

IRSN

INSTITUT
DE RADIOPROTECTION
ET DE SÛRETÉ NUCLÉAIRE

Faire avancer la sûreté nucléaire

Effets sublétaux d'une contamination
métallique liée à des rejets miniers
uranifères sur l'épinoche à trois épines
(*Gasterosteus aculeatus* L.).
Implication dans la susceptibilité envers
un stress biologique.

Antoine Le Guernic

Novembre 2015

N° ISRN/IRSN-2016/186

Laboratoire d'écotoxicologie des radionucléides (LECO)



Systeme de management
de la qualite IRSN certifie



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE – ARDENNE

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE – ARDENNE

Discipline : **Physiologie et biologie des organismes – populations - interactions**

Spécialité : **Ecotoxicologie**

présentée et soutenue publiquement par :

Antoine LE GUERNIC

le 24 Novembre 2015

**Effets sublétaux d'une contamination métallique liée à des rejets miniers
uranifères sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.).
Implication dans la susceptibilité envers un stress biologique.**

JURY

M. Alain GEFFARD	Professeur Université de Reims	Président
Mme Magalie BAUDRIMONT-LARUE	Professeur Université de Bordeaux	Rapporteur
M. Patrice COUTURE	Professeur INRS	Rapporteur
Mme Anne BADO-NILLES	Chercheur INERIS	Examinatrice
M. Christophe MINIER	Professeur ONEMA	Examineur
M. Stéphane BETOULLE	Professeur Université de Reims	Codirecteur
M. Wilfried SANCHEZ	Directeur fondation ROVALTAIN	Codirecteur
Mme Béatrice GAGNAIRE	Chercheur IRSN	Tutrice

« Nous n'héritons pas de la terre de nos parents, nous l'empruntons à nos enfants. »

Antoine de Saint-Exupéry

A mon frère et ma sœur

Remerciements

J'exprime toute ma gratitude à Magalie Baudrimont et Patrice Couture qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse ainsi qu'à Anne Bado-Nilles, Christophe Minier et Alain Geffard pour leur participation à ce jury.

Je voudrais ensuite remercier chaleureusement mes trois encadrants de thèse, qui m'ont donné l'opportunité de réaliser ce travail :

Stéphane, tu es celui sans qui je ne serais pas là où je suis actuellement. Tu as réussi à transmettre ta passion pour ton travail et tu m'as poussé à prolonger en recherche après ma première année de master! Merci pour la découverte de ce superbe appareil qu'est le cytomètre en flux (même dans une pièce de 5 m² sans fenêtre). Je n'oublierai pas ta fête le 18 avril !

Béatrice, un énorme merci pour ton encadrement parfait. Tu m'as laissé le temps de m'épanouir tout en restant à mes côtés, et en m'encourageant lors de mes nouvelles envies d'expérimentation ! Je tiens aussi à te remercier pour ta grande sympathie, dans le boulot et à l'extérieur, pour ta disponibilité et ta réactivité. J'ai appris beaucoup de toi, et j'ai beaucoup de bons souvenirs (y compris casser la glace en surface des étangs).

Wilfried, je t'adresse mes profonds remerciements pour tes conseils avisés, ta confiance et pour avoir continué de me suivre après avoir pris une autre fonction certainement bien captivante. Je tiens à te remercier également pour tous les temps d'échanges partagés, au téléphone ou dans ton bureau. Aussi, je suis obligé de te remercier pour ton réfrigérateur à l'agonie lors de mon rapide passage en pré-retraite.

Un grand merci à vous trois pour tout ce que vous m'avez apporté! Je me suis toujours senti écouté et conseillé, et vous avez rendu cette thèse agréable à vivre.

Avant de décomposer ces remerciements par laboratoire, je souhaiterais remercier les directeurs de chaque unité, qui m'ont ouvert leurs portes. Alain, Christelle et Jean-Marc, vous m'avez touché par votre simplicité, vos qualités humaines et votre disponibilité. Vous avez pris le temps de m'écouter, de vous attarder sur mes problèmes techniques ou scientifiques et je

vous en remercie grandement. Je souhaiterais aussi remercier Jean Laroche, qui m'a fait l'honneur de me conseiller et de m'orienter, lors des comités de pilotage.

Ma thèse m'ayant permis de travailler dans plusieurs laboratoires ainsi que sur le terrain, beaucoup de personnes m'ont aidé, aussi bien professionnellement que personnellement.

