails de contaminants ; (ii) mettre en évidence la présence de certains types de contaminants nocifs grâce à la spécificité de certains biomarqueurs ; (iii) détecter précocement les dommages aux écosystèmes grâce aux biomarqueurs sensibles. Parallèlement, à leur éventuelle mise en place pour la surveillance des masses d'eau, il est crucial de développer des outils d'intégration capables de résumer les réponses d'un ensemble de biomarqueurs en une seule valeur et / ou en un graphique afin de faciliter l'interprétation par les décideurs, les gestionnaires de l'environnement et d'autres non spécialistes.

Ainsi, une synthèse claire répertoriant, décrivant et discutant les outils permettant d'agrégier les réponses multi-biomarqueurs afin de fournir un seul résultat semble nécessaire. C'est pourquoi, les experts du projet B&B préparent un article de synthèse présentant un premier état de l'art des différentes méthodes d'agrégation des résultats des biomarqueurs, définissant leurs limites et avantages en termes d'approche de calcul et de faisabilité, types de données intégrées, représentation graphique et pertinence pour le processus décisionnel. Y seront présentés, les indices suivant :

- Sediment quality Triad
- Weight of evidence (WOE)
- Biomarker index
- Biomarker index 2
- Biomarker response index (BRI)
- Health assessment index (HAI)
- Histopathological condition index
- Immunotoxicological index
- Bioeffect assessment index (BAI)
- Lysosom response index (LRI)
- Health status index (HIS ou HSI)

- Integrated biomarker response (IBR)
- Integrated biomarker response revisited (IBRr)
- Integrated biomarker response version 2 (IBRv2)
- Integrated biomarker proteomic (IBP)

Pour chacun de ces indices, plusieurs paramètres seront considérés :

1. Présentation de l'outil :

- Publication de références de l'outil
- Types de données utilisés (quantitatives ou qualitatives)
- Type de biomarqueurs pouvant être intégrés dans l'outil (tous types ou à définir)
- Type d'approche utilisée pour le calcul de l'indice
- Pondération des données utilisées en fonction de leur importance dans le processus d'évaluation (oui ou non)
- Types de résultats finaux obtenus grâce à l'outil
- Présence d'une représentation graphique du résultat (oui ou non)
- Niveau biologique d'observation

2. Opérabilité de l'outil

- Nécessité de logiciels statistiques (oui ou non)
- Nécessité de logiciels propres à l'outil (oui ou non)
- Nécessité d'une base de données préalables pour l'établissement de valeurs de références
- Difficulté de la faisabilité du calcul (classement du plus au moins facile)

3. Significativité de l'outil

- Significativité statistique des résultats (oui ou non)
- Multidisciplinarité de l'outil (intégration de données uniquement biologiques ou provenant d'autres disciplines)
- Multi-spécificité de l'outil (une espèce précise ou tous types d'espèces)

► **OBJECTIF 4 : Discuter la pertinence écologique de ces marqueurs et leurs spécificités**

Le but initial de cet objectif était de formuler des recommandations et de définir des besoins de recherche pour une meilleure utilisation des biomarqueurs dans les programmes de surveillance environnementale. Malheureusement, cet objectif n'a pas pu être totalement atteint et ce pour deux raisons principales, le manque de communication avec le groupe en charge de l'analyse des bioessais, également piloté par l'OFB, et le manque de temps nécessaire à la réunion des experts sur plusieurs jours, afin d'adresser ces questions en profondeur, au regard des dernières publications Européennes et internationales sur le sujet.

Cependant, au fil de nos lectures et basé sur de récentes publications et rapports, ainsi que sur nos conversations avec les experts membres du groupe, voici ci-après, l'étendue de nos remarques et réflexions, sur la pertinence écologique de l'utilisation des biomarqueurs comme outil d'accompagnement dans la surveillance des masses d'eau.

- Cadre général

La directive cadre sur l'eau, DCE (2000/60/EC) impose la surveillance de 45 substances afin d'atteindre le bon état chimique et bon état écologique des masses d'eau. Cependant, plusieurs questions restent

en suspens : Selon le dernier rapport publié par l'agence européenne de l'environnement (EAA report n° 18/2018 ; 'Chemicals in European waters'), parmi les masses d'eau surveillées en Europe, le bon état écologique n'est atteint que pour 50% d'entre elles. La surveillance chimique, n'est donc pas une donnée suffisante pour s'assurer du bon fonctionnement des écosystèmes. La surveillance basée sur le dosage chimique uniquement possède trois inconvénients majeurs. Dans un premier temps, elle implique que les substances polluantes soient identifiées en amont, or, les changements rapides de l'industrie ont amené avec elles l'arrivée de nouveaux polluants émergents, dont l'effet a été démontré ou en cours d'investigation, et qui ont une action perturbatrice forte sur les écosystèmes aquatiques, e.g. les crèmes solaires, les micropolluants (Kienle *et al.*, 2019 ; Abdel-Latif *et al.*, 2020). Dans un deuxième temps, l'effet persistant dans le temps de certains polluants et leurs actions sur le long terme n'est pas prise en compte. Certains polluants, e.g. Polluants Organiques Persistants (POPs), Perfluoralkyls (PFAs) (Groffen *et al.*, 2020 ; Köck-Schulmeyer *et al.*, 2021), ont une action différente selon la concentration et reste longtemps présent dans le milieu. Leurs effets sur les écosystèmes, et ceux de leurs produits de dégradations doivent donc être mesurés sur le long terme, même lorsque le produit mesuré se trouve en-dessous de la concentration seuil réglementaire. Dans un troisième temps, les produits chimiques et substances polluantes agissent également de concert, et ont des effets parfois synergétiques ou inhibitrices, impliquant la nécessité d'une surveillance accrue, basée sur les effets biologiques observés, plutôt que sur les causes.