Un grand merci à l'équipe de l'unité d'écotoxicologie in vitro et in vivo, de INERIS (maintenant UMR_I 02 SEBIO) car j'ai été incroyablement accueilli à chacune de mes venues. Citer toutes les personnes serait long, mais sachez tous que votre accueil et sympathie m'ont vraiment touché. Anne, je n'oublierai jamais nos longues conversations passées à commenter mes résultats de cytométrie à l'étage du bâtiment préfabriqué, ni tes encouragements et conseils. Olivier (Palluel), un merci d'abord pour ta grande sympathie, ton humour et ton investissement dans mes travaux. Merci aussi pour les soirées organisées par tes soins. Je tiens également à te remercier pour tes conseils quant au choix des pâtisseries de la cantine. Edith, je te remercie grandement pour ta bonne humeur, présente dès le petit déjeuner, ton partage, tes connaissances et ton écoute, et surtout ton accueil souriant et enthousiasmant lorsque je venais à Creil. Cyril, je ne peux que te remercier pour tout ce que tu as réalisé, pour moi et pour mes expériences. Un énorme merci pour le temps que tu as dû passer à apprendre la couture sur cage (encore bravo), pour avoir bichonné les épinoches, ainsi que pour ton humour et ta joie de vivre. J'en profite pour remercier le personnel de l'atelier de l'INERIS pour la construction des cages dans un temps record.

Je voudrais ensuite remercier les chercheurs du Nord (Wimereux ULCO-LOG), qui, malgré ma courte visite, m'ont accueilli à bras ouverts, ne dérogeant pas aux règles de sympathie des gens du Ch'nord. Je souhaiterais remercier plus amplement Rachid Amara et Elodie Kerambrun qui ont pris de leur temps pour mes travaux.

Je n'oublierai pas mon tout premier laboratoire, l'ancien laboratoire d'Interactions Animal-Environnement de Reims, maintenant devenu UMR_I02 SEBIO. Merci beaucoup Laurence, Elise, Sabrina, Aurélie, Marc, Odile, Virginie, Melissa, Laetitia, Ali... Je ne peux pas tous les citer, mais leur esprit de famille, leurs précieux conseils, leur intérêt pour les petits stagiaires de M1

et leur gentillesse m'ont fait adorer la recherche au sein de ce laboratoire. Conservez toujours votre bonne ambiance ! Une pensée toute particulière à Lauris, compatriote de Metz et ami. Merci pour ces très bons moments passés en ta compagnie (en attendant les prochains), que ce soit en refaisant le monde de la cytométrie, ou bien au ping-pong. Merci à toi et à Aude pour votre aide pour le pot de soutenance et votre accueil ! Bon courage pour la fin de la thèse !

J'exprime toute ma gratitude aux trois équipes du SERIS de l'IRSN pour tous ces bons moments passés ensemble, pour leur soutien et sympathie. Tout comme les autres laboratoires, je ne pourrais pas nommer tout le monde, mais vous restez chaleureusement dans mon cœur. Un grand merci à Isabelle pour sa participation accrue dans ma thèse, pour les kilomètres avalés ensemble entre le laboratoire et les étangs. Pour leur forte implication dans les analyses, merci beaucoup à Virginie, Sylvie, Loïc, Daniel et Sandrine (Frelon). Sandrine, merci pour ta voiture. Une forte pensée à Magali pour son écoute, sa façon d'être et sa curiosité. Un grand merci à Claudine et Clara, toutes les deux attentionnées et efficaces pour que cette thèse se déroule sans accroc. Merci à Laureline, Frédéric, Arnaud, Rodolphe, et Christelle pour la collocation et les bons souvenirs de Barcelone. Mes plus sincères remerciements à Olivier (Simon), pour ta relecture, tes conseils, ton intérêt pour mes travaux et pour les expériences réalisées ensemble ! J'ai beaucoup apprécié travailler avec toi. Je remercie également Nicolas (Dubourg), Sandrine (Pereira) et Guillaume pour leurs qualités humaines et leur amitié.

Un grand merci à tous les docorants, stagiaires et post-doc pour la si bonne ambiance à l'IRSN. Vanessa, Léa, Magalie, Marie, Amine, Moustapha, Delphine, Morgan, Guillaume, Nicolas (le grec), Yvan, Ingrid, Shin, Audrey, Iris, Sébastien, Florence, Lucy, Mira. Pour nos conversations sportives (au sens propre du terme), merci Loïc. Laure, j'ai vraiment apprécié ta compagnie, ainsi que celle de Bastien, vous êtes simples et très sympathiques ! Ma petite Cécile, merci beaucoup pour tous ces moments de fou-rire et de jeu, ne change rien. PS : c'est toi qui nous a dévergondé, et pas l'inverse... Adeline, tu as parfaitement rempli ton rôle de doyenne des thésards pendant plus d'un an, en nous épaulant et en nous montrant le chemin à suivre. Merci énormément, ainsi qu'à Ben pour les soirées, les dégustations de maroilles et bières, et pour vos expression bien de chez vous ! Adrien, je tiens à te remercier grandement pour ta