La recherche sur l'étude des mécanismes d'action des polluants et produits chimiques au niveau moléculaire, cellulaire et individuel a donné naissance à la découverte des biomarqueurs et de voies biologiques spécifiques, perturbées en présence de polluants (genotoxicité, immunotoxicité, neurotoxicité, perturbation endocrinienne, mue, changement de sexe...).

Afin de compléter la DCE et d'apporter des recommandations aux agents de l'eau et aux régulateurs, un premier consortium européen composé de 48 spécialistes internationaux s'est réuni en 2014, sous la coupe de la commission Européenne et a proposé la mise en place de systèmes de surveillance basée sur les effets observés dans certaines voies biologiques et métaboliques (*Technical report 2014-077*). Ces méthodes, rassemblées sous le nom de 'méthodes basées sur les effets' (EBMs pour 'effect-based methods'), se sont développées ces 20 dernières années au sein des organismes de recherche, et sont le reflet d'un bon état « écotoxicologique » des masses d'eau.

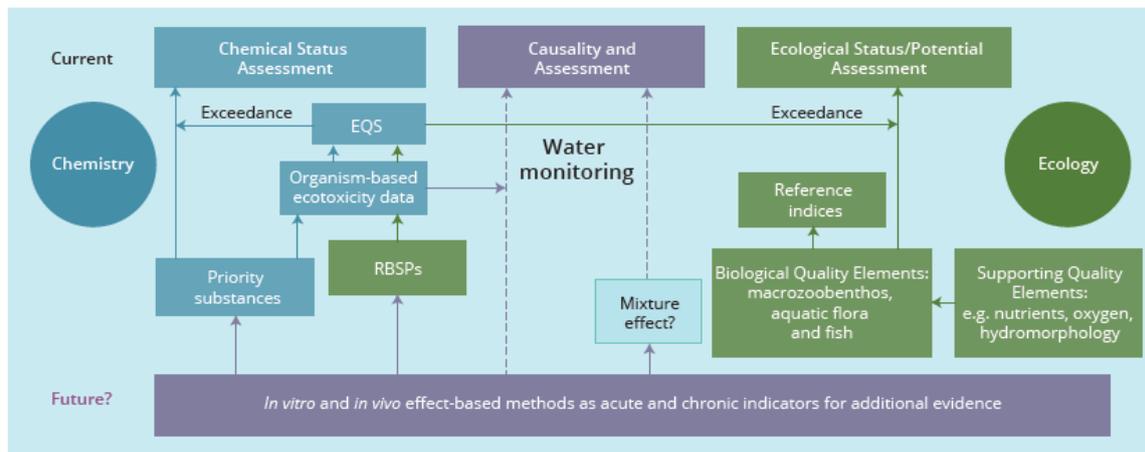
Ces méthodes EBMs, sont proposées depuis 2014, en complément des réglementations déjà en place et permettraient dans leur globalité, d'accompagner le diagnostic chimique, et de permettre une lisibilité plus juste et plus rigoureuse du bon état écologique des masses d'eau.

Ces EBMs comprennent (selon la définition usuelle de la commission européenne et des rapports associés) :

- Les **bioessais** : test biologiques, *in vitro* et *in vivo*, qui mesurent la toxicité d'échantillons environnementaux (exemple : eau, sédiments...), dans des conditions de laboratoires définis.
- Les **biomarqueurs** : réponses biologiques au niveau individuels ou aux niveaux organisationnels inférieurs, mesurés *in situ* sur des organismes directement exposés dans le milieu.

Complémentaires, ces deux types d'EBMs permettent de poser un diagnostic plus précis et représentatif du bien-être physiologique des espèces présentes dans le milieu. Comme définie et suggéré dans les récents rapports de la communauté européenne (EAA report n° 18/2018 ; 'Chemicals in European waters'), les bioessais, qui consiste en l'analyse de l'effet du milieu (souvent de l'eau de surface concentrée), complémenteraient les analyses chimiques, alors que les biomarqueurs (définis ici comme l'étude de l'effet observé directement dans le milieu), complémenteraient les analyses écologiques.

Figure 2.10 Biological effect assessment could serve to close the gap between ecological and chemical assessments and demonstrate causal relationships



Cette Figure issu du rapport European n° 18/2018 ; ‘Chemicals in European waters’ illustre la place importante des EBM pour permettre de lier état chimique et état écologique dans les masses d’eau.

Les bioessais :

En complément des analyses chimiques et comme outils de détermination des types de substances polluantes ou bien des sources de contamination potentielles, les bioessais ont déjà fait la démonstration de leur utilité en tant qu’outils essentiels d’accompagnement de diagnostic en intégrant la réglementation par exemple (OCDE-TG455, OCDE-TG458, ISO 19040-3:2018) (http://oai.afbiodiversite.fr/cindocoai/download/PUBLI/997/1/2017_012.pdf_1393Ko). Le projet MICROPOLIS, pour la détermination des perturbateurs endocriniens dans les eaux usées, est également un bel exemple de l’application des bioessais et de l’interêt de la biosurveillance dans son ensemble (http://oai.afbiodiversite.fr/cindocoai/download/PUBLI/997/1/2017_012.pdf_1393Ko).

Cependant, les bioessais possèdent plusieurs inconvénients majeurs dans la détermination de l’état écologique des masses d’eau liées à la méthode de concentration des échantillons d’eau à analyser. En effet, cette méthode active de concentration permet d’obtenir des réponses de plus forte intensité, mais ne prends pas en compte l’état de dilution libre des composés chimiques à l’intérieur des masses d’eau. Cette remarque est d’importance, si l’on considère que certaines concentrations faibles de produits toxiques (ex : tritium, micropolluants), ont un effet adverse plus important sur certaines voies physiologiques (notamment les mécanismes de réparation de l’ADN) que des concentrations plus élevées. D’autre part, certains composés chimiques (métaux), ne répondent pas correctement aux méthodes actuelles de concentration des échantillons, l’utilisation des bioessais seuls, ne répond donc pas avec complétude à l’analyse exhaustive des facteurs de risques présents dans les masses d’eau. En complément des bioessais, il est alors nécessaire d’utiliser une batterie de biomarqueurs, dédiés à l’analyse *in situ*.

Les biomarqueurs

La suite du rapport étant dirigé vers la création d'une base de données utile listant les biomarqueurs disponibles et utilisables en France, ainsi que leur pertinence, le reste de la discussion sera orientée vers les circonstances d'utilisation de ces biomarqueurs.

Pertinence écologique des biomarqueurs :

Nous l'avons vue précédemment dans les premières pages de ce rapport, les biomarqueurs pourraient intervenir dans plusieurs conditions non exclusives :

- 1- La surveillance générale des masses d'eau
- 2- Evaluer la qualité d'un rejet
- 3- Evaluer la qualité du milieu après un rejet
- 4- Diagnostic control d'enquête

Les biomarqueurs peuvent intervenir dans : la mesure des effets cocktails ; et/ ou l'analyse des effets liés aux perturbateurs chimiques non mesurables et non mesurés, comme les micropolluants, les polluants émergents, et les produits de dégradation.

La plupart des mesures liées aux biomarqueurs peuvent se faire de deux façons : Active ou Passive. Les espèces sélectionnées peuvent être transplantées au contact du cours d'eau pendant un temps défini (Surveillance active), ou bien les espèces autochtones peuvent être prélevées de façon régulières pour analyse (Surveillance passive). Sur ce point, le comité directeur et les experts scientifiques qui se sont réunis autour du projet B&B ont considérés que ces deux méthodes présentaient chacune des avantages complémentaires et que la prise en compte de données telles que : les facteurs confondants, l'existence d'une valeur seuil, la facilité d'accès des points de surveillance, la proximité d'une source de contamination, et la connaissance du mode d'action biologique de certains contaminants connus ou potentiels étaient autant de points clés à considérer.

Dans le dernier rapport du programme de recherche Européen FP7 'SOLUTIONS', les EBM ont été appliqués dans une série d'études de cas, où il a été possible de caractériser la probabilité que les mélanges complexes présents dans les systèmes d'eau posent des dommages spécifiques (liés au MoA) aux éléments de qualité biologique, le long d'un tronçon de rivière (Neale et al., 2015), autour des stations d'épuration des eaux usées (Neale et al., 2017 ; Muz et al., 2017) et à proximité des entrées d'eaux usées non traitées (Konig et al., 2017). Pour les types de sites d'exemple sélectionnés, les méthodes ont permis d'identifier les dommages et les causes associées (mutagènes, oestrogéniques, androgéniques et anti-androgène) à l'appui de la gestion de la qualité de l'eau.

Limitation présente :

La multiplicité des biomarqueurs disponibles et les méthodes d'analyses des résultats nécessitent la mise en place de formations spécifiques, et le développement des méthodes permettant la sortie d'un ou deux indicateurs de bon état unique. De même, il apparait que ce travail initié sur la cartographie et la pertinence des biomarqueurs, doit être poursuivie par la mise en place d'ateliers de travail collaboratif entre les régulateurs de l'eau et écotoxicologues, afin de pouvoir mettre en place une méthodologie de surveillance commune, efficace et collaborative, en fonction des spécificités des cours d'eau.

► **OBJECTIF 5 : Base de donnée biomarqueurs (BMK), et guide pratique d'aide à l'utilisation des biomarqueurs et à la prise de décision.**

Basé sur 10 critères fondamentaux de sélections et recensant plus de 78 biomarqueurs et 364 couples espèces/biomarqueurs, la base de donnée BMK fait un premier inventaire (non exhaustif) des biomarqueurs aquatiques utilisables et disponibles en France. En fonction du cadre d'étude recherché, les couples espèces/ biomarqueurs apparaissent classés par ordre de pertinence écologique et de maturité opérationnelle.

Les dix critères d'analyse sélectionnés ont été :

- Critère 1 : Existence d'une relation Dose/réponse –
- Critère 2 : Robustesse, caractérisation des facteurs confondants (si nécessaire)
- Critère 3 : Conséquence connue sur les niveaux d'organisation supérieures
- Critère 4 : Existence de littérature en lien avec le biomarqueur (Norme, Publication, Rapport, Autre)
- Critère 5 : Connaissance, ou non, de la valeur seuil.
- Critère 6 : Echelle d'application
- Critère 7 : Facilité d'utilisation de l'organisme
- Critère 8 : Ethique
- Critère 9 : Facilité et temps d'acquisition des données
- Critère 10 : Matériel et niveau technique requis

Chaque critère d'analyse s'est vu attribué un score de 0 à 10 en fonction de la réponse donnée. Ce score a ensuite été pondéré par un indice de pertinence (favorable, moyennement favorable, et défavorable), relatif au cadre d'étude proposé, c'est-à-dire : Surveillance générale, Qualité du rejet, Impact du rejet sur le milieu, Diagnostic control enquête).

Les détails et explications se trouvent dans le guide pratique d'accompagnement de la base de donnée BMK, à vertu de synthèse sur l'utilisation des biomarqueurs et d'aide à la prise de décision pour les régulateurs de l'eau

► Valorisation

Le projet B&B a déjà donné lieu à plusieurs articles, dont un éditorial soumis au journal *ESPR Environmental Science Pollution Research* et une publication sous forme d'une fiche technique du réseau d'écotoxicologie terrestre et aquatique.