générosité, aussi bien lors de mes questionnements qu'en amitié ! J'espère te revoir bientôt pour de nouvelles parties de volley-ball endiablées. Reste enfin mes deux acolytes, Flo et Kew ! Ces quelques lignes sont vraiment trop courtes pour exprimer tous ces bons souvenirs et à quel point ma thèse aurait été différente si vous n'étiez pas là ! Je ne vous remercierais jamais assez d'avoir été à mes côtés et d'avoir partagé les bonnes et mauvaises nouvelles ! Merci aussi pour tous ces bons moments hors labo, pour les quelques paris lancés (vivre à Barcelone avec 20 cents, faire de l'oculothérapie, etc.). Je suis fier d'avoir pu partager ce projet professionnel avec vous ! PS : Il nous reste un clip à tourner.

Il me semble difficile de ne pas remercier chaleureusement les courageux qui ont bravés les heures de route, le froid et la pluie du Limousin et du Cantal, mais aussi le roseau plaqué aux murs de l'hôtel ainsi que ses magnifiques peintures matinales. Ces nobles aventuriers ont permis de recueillir la quasi-totalité des résultats présents dans ce manuscrit. Parmi eux, certains n'ont pas encore été remerciés : Nicolas Piasecki, merci beaucoup pour ton investissement lors des mises en cages et des temps de prélèvement. Merci aussi à Marine Blachon et Anaëlle Bernard.

PS : ces expériences in situ ont aussi débouchées sur de nombreuses photographies, en ma possession, pouvant être envoyées à la demande.

Mes pensées vont aussi envers les propriétaires de chaque étang, qui m'ont laissé réaliser les études sereinement, et merci à ceux avec qui j'ai pu discuter et expliquer mes recherches. Je remercie donc M. Salvary, M. Morange, Mme et M. Beau D'Arboussier, Mme et M. Pouyaud, M. Boulestin, Mme Dubois Tabaud et M. Horry.

Enfin, je tiens à exprimer toute mon affection à ma famille et amis, et notamment à mes parents qui se sont toujours intéressés à mes envies et mon futur. Merci de m'avoir poussé et soutenu.

Mes toutes dernières pensées vont à la femme qui partage ma vie, qui a dû me rassurer, m'encourager et bien sûr me supporter tout au long du doctorat.

Communications scientifiques

Publications scientifiques de rang A

Le Guernic A, Sanchez W, Bado-Nilles A, Palluel O, Turies C, Chadili E, Cavalié I, Delahaut L, Adam-Guillermin C, Porcher JM, Geffard A, Betoulle S, Gagnaire B. *In situ* effects of metal contamination from former uranium mining sites on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) health. Article soumis à *Ecotoxicology* en juillet 2015.

Le Guernic A, Sanchez W, Palluel O, Bado-Nilles A, Turies C, Chadili E, Cavalié I, Adam-Guillermin C, Porcher JM, Geffard A, Betoulle S, Gagnaire B. *In situ* experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*, L.). Article accepté par *Fish Physiology and Biochemistry* en novembre 2015.

Le Guernic A, Sanchez W, Palluel O, Bado-Nilles A, Floriani M, Turies C, Chadili E, Della Vedova C, Cavalié I, Adam-Guillermin C, Porcher JM, Geffard A, Betoulle S, Gagnaire B. How a polymetallic contamination affect the acclimation capacities of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) after a sudden biological stress? Article soumis à *Ecotoxicology* en novembre 2015.

Le Guernic A, Félix C, Bigot A, David E, Dedourge-Geffard O, Geffard A, Betoulle S. 2015. Food deprivation and modulation of hemocyte activity in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Journal of Shellfish Research* 34(2): 423-431.

Autre publication scientifique

Le Guernic A, Sanchez W, Betoulle S, Gagnaire B. 2014. Multi-metallic contamination around former uranium mines induces adverse effects and acclimation disturbance in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Journal of Xenobiotics* 4 : 4904 : 92-93.

Communications orales

Le Guernic A, Gagnaire B, Betoulle S, Sanchez W. Evaluation de la génotoxicité par cytométrie en flux. 10^{ème} colloque du Réseau Atlantique d'écotoxicologie ECOBIM, 20 au 23 mai 2014, Brest, France.

Le Guernic A, Gagnaire B, Betoulle S, Sanchez W. Assessment of immune capacity and their acclimatisation in a context of polymetallic contamination, around former uranium mines, in three-spined stickleback ». 10^{ème} congrès international du Groupement de Recherche Universitaire sur les Techniques de Traitement de d'Épuration des Eaux (GRUTTEE), 29 au 31 octobre 2014, Limoges, France.

Le Guernic A, Sanchez W, Turies C, Chadili E, Bado-Nilles A, Palluel O, Cavalie I, Betoulle S, Gagnaire B. Evaluation of immune and acclimation capacities of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) in polymetallic contamination context. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC) Europe 25th annual meeting, 3 au 7 mai 2015, Barcelone, Espagne.

Le Guernic A, Sanchez W, Turies C, Chadili E, Bado-Nilles A, Palluel O, Cavalie I, Betoulle S, Gagnaire B. Evaluation des capacités de défenses immunitaires et de leur acclimatation dans un contexte de contamination polymétallique chez l'épinoche à trois épines. Congrès de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), 1 et 2 juillet 2014, Besançon, France.

Communications affichées et présentées

Le Guernic A, Gagnaire B, Betoulle S, Sanchez W. Evaluation des capacités de défenses immunitaires et de leur acclimatation dans un contexte de contamination polymétallique chez l'épinoche à trois épines. 10^{ème} colloque du Réseau Atlantique d'écotoxicologie ECOBIM, 20 au 23 mai 2014, Brest, France.

Le Guernic A, Sanchez W, Turies C, Chadili E, Bado-Nilles A, Palluel O, Cavalie I, Betoulle S, Gagnaire B. Assessment of immune capacities and their acclimatization in a context of multi-metallic contamination around former uranium mines in three-spined stickleback. 3rd International Conference on Radioecology and Environmental Radioactivity (ICRER), 7 au 12 septembre 2014, Barcelone, Espagne.

Résumé

L'extraction de l'uranium a eu pour conséquence une remobilisation de cet actinide au niveau des écosystèmes avoisinants les mines. L'utilisation de sels métalliques lors de la réhabilitation des sites miniers et la présence naturelle de métaux ont accentué les niveaux de la contamination métallique dans les hydrosystèmes soumis aux rejets miniers uranifères.

Des expériences *in situ* ont été conduites au niveau de deux anciens sites miniers uranifères français. L'encagement de l'épinoche à trois épines a été employé pour connaître les effets sublétaux de ce mélange métallique, ainsi que sur la susceptibilité de ce poisson envers un stress biologique.

Cette pollution, caractérisée par de plus importantes concentrations métalliques (notamment en uranium), a entraîné un stress oxydant chez l'épinoche visible sur plusieurs biomarqueurs, ainsi que d'autres effets dépendants du site d'exposition.

La contamination polymétallique a occasionné une augmentation de la susceptibilité des épinoches au stress biologique, en empêchant leurs réponses phagocytaire antioxydante à ce stress. Ces travaux ont permis de renforcer l'intérêt de la technique d'encagement lors d'une étude environnementale, et celui des immunomarqueurs au sein d'une approche multi-biomarqueurs.

Mots-clés : contamination polymétallique ; approche multi-biomarqueurs ; système immunitaire ; susceptibilité ; encagement ; épinoche à trois épines.

Sublethal effects of a metal contamination due to uranium mine tailings in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). Implication in the susceptibility to a biological stress.

Abstract

Uranium extraction has resulted in a remobilisation of this actinide into mine surrounding ecosystems. Uses of metal salts during mining site rehabilitation, and the natural presence of metals have increased the metal contamination in hydrosystems submitted to mine tailings.

In situ experiments were conducted in two former French uranium mining sites. Three-spined stickleback caging was used to determine the sublethal effects of this metal mixture on this freshwater fish, as well as its effects on fish susceptibility to a sudden biological stress.

This pollution, characterised by higher metal concentrations (especially for uranium), has led to an oxidative stress in sticklebacks visible through several biomarkers, and other effects dependent on the study site.

The polymetallic contamination has modified the stickleback responses to the biological stress, by preventing their phagocytic and antioxidant responses. This work has reinforced the interest of the caging technique during environmental studies and that of immunomarkers in a multi-biomarker approach.

Keywords: polymetallic contamination; multi-biomarker approach; immune system; susceptibility; caging; three-spined stickleback.

Avant-propos

Ces travaux de thèse ont été accomplis en codirection entre deux laboratoires :

- Le laboratoire d'écotoxicologie des radionucléides (LECO) au sein de l'Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire (IRSN), basé à Cadarache (13115 Saint-Paul-lez-Durance, France).
- L'unité d'écotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, de l'Institut National de l'Environnement industriel et des RISques (INERIS), faisant maintenant partie de l'UMR-I 02 SEBIO (Stress Environnementaux et BIOSurveillance des milieux aquatiques) avec l'université de Reims Champagne-Ardenne (URCA) et l'université du Havre (ULH). Cette unité est basée dans l'Oise (60550 Verneuil-en-Halatte, France).