Editorial *ESPR*

Towards an improvement of the evaluation of the environmental status for the water framework directive strategy

Thomas Milinkovitch, Olivier Geffard, Alain Geffard, Catherine Mouneyrac, Arnaud Chaumot, Benoit Xuereb, Cédric Fisson, Christophe Minier, Michel Auffret, Olivier Perceval, Emilie Egea, Wilfried Sanchez

Abstract

The water framework directive (WFD) strategy currently supports chemical and ecological biomonitoring programs in order to achieve the good environmental status of water bodies. However, although necessary, chemical and ecological assessments show some limitations. Chemical approaches focus on certain substances identified as priority ones, while they did not take into account potentially harmful others (such as emerging ones) and also ignore the hazard related to cocktail of contaminants. On the other hand, ecological approaches, while providing holistic information on the impairment of biological communities in ecosystems, do not estimate the part of the alteration related to exposure to chemical contaminants and consequently do not allow the establishment of contaminant impact reduction plan. In order to solve these issues, ecotoxicologists suggest the use of biomarkers. Indeed, biomarkers enable to highlight the cumulated effect of potentially harmful substances (or cocktail of substances), and their specificity towards the effects of chemicals makes possible to properly discriminate the role of toxicants within the impairment of biological communities in water bodies.

Thus, the integration of such tools in the WFD could considerably improve its biomonitoring strategy. To promote this integration, the B n' B project (Biomarkers and Biodiversity) aims to (i) establish an inventory of the biomarkers developed by French laboratories; (ii) determine their methodological advancement and limits, and on this basis, formulate recommendations for biomonitoring use and future research needs; (iii) discuss the biomarkers ecological significance, their specificity to contaminants and their interpretation capacity; (iv) propose integrative tools facilitating the decision-taking by stakeholders.

Conclusion

Le projet B&B a permis de faire émerger la base de données BMK recensant les couples espèces/biomarqueurs disponibles en France. C'est le premier outil d'aide à la décision de cette envergure développée en France.

L'objectif principal de cette base de donnée et de ce guide est de fournir à l'utilisateur une grille de lecture de la base de données BMK, en donnant des clefs de compréhension sur les différents critères permettant d'aboutir au choix d'un ou de plusieurs couples espèces/biomarqueurs selon le contexte général de l'étude.

Glossaire

Biomarqueur : changement biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui peut être mesuré dans les tissus ou des fluides corporels ou au niveau de l'organisme entier qui met en évidence l'exposition à/ou les effets d'un ou plusieurs polluants chimiques

Sigles & Abréviations

DCE : directive-cadre sur l'eau (2000/60/CE) directive européenne du Parlement européen et du Conseil adoptée le 23 octobre 2000. Elle établit un cadre pour une politique globale communautaire dans le domaine de l'eau.

DCSSM : Directive Cadre Stratégie Milieu Marin (DCSMM, 2008/56/CE)

EA : Equipe d'Accueil. Label attribué par le ministère. Il s'agit d'une structure de recherche placée sous la responsabilité du ministère.

EBMs : Méthodologie basé sur les effets (effect based methods)

GDR : Groupement de recherche

GIP : Groupement d'intérêt public

GT : Groupe de travail

Ifremer : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer

INERIS : Institut national de l'environnement industriel et des risques

INRAE : Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement

OSPAR : Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est ou Convention OSPAR (OSPAR pour « Oslo-Paris ») définit les modalités de la coopération internationale pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du nord-est. Elle est entrée en vigueur le 25 mars 1998, et remplace les Conventions d'Oslo et de Paris.

UMR : Unité Mixte de Recherche

Bibliographie

- Abdel-Latif, H. M. R., Dawood, M. A. O., Menanteau-Ledouble, S., & El-Matbouli, M. (2020). Environmental transformation of n-TiO₂ in the aquatic systems and their ecotoxicity in bivalve mollusks: A systematic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 200, 110776.
- Brack, W., Aissa, S. A., Backhaus, T., Dulio, V., Escher, B. I., Faust, M., Hilscherova, K., Hollender, J., Hollert, H., Müller, C., Munthe, J., Posthuma, L., Seiler, T.-B., Slobodnik, J., Teodorovic, I., Tindall, A. J., de Aragão Umbuzeiro, G., Zhang, X., & Altenburger, R. (2019). Effect-based methods are key. The European Collaborative Project SOLUTIONS recommends integrating effect-based methods for diagnosis and monitoring of water quality. *Environmental Sciences Europe*, 31(1), 10.
- Groffen, T., Rijnders, J., van Doorn, L., Jorissen, C., De Borger, S. M., Lutikhuis, D. O., de Deyn, L., Covaci, A., & Bervoets, L. (2020). Preliminary study on the distribution of metals and persistent organic pollutants (POPs), including perfluoroalkylated acids (PFAS), in the aquatic environment near Morogoro, Tanzania, and the potential health risks for humans. *Environmental Research*, 192, 110299.
- Kienle, C., Vermeirssen, E. L. M., Schifferli, A., Singer, H., Stamm, C., & Werner, I. (2019). Effects of treated wastewater on the ecotoxicity of small streams—Unravelling the contribution of chemicals causing effects. *PLoS One*, 14(12), e0226278.
- Köck-Schulmeyer, M., Ginebreda, A., Petrovic, M., Giulivo, M., Aznar-Alemany, Ò., Eljarrat, E., Valle-Sistac, J., Molins-Delgado, D., Diaz-Cruz, M. S., Monllor-Alcaraz, L. S., Guillem-Argiles, N., Martínez, E., Miren, L. de A., Llorca, M., Farré, M., Peña, J. M., Mandaric, L., Pérez, S., Majone, B., ... Barceló, D. (2021). Priority and emerging organic microcontaminants in three Mediterranean river basins: Occurrence, spatial distribution, and identification of river basin specific pollutants. *The Science of the Total Environment*, 754, 142344.
- König, M., Escher, B. I., Neale, P. A., Krauss, M., Hilscherová, K., Novák, J., Teodorović, I., Schulze, T., Seidensticker, S., Kamal Hashmi, M. A., Ahlheim, J., & Brack, W. (2017). Impact of untreated wastewater on a major European river evaluated with a combination of in vitro bioassays and chemical analysis. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 220(Pt B), 1220–1230.
- Muz, M., Dann, J. P., Jäger, F., Brack, W., & Krauss, M. (2017). Identification of Mutagenic Aromatic Amines in River Samples with Industrial Wastewater Impact. *Environmental Science & Technology*, 51(8), 4681–4688.
- Neale, P. A., Ait-Aissa, S., Brack, W., Creusot, N., Denison, M. S., Deutschmann, B., Hilscherová, K., Hollert, H., Krauss, M., Novák, J., Schulze, T., Seiler, T.-B., Serra, H., Shao, Y., & Escher, B. I. (2015). Linking in Vitro Effects and Detected Organic Micropollutants in Surface Water Using Mixture-Toxicity Modeling. *Environmental Science & Technology*, 49(24), 14614–14624.
- Neale, P. A., Munz, N. A., Ait-Aïssa, S., Altenburger, R., Brion, F., Busch, W., Escher, B. I., Hilscherová, K., Kienle, C., Novák, J., Seiler, T.-B., Shao, Y., Stamm, C., & Hollender, J. (2017). Integrating chemical analysis and bioanalysis to evaluate the contribution of wastewater effluent on the micropollutant burden in small streams. *The Science of the Total Environment*, 576, 785–795.
- Sanchez, W., & Porcher, J.-M. (2009). Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(2), 150–158.
- Wernersson, A.-S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Van Der Grinten, E., O'Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., ... Kase, R. (2015). The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe*, 27(1), 7.