Cette thèse s'articule autour d'articles scientifiques en anglais, constituant trois chapitres qui englobent la partie « matériels et méthodes » et les résultats. Avant chaque article scientifique, un résumé en français synthétisera les objectifs, les expériences et les principaux résultats.

Le chapitre 6 traitant des possibles effets de l'encagement a volontairement été mis après les études écotoxicologiques *in situ* utilisant ce système pour calquer aux décisions prises durant la thèse.

Sur ce, bonne lecture.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES TABLEAUX.....	23
LISTE DES FIGURES.....	27
LISTE DES ABREVIATIONS.....	31
CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE.....	33
CHAPITRE 2 – ETAT DE L’ART.....	39
1. Le risque environnemental.....	40
1.1. Généralités.....	40
1.2. La démarche de l’évaluation du risque environnemental.....	41
1.3. Les programmes de surveillance.....	43
1.3.1. De la surveillance chimique à la surveillance biologique.....	43
1.3.2. Les outils de la biosurveillance.....	46
1.4. Les modalités des études environnementales <i>in situ</i>	49
1.4.1. Généralités.....	49
1.4.2. L’engagement.....	50
2. Un outil : le biomarqueur.....	52
2.1. Evolution de la notion de biomarqueur.....	52
2.2. Les immunomarqueurs.....	56
2.2.1. Quelques rôles physiologiques du système immunitaire.....	56
2.2.1.1. Défense humorale de l’immunité innée.....	56
2.2.1.2. Défense cellulaire de l’immunité innée.....	57
2.2.2. Intérêts et limites des immunomarqueurs.....	61
2.3. Les biomarqueurs du stress oxydant.....	64
2.3.1. Le stress oxydant.....	64
2.3.2. Activités antioxydantes non-enzymatiques.....	65

2.3.3.	Activités antioxydantes enzymatiques	67
2.3.4.	Le dommage oxydatif.....	67
2.3.5.	Intérêts et limites des marqueurs du stress oxydant	69
2.4.	Autres biomarqueurs de dommage	71
2.4.1.	Les biomarqueurs de génotoxicité	71
2.4.2.	L'intégrité de la membrane lysosomale	74
2.4.3.	Biomarqueurs de mort cellulaire	75
2.5.	Les métallothionéines	77
2.6.	Les biomarqueurs de neurotoxicité.....	78
2.7.	Les indices morphométriques	80
3.	Les stratégies de réponse au stress	81
4.	Les mines d'uranium en France	84
4.1.	L'extraction de l'uranium en France.....	84
4.2.	Problème environnemental lié à ces anciens sites miniers	86
5.	Le stress chimique métallique et le stress biologique	88
5.1.	Le stress chimique lié aux métaux.....	88
5.1.1.	L'uranium	89
5.1.2.	L'aluminium.....	90
5.1.3.	Le baryum	90
5.1.4.	Le fer	91
5.1.5.	Le manganèse	91
5.2.	Le stress biologique	93
5.2.1.	Les différents types de stress biologique	93
5.2.2.	La toxicité des lipopolysaccharides	94
5.3.	La combinaison de stress	95
5.3.1.	La contamination polymétallique.....	95
5.3.2.	La combinaison stress chimique et stress biologique	97
CHAPITRE 3 : JUSTIFICATIONS DES CHOIX METHODOLOGIQUES		103
1.	Les sites uranifères retenus	104
2.	Le modèle biologique retenu.....	107
3.	Les analyses retenues	110
4.	Rappel des objectifs de la thèse	112

CHAPITRE 4 : EFFETS SUBLETAUX DE LA CONTAMINATION METALLIQUE SUR L'EPINOCHÉ ..	113
1. Résumé de l'article scientifique	114
1.1. Objectifs	114
1.2. Matériels et méthodes	114
1.3. Principaux résultats et discussion.....	115
2. Article scientifique	119
CHAPITRE 5 : IMPACTS DE LA CONTAMINATION POLYMETALLIQUE LIEE AUX REJETS MINIERES SUR LES REPONSES DE L'EPINOCHÉ A UN STRESS BIOLOGIQUE.....	163
1. Manipulation préliminaire	164
1.1. Application du stress biologique	164
1.2. Mesures des effets du stress biologique	165
1.3. Observations des effets du stress biologique.....	166
1.4. Conclusion : choix du stress biologique.....	169
2. Résumé de l'article scientifique	171
2.1. Objectif.....	171
2.2. Matériels et méthodes	171
2.3. Principaux résultats et discussion.....	172
3. Article scientifique	177
CHAPITRE 6 : EFFETS DE CONTRAINTES LIEES A LA MANIPULATION <i>IN SITU</i>	215
1. Résumé de l'article	216
1.1. Objectifs	216
1.2. Matériels et méthodes	216
1.2.1. La densité des épinoches dans les cages	216
1.2.2. Le jeûne de 14 jours.....	217
1.2.3. Vingt minutes de transport	217
1.2.4. Analyses effectuées	217
1.3. Principaux résultats et discussion.....	218
2. Article scientifique	220
CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE.....	249
1. Les rejets miniers uranifères.....	250
1.1. La composition métallique des rejets miniers.....	250
1.2. D'autres sources de contamination.....	253