Annexe 1 : liste des références collectées dans le questionnaire 1

Références milieu aquatique continental...

- Arini A., Daffe G., Gonzalez P., Feurtet-Mazel A. and Baudrimont M. (2014). Detoxification and genetic recovery capacities of *Corbicula fluminea* after an industrial metal contamination (Cd and Zn): a one-year depuration experiment. *Environmental Pollution*, 192: 74-82.
- Bado-Nilles, A., et al. (2014). "Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on European bullhead, *Cottus sp.*" *Environmental Pollution* 184: 9-17.
- Bado-Nilles, A., et al. (2015). "Recommendations to design environmental monitoring in the European bullhead, *Cottus sp.*, based on reproductive cycle and immunomarker measurement." *Marine Pollution Bulletin* 95(2): 576-581.
- Bado-Nilles, A., S. Jolly, J.-M. Porcher, O. Palluel, A. Geffard, B. Gagnaire, S. Betoulle and W. Sanchez (2014). "Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus sp.*" *Environmental Pollution* 184(0): 9-17.;
- Bertucci A., Pierron F., Gourves P.Y., Klopp C., Lagarde G., Gonzalez P. and Baudrimont M. (2018). Whole-transcriptome response to wastewater treatment plant and stormwater effluents in the Asian clam, *Corbicula fluminea*. *Chemosphere*, 165 :96-106. doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.08.090;
- Brion, F., F. Rogerieux, P. Noury, B. Migeon, P. Flammarion, E. Thybaud and J. M. Porcher (2000). "Two-step purification method of vitellogenin from three teleost fish species: rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), gudgeon (*Gobio gobio*) and chub (*Leuciscus cephalus*)." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 737(1-2): 3-12.;
- Cailleaud K., Maillet G., Budzinski H., Souissi S. & J. Forget-Leray (2007) Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis*. *Comp. Biochem. Phys. A* 147 : 841-849. (IF 2015 2/Q2)
- Charron, L., Geffard, O., Chaumot, A., Coulaud, R., Queau, H., Geffard, A., Dedourge-Geffard, O (2013). Effect of water quality and confounding factors on digestive enzyme activities in *Gammarus fossarum*. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 9044-9056
- Charron, L, Geffard, O, Chaumot, A, Coulaud, R, Jaffal, A, Gaillet, V, Dedourge-Geffard, O, Geffard, A (2014). Influence of Molting and Starvation on Digestive Enzyme Activities and Energy Storage in *Gammarus fossarum*. *Plos One*, DOI: 10.1371/journal.pone.0096393
- Charron, L., Geffard, O., Chaumot, A., Coulaud, R., Jaffal, A., Gaillet, V., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A. (2015). Consequences of Lower Food Intake on the Digestive Enzymes Activities, the Energy Reserves and the Reproductive Outcome in *Gammarus fossarum*. *Plos One* 10.1371/journal.pone.0125154.
- Claire Dautremepuits (Septembre 2003/URCA). Les métallothionéines, le stress oxydatif, le système immunitaire en tant que biomarqueurs de pollution : cas d'un poisson indigène, la carpe *Cyprinus carpio* L. saine ou parasitée », direction S. Biagianti et G. Vernet, responsables scientifiques S. Betoulle et S. Paris. ;
- Coulaud R., Geffard O., Xuereb B., Lacaze E., Quéau H., Garric J., Charles S., Chaumot A. 2011. In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45(19): 6417-6429.
- Dayras P., Charmantier G., Chaumot A., Vigneron A., Coquery M., Quéau H., Artells E., Lignot J.-H., Geffard O., Issartel J., 2017. Osmoregulatory responses to cadmium in reference and historically metal contaminated *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda) populations. *Chemosphere*, 180, 412-422.
- Dedourge-Geffard O., F. Palais, Biagianti-Risbourg S., Geffard O. et Geffard A. (2009) Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum* : an in situ experiment. *Chemosphere*, 77, 1569-1576.;
- Dedourge-Geffard, O., Charron, L., Hofbauer, C., Gaillet, V., Palais, F., Lacaze, E., Geffard, A., Geffard, O (2013). Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97, 139-146
- Geraudie, P., N. Hinfray, M. Gerbron, J.-M. Porcher, F. Brion and C. Minier (2011). "Brain cytochrome P450 aromatase activity in roach (*Rutilus rutilus*): Seasonal variations and impact of environmental contaminants." *Aquatic Toxicology* 105(3-4): 378-384.