1.2.1.	Sources chimiques et biologiques	253
1.2.2.	Sources de radioactivité	253
1.3.	Accumulation des métaux dans les organes des épinoches.....	255
2.	Toxicité du mélange métallique lié aux rejets miniers.....	257
2.1.	Effets sublétaux chez l'épinoche	257
2.1.1.	Déséquilibre de la balance oxydante	258
2.1.1.1.	Effets pro-oxydants	259
2.1.1.2.	Le système antioxydant	259
2.1.1.3.	Les dommages oxydatifs	262
2.1.2.	Impacts sur l'intégrité de la membrane lysosomale	263
2.1.3.	Impacts sur le système immunitaire	264
2.1.3.1.	Impacts sur les cellules immunitaires	264
2.1.3.2.	Impacts sur la capacité de phagocytose	266
2.1.4.	Impacts sur les indices de condition	267
2.1.5.	Autres effets sublétaux	268
2.2.	Modification de la susceptibilité de l'épinoche à un stress biologique	270
3.	Quelques interférences	275
3.1.	Liées au sexe des épinoches.....	275
3.2.	Liées à des facteurs abiotiques.....	279
3.2.1.	Les variations saisonnières des concentrations métalliques.....	279
3.2.2.	Les variations saisonnières des effets sublétaux.....	283
3.2.3.	Les variations des conditions environnementales	286
3.2.3.1.	Les variations de température dans les étangs.....	286
3.2.3.2.	Les variations des autres paramètres physico-chimiques de l'eau.....	290
3.2.4.	L'encagement et ses contraintes	295
CHAPITRE 8 :	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	297
1.	Réponses aux objectifs de la thèse	298
2.	L'intérêt d'une approche multi-biomarqueurs	300
3.	L'intérêt de l'analyse de l'immunotoxicité.....	301
4.	L'intérêt de l'épinoche.....	301
5.	Questions laissées en suspens	302
5.1.	Une acclimatation à la contamination polymétallique est-elle possible ?	302

5.2. Que se passe-t-il pendant le temps de latence entre injection et dissection ?....	303
5.3. Et si le stress biologique était infectieux ?.....	305
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	307
ANNEXES.....	335

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Liste des avantages et inconvénients de la biosurveillance passive et active avec un modèle poisson.	46
Tableau 2 : Liste non exhaustive d'effets des métaux (U, Al, Fe, Mn) sur le poisson, en fonction de la concentration métallique, de la voie et de la durée d'exposition.	92
Tableau 3 : Exemples d'études mettant en avant les effets d'une exposition à un métal, ou à un mélange de métaux sur la susceptibilité envers un stress biologique (bactéries, LPS, virus, parasites) chez un poisson.	99
Tableau 4 : Liste et description des anciens sites miniers proches des étangs d'intérêt de Haute-Vienne et du Cantal. Les chiffres correspondent aux anciens sites miniers localisés sur la figure 2. <i>Source : IRSN (2007)</i>	106
Tableau 5 : Résumé des paramètres analysés lors des expériences <i>in situ</i> avec les milieux / organes et analyses correspondants.	111
Tableau 6 : Nature des biomarqueurs analysés, méthodes de mesure et organes associés lors de l'expérience <i>in situ</i> d'avril 2013.	115
Tableau 7 : Moyenne des concentrations des cinq métaux majoritaires (en µg/L) dans les étangs de Haute-Vienne et du Cantal au D14 lors de l'expérimentation d'avril 2013. Les écart-types, les valeurs du D28 ou les autres paramètres physico-chimiques analysés peuvent être observés dans le tableau 1 de l'article scientifique. C : étang contaminé. R : étang de référence.	116
Tableau 8 : Nature des biomarqueurs analysés, méthodes de mesure et organes associés lors de l'expérience de laboratoire de septembre 2013.	166
Tableau 9 : Différences observées sur quatre immunomarqueurs entre des épinoches qui n'ont pas subi d'anesthésie ou d'injection (Témoins anesthésie), n'ayant subi que l'anesthésie (Témoins injection) et des épinoches sacrifiées un jour après l'injection de PBS. a et b désignent des différences significatives entre les différentes conditions ($p \leq 0,05$). IML : intégrité de la membrane lysosomale ; ROS b. : production basale d'ERO ; ROS s. : production stimulée d'ERO ; SI : index de stimulation de la flambée oxydative.	166

Tableau 10 : Nature des biomarqueurs analysés, méthodes de mesure et organes associés lors de l'expérience <i>in situ</i> d'avril 2014.....	172
Tableau 11 : Moyenne des concentrations des cinq métaux majoritaires (en µg/L) dans les étangs de Haute-Vienne lors de l'expérimentation d'avril 2014. Les écart-types ou les autres paramètres physico-chimiques analysés peuvent être observés dans le tableau 1 de l'article scientifique. C : étang contaminé. R : étang de référence, LD : limite de détection.	173
Tableau 12 : Nature des biomarqueurs analysés, méthodes de mesure et organes associés lors des expériences sur les contraintes liées à l'encagement ou aux manipulations <i>in situ</i> . Les croix informent de la présence des analyses pour l'expérience réalisée (densité, jeûne ou transport).	218
Tableau 13 : Liste des concentrations métalliques (U, Al, Fe, Mn et Ba) en µg/L retrouvées dans la fraction totale ou dissoute de l'eau de surface au niveau de plans ou cours d'eau impactés par d'anciens sites miniers uranifères. NA : non analysé.....	251
Tableau 14 : Limite de détection des appareils de mesure pour les analyses de HAP, PCB, COV et 6 pesticides des trois étangs de Haute-Vienne. Analyses réalisées par le laboratoire des eaux de la ville de Limoges.	253
Tableau 15 : Radioactivité (en Bq/kg) des produits de dégradation de l'uranium évaluée dans les sédiments des étangs du Cantal (en bleu) et de la Haute-Vienne (en vert) au D28 ($n = 1$). Les valeurs en gras indiquent la radioactivité la plus forte par département et par radionucléide. LD : limite de détection.	254
Tableau 16 : Liste des similarités et différences sur les résultats obtenus au D14 des deux expériences <i>in situ</i> en Haute-Vienne. Un (-) signifie que le niveau du biomarqueur est significativement plus faible pour les épinoches encagées dans l'étang indiqué que pour celles encagées dans les deux étangs, et inversement pour le (+). K : indice de condition de Fulton, HSI : indice hépatosomatique, Nec. : nécrose leucocytaire, Lympho. : pourcentage de lymphocytes, IML : intégrité de la membrane lysosomale, ROS b. : activité oxydative basale, Phago. : capacité de phagocytose, CAT : catalase, SOD : superoxyde dismutase, GSH : glutathion total, Gr : glutathion réductase, GPx : glutathion peroxydase, TBARS : substances réactives à l'acide Thio barbiturique, DNA : dommages à l'ADN.....	258
Tableau 17 : corrélations (test de Pearson) entre la peroxydation lipidique (TBARS) et la production basale d'ERO en fonction des expériences et des départements. S : corrélation significative ; NS : corrélation non-significative ($\alpha = 5\%$).	262
Tableau 18 : Effets des LPS sur des biomarqueurs de l'épinoche en fonction de la localisation de l'expérience (laboratoire ou terrain). Sauf indication entre parenthèses, ces réponses ou effets ont été observés 4 jours après les injections. La capacité de phagocytose n'a pas pu être évaluée 4 jours après les injections de LPS (problème lié à l'analyse). Néc. :	

nécrose leucocytaire ; Apop. : apoptose leucocytaire ; ROS s. : activité oxydative stimulée ; SI : index de stimulation de la flambée oxydative ; Phago. : capacité de phagocytose ; GSH : glutathion total ; GST : glutathion-S-transférase ; CAT : catalase S : effet significatif ; NS : effet non significatif ; Js : effet significatif observé seulement dans l'étang de la Jonchère Saint-Maurice ; Po : effet significatif observé seulement dans l'étang de Pontabrier..... 270