- Geraudie, P., C. Boulange-Lecomte, M. Gerbron, N. Hinfray, F. Brion and C. Minier (2010). "Endocrine effects of the tapeworm *Ligula intestinalis* in its teleost host, the roach (*Rutilus rutilus*)." *Parasitology* 137(4): 697-704.
- Hacquart Sébastien (2005) Etude des biomarqueurs hépatiques de la carpe (*Cyprinus carpio*) exposée à trois milieux de contaminations différentes» DEA de Toxicologie de l'environnement de l'université de Metz. Direction S. Paris-Palacios et S. Biagiante-Risbourg.;
- Hani, Y.M.I., Marchand, A., Turies, C., Kerambrun, E., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Porcher, J.-M., Geffard, A., Dedourge-Geffard, O. (2018). Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature 2018 PLoS ONE 13(4),e0194932; ;
- Hani, Y.M.I., Turies, C., Palluel, O., Delahaut, L., Gaillet, V., Bado-nilles, A., Porcher, J.-M., Geffard, A., Dedourge-Geffard, O. (2018). Effects of chronic exposure to cadmium and temperature, alone or combined, on the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Interest of digestive enzymes as biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 199, pp. 252-262.
- Hinfray, N., O. Palluel, B. Piccini, W. Sanchez, S. Aït-Aïssa, P. Noury, E. Gomez, P. Geraudie, C. Minier, F. Brion and J.-M. Porcher (2010). "Endocrine disruption in wild populations of chub (*Leuciscus cephalus*) in contaminated French streams." *Science of The Total Environment* 408(9): 2146-2154.
- Jolly, S., A. Bado-Nilles, F. Lamand, C. Turies, E. Chadili, J.-M. Porcher, S. Betoulle and W. Sanchez (2012). "Multi-biomarker approach in wild European bullhead, *Cottus* sp., exposed to agricultural and urban environmental pressures: Practical recommendations for experimental design." *Chemosphere* 87(7): 675-683.
- Lacaze E. Devaux A., Mons R., Bony S., Garric J., Geffard A., Geffard O. 2011. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution*. 159 (6): 1682-1691.
- Lacaze E. Devaux A., Jubeaux G., Mons R., Gardette M., Bony S., Garric J., Geffard O. 2011. DNA damage in *Gammarus fossarum* sperm as a biomarker of genotoxic pressure: intrinsic variability and reference level. *Science of the Total Environment*, 409 (17): 3230-3236.
- Le Guernic, A., et al. (2016). "In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.)." *Ecotoxicology* 25(6): 1234-1259.
- Le Guernic, A., W. Sanchez, A. Bado-Nilles, O. Palluel, C. Turies, E. Chadili, I. Cavalié, L. Delahaut, C. Adam-Guillermin, J.-M. Porcher, A. Geffard, S. Betoulle and B. Gagnaire (2016). "In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.)." *Ecotoxicology*(6): 1234-1259.
- Le Guernic, A., W. Sanchez, O. Palluel, A. Bado-Nilles, M. Floriani, C. Turies, E. Chadili, C. D. Vedova, I. Cavalié, C. Adam-Guillermin, J.-M. Porcher, A. Geffard, S. Betoulle and B. Gagnaire (2016). "Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure." *Ecotoxicology*: 1-22.;
- Magniez, G., Franco, A., Geffard, A. et al. *Environ Sci Pollut Res* (2018) 25: 11252. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9256-2>
- Mazzitelli J.Y., Budzinski H., Cachot J., Geffard O., Marty P., Chiffre A., François A., Bonnafé E., Geret F. (2018). Evaluation of psychiatric hospital wastewater toxicity : What is its impact on aquatic organisms ? *Environmental Science and Pollution Research* <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2501-5>. ; ; Thèse Jean-Yves Mazzitelli : Evaluation de la toxicité de molécules médicamenteuses par une étude des réponses comportementales, physiologiques et transcriptomiques d'un mollusque dulçaquicole (*Radix balthica*) et d'un plathelminthe (*Schmidtea polychoira*).
- Ndiaye, A., W. Sanchez, J.-D. Durand, H. Budzinski, O. Palluel, K. Diouf, P. Ndiaye and J. Panfili (2012). "Multiparametric approach for assessing environmental quality variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species." *Environmental Science and Pollution Research* 19(9): 4133-4147.
- Palais F, Dedourge-Geffard O, Beaudon A, Pain-Devin S, Trapp J, Geffard O, Noury P, Gourlay-France C, Uher E, Mouneyrac C, Biagiante-Risbourg S, Geffard A (2012). One-year monitoring of core biomarker and digestive enzyme responses in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Ecotoxicology* , 21 (3) , pp. 888-905.
- Palais F, Mouneyrac C, Dedourge-Geffard O, Giambérini L, Biagiante S, Geffard A (2011). One-year monitoring of reproductive and energy reserve cycles in transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Chemosphere* 83(8) 1062-1073

- Paris-Palacios S, Delahaut L, Carreras A, Thomas M, Biagianni-Risbourg S (2013). Catalasic activity in fish liver: improvement of the UV to visible analytic method. *Fish Physiology and Biochemistry* 39, 957-966.;
- Paris-Palacios S., Vernet G. (2003) Evaluation de la qualité de quelques milieux aquatiques champenois utilisant des biomarqueurs hépatiques de gardons. *Le vigneron champenois* 7, 42-58.; 2ème Colloque Réseau Vignes et Vins Septentrionaux, Reims, France (2002) Evaluation de la qualité de quelques milieux aquatiques Champenois utilisant des biomarqueurs hépatiques de gardons. Paris-Palacios S. et Vernet G.
- Sanchez, W., B. Piccini, E. Maillot-Maréchal and J.-M. Porcher (2010). "Comparison of two reference systems for biomarker data analysis in a freshwater biomonitoring context." *Environment International* 36(4): 377-382.
- Sanchez, W., B. Piccini, J.-M. Ditché and J.-M. Porcher (2008). "Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring." *Environment International* 34(6): 791-798.
- Sanchez, W., O. Palluel, L. Meunier, M. Coquery, J. M. Porcher and S. Ait-Aissa (2005). "Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels." *Environ Toxicol Pharmacol* 19(1): 177-183.
- Sanchez, W., O. Palluel, L. Meunier, M. Coquery, J. M. Porcher and S. Ait-Aissa (2005). "Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels." *Environ Toxicol Pharmacol* 19(1): 177-183.;
- Sanchez, W., S. Ait-Aissa, O. Palluel, J. M. Ditché and J. M. Porcher (2007). "Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams." *Ecotoxicology* 16(2): 279-287.;
- Sanchez, W., B. Piccini and J. M. Porcher (2008). "Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.)." *J Environ Sci Health B* 43(1): 65-70.
- Sanchez, W., S. Ait-Aissa, O. Palluel, J. M. Ditché and J. M. Porcher (2007). "Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams." *Ecotoxicology* 16(2): 279-287.;
- Sanchez, W., W. Sremski, B. Piccini, O. Palluel, E. Maillot-Maréchal, S. Betoulle, A. Jaffal, S. Ait-Aissa, F. Brion, E. Thybaud, N. Hinfray and J.-M. Porcher (2011). "Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges." *Environment International* 37(8): 1342-1348.
- Santos, R., A. Joyeux, O. Palluel, M. Palos-Ladeiro, A. Besnard, C. Blanchard, J. M. Porcher, S. Bony, A. Devaux and W. Sanchez (2014). "Characterization of a genotoxicity biomarker in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): Biotic variability and integration in a battery of biomarkers for environmental monitoring." *Environmental Toxicology*.
- Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology*, 93: 225-233.

Références milieu aquatique de transition

- Luna-Acosta, A., Breitwieser, M., Renault, T., Thomas-Guyon, H. Recent findings on phenoloxidases in bivalves (2017) *Marine Pollution Bulletin*, Elsevier, 2017, 122 (1-2), pp.5 - 16.;
- Luna-Acosta A, Bustamante P, Budzinski H, Huet V, Thomas-Guyon H Persistent Organic Pollutants in a marine bivalve on the Marennes-Oleron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic coast) - Part 2: Potential biological effects. *Science of the Total Environment* 514, pp. 511-522.;
- Luna-Acosta, A., Kanan, R., Le Floch, S., Huet, V., Pineau, P., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H. Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil (2011) *Water Research*, 45 (14), pp. 4103-4118.;
- Luna-Acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., Haffner, P., de Decker, S., Renault, T., Thomas-Guyon, H. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes (2011) *Fish and Shellfish Immunology*, 31 (6), pp. 795-800.;

- Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (2010) *Fish and Shellfish Immunology*, 28 (4), pp. 719-726.
- Amara, R., Selleslagh, G., Billon, C., Minier, C. 2009. Growth and condition of 0-group European flounder, *Platichthys flesus* as indicator of estuarine habitat quality. *Hydrobiologia* 67:87-98;
- Barrick A., Marion J.-M., Perrein-Ettajani H., Châtel A., Mouneyrac C. 2018. Baseline levels of biochemical biomarkers in the endobenthic ragworm *Hediste diversicolor* as useful tools in biological monitoring of estuaries under anthropogenic pressure. *Marine Pollution Bulletin*. 129: 81–85.
- Bonnefille, B., Gomez, E., Alali, M., Rosain, D., Fenet, H., Courant, F., 2018. Metabolomics assessment of the effects of diclofenac exposure on *Mytilus galloprovincialis*: Potential effects on osmoregulation and reproduction. *Sci. Total Environ.* 613–614, 611–618. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.146.;
- Bonnefille B., Arpin-Pont L., Gomez E., Fenet H., Courant F. 2017. Metabolic profiling identification of metabolites formed in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) after diclofenac exposure. *Science of The Total Environment* 583, 257–268. Doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.063.;
- Courant F., Arpin-Pont L., Bonnefille B., Vacher S., Picot-Groz M., Gomez E., Fenet H., Exploring new effects of the anti-inflammatory drug diclofenac on the marine mussel *M. galloprovincialis*, *Environmental Science and Pollution Research*, in press, doi: 10.1007/s11356-017-9228-6.
- Henry F., I. Filipuci, G. Billon, L. Courcot, E. Kerambrun And R. Amara. 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.*, 2012, 14, 3211-3220.
- Ibtissem Louiz, Olivier Palluel, Mossadok Ben-Attia, Sélim Aït-Aïssa, Oum Kalthoum Ben Hassine, Liver histopathology and biochemical biomarkers in *Gobius niger* and *Zosterisessor ophiocephalus* from polluted and non-polluted Tunisian lagoons (Southern Mediterranean Sea), *Marine Pollution Bulletin*, Volume 128, 2018, Pages 248-258
- Ndiaye, A., W. Sanchez, J.-D. Durand, H. Budzinski, O. Palluel, K. Diouf, P. Ndiaye and J. Panfili (2012). "Multiparametric approach for assessing environmental quality variations in West African aquatic ecosystems using the black-chinned tilapia (*Sarotherodon melanotheron*) as a sentinel species." *Environmental Science and Pollution Research* 19(9): 4133-4147.
- Auffret M., Rousseau S., Boutet I., Tanguy A., Baron J., Moraga D and Duchemin M. 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63: 393-405.;
- Farcy E., Burgeot T., Haberkorn H., Auffret A., Lagadic L., Allenou J.-P., Budzinski H., Mazzella N., Pete R., Heydorff M., Menard D., Mondegue F. and Caquet T. 2013. An integrated environmental approach to investigate biomarker fluctuations in the blue mussel *Mytilus edulis* L. in the Vilaine estuary, France." *Environmental Science and Pollution Research – Special Publication*: 20 (2) : 630-650

Références en milieu marin côtier

- Luna-Acosta, A., Breitwieser, M., Renault, T., Thomas-Guyon, H. Recent findings on phenoloxidases in bivalves (2017) *Marine Pollution Bulletin*, Elsevier, 2017, 122 (1-2), pp.5 - 16.;
- Luna-Acosta A, Bustamante P, Budzinski H, Huet V, Thomas-Guyon H Persistent Organic Pollutants in a marine bivalve on the Marennes-Oleron Bay and the Gironde Estuary (French Atlantic coast) - Part 2: Potential biological effects. *Science of the Total Environment* 514, pp. 511-522.;
- Luna-Acosta, A., Kanan, R., Le Floch, S., Huet, V., Pineau, P., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H. Enhanced immunological and detoxification responses in Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, exposed to chemically dispersed oil (2011) *Water Research*, 45 (14), pp. 4103-4118.;
- Luna-Acosta, A., Saulnier, D., Pommier, M., Haffner, P., de Decker, S., Renault, T., Thomas-Guyon, H. First evidence of a potential antibacterial activity involving a laccase-type enzyme of the phenoloxidase system in Pacific oyster *Crassostrea gigas* haemocytes (2011) *Fish and Shellfish Immunology*, 31 (6), pp. 795-800.;
- Luna-Acosta, A., Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., Thomas-Guyon, H. First evidence of laccase activity in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (2010) *Fish and Shellfish Immunology*, 28 (4), pp. 719-726.

- Barrick A., Marion J-M., Perrein-Ettajani H., Châtel A., Mouneyrac C. 2018. Baseline levels of biochemical biomarkers in the endobenthic ragworm *Hediste diversicolor* as useful tools in biological monitoring of estuaries under anthropogenic pressure. *Marine Pollution Bulletin*. 129: 81–85.
- Ben Cheikh Y., Xuereb B., Boulangé-Lecomte C. and Le Foll F. (2018). Multixenobiotic resistance in *Mytilus edulis*: molecular and functional characterization of an ABCG2-type transporter in hemocytes and gills. *Aquatic Toxicology* 195:88-96 (IF 4,13:2016). ; <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.12.012>
- Bonnefille, B., Gomez, E., Alali, M., Rosain, D., Fenet, H., Courant, F., 2018. Metabolomics assessment of the effects of diclofenac exposure on *Mytilus galloprovincialis*: Potential effects on osmoregulation and reproduction. *Sci. Total Environ.* 613–614, 611–618. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.146.
- Bonnefille B., Arpin-Pont L., Gomez E., Fenet H., Courant F. 2017. Metabolic profiling identification of metabolites formed in Mediterranean mussels (*Mytilus galloprovincialis*) after diclofenac exposure. *Science of The Total Environment* 583, 257–268. Doi:10.1016/j.scitotenv.2017.01.063
- Breitwieser et al., 2016, 2017, 2018
- Courant F, Arpin-Pont L, Bonnefille B, Vacher S, Picot-Groz M, Gomez E, Fenet H, Exploring new effects of the anti-inflammatory drug diclofenac on the marine mussel *M. galloprovincialis*, *Environmental Science and Pollution Research*, in press, doi: 10.1007/s11356-017-9228-6.
- Charmantier G., Charmantier-Daures M. & Young-Lai W.W., 1985 - Lethal and sub-lethal effects of Dennison mines potash brine on different stages of the Lobster, *Homarus americanus*. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.*, 1344, 1-13. doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.07.066
- Erraud et al. (2018). Use of sperm DNA integrity as a marker for exposure to contamination in *Palaemon serratus* (Pennant 1777): Intrinsic variability, baseline level and in situ deployment. *Water Res.* 132: 124-134.
- G. Deviller, O. Palluel, C. Aliaume, H. Asanthi, W. Sanchez, M.A. Franco Nava, J-P. Blancheton, C. Casellas, Impact assessment of various rearing systems on fish health using multibiomarker response and metal accumulation, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Volume 61, Issue 1, 2005, Pages 89-97
- Riout D., Ben Cheikh Y., Péden R., Bultelle F., Betoulle S., Lebel J-M., and Le Foll F. (2014). Motility of adherent hemocytes as a potential marker of immunocompetence and immunotoxic effects in bivalves. *Journal of Xenobiotics* 4: 76-77. doi:10.4081/xeno.2014.4896
- Riout D., Pasquier J., Boulangé-Lecomte C., Poret A., Abbas I., Marin M., Minier M. and Le Foll F. (2014). The multi-xenobiotic resistance (MXR) efflux activity in hemocytes of *Mytilus edulis* is mediated by an ATP binding cassette transporter of class C (ABCC) principally inducible in eosinophilic granulocytes. *Aquatic Toxicology*. 153:98-109. (IF 3.73 : 2013).; <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.11.012>