Tableau 19 : Interactions entre stress chimique (variable étang) et stress biologique (variable injection) via des analyses de la variance (ANOVA) à un ou deux facteurs. Seules les interactions significatives sont présentées, avec ●: $0.05 > p \geq 0.10$; *: $0.01 > p \geq 0.05$; **: $0.001 > p \geq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$). K : indice de condition de Fulton ; HSI : indice hépatosomatique ; Néc. : nécrose leucocytaire ; Apop. : apoptose leucocytaire ; Ly : pourcentage de lymphocytes ; IML : intégrité de la membrane lysosomale ; Phago. : capacité de phagocytose ; ROS b. : activité oxydative basale ; ROS s. : activité oxydative stimulée ; SI : index de stimulation de la flambée oxydative ; Gr : glutathion réductase ; GPx : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion total ; GST : glutathion-S-transférase ; CAT : catalase ; SOD : superoxyde dismutase ; TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique. 271

Tableau 20 : Différences entre épinoches mâles et femelles sur l'ensemble des biomarqueurs analysés lors des trois expérimentations *in situ* réalisées. La colonne de droite résume le nombre de différences significatives entre les sexes observées pour un biomarqueur donné. Les biomarqueurs non analysés lors d'une expérience sont hachurés. Un astérisque désigne une différence significative pour un biomarqueur entre mâles et femelles, avec * : $0,01 < p \leq 0,05$; ** : $0,001 < p \leq 0,01$ et *** : $p \leq 0,001$. K : indice de condition de Fulton, HSI : indice hépatosomatique, Nec. : nécrose leucocytaire, Lympho. : pourcentage de lymphocytes, IML : intégrité de la membrane lysosomale, Phago. : capacité de phagocytose, ROS b. : activité oxydative basale, ROS s. : activité oxydative stimulée, SI : index de stimulation de la flambée oxydative, DNA : dommages à l'ADN, GSH : glutathion total, Gr : glutathion réductase, GPx : glutathion peroxydase , CAT : catalase, SOD : superoxyde dismutase, TBARS : substances réactives à l'acide Thio barbiturique , AChE : acétylcholinestérase, MT : métallothionéines. 277

Tableau 21 : Moyennes \pm écart-types des concentrations (en $\mu\text{g/L}$) des métaux contenus dans la fraction dissoute des eaux des différents étangs du Cantal et du Limousin lors des différentes expérimentations *in situ*. Pour chaque expérimentation, la valeur de la concentration provient du temps de prélèvement D14. Les valeurs des NOEC sont choisies sur un poisson d'eau douce (excepté pour le baryum) et si possible avec un temps de 30 jours. Les références correspondantes aux NOEC (en $\mu\text{g/L}$) sont inscrites dans la colonne de droite. Une case blanche désigne un métal non mesuré lors d'une expérience. LD : limite de détection. NOEC : No-Observed Effect Concentration (concentration la plus forte à laquelle aucun effet n'est observé). 282

Tableau 22 : Corrélation entre les concentrations en Ca et Mg dans la fraction dissoute de l'eau des six étangs et la bioaccumulation des 5 métaux majoritaires dans les trois organes des épinoches. Les valeurs en rouge sont des corrélations significatives (test de Pearson, $\alpha = 5 \%$).....	294
Tableau 23 : résumé des effets observés ou de l'absence d'effets sublétaux de la contamination polymétallique sur l'épinoche ainsi que sur sa susceptibilité envers un stress biologique soudain (injection de LPS).	299

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Une du New York Times du 16 janvier 1972 : « Uranium : bad times ».....	36
Figure 2 : Récapitulatif du processus de l'évaluation et de la gestion du risque environnemental ainsi que les principales questions que les scientifiques et gestionnaires doivent se poser. D'après van Leeuwen et Vermeire (2007).....	41
Figure 3 : Outils possibles pour la surveillance environnementale en fonction des différents niveaux d'organisation du vivant.....	48
Figure 4 : Schéma illustrant le choix des biomarqueurs utilisés pour les travaux de thèse. Les biomarqueurs analysés sont inscrits en bleu. Cette liste n'a pas pour ambition d'être exhaustive, et ce schéma reliant les biomarqueurs entre eux et à une contamination métallique ne se veut pas complet.	55
Figure 5 : Schéma simplifié du processus de phagocytose suite à un dommage tissulaire.	58
Figure 6 : Processus de dégradation des exogènes et endogènes dans un phagocyte.	60
Figure 7 : Elimination ou piégeage des différentes espèces réactives par les mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques. ER : espèces réactives ; ERO : espèces réactives de l'oxygène ; $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; HOCl : acide hypochloreux ; HO^{\bullet} radical hydroxyle ; 1O_2 oxygène singulet ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; G6P : glucose-6-phosphate ; GS : radical glutathionyl.	66
Figure 8 : Récapitulatif des étapes de la peroxydation lipidique due au radical hydroxyle.	69
Figure 9 : Schéma récapitulatif des dommages sur la molécule d'ADN d'un polluant ou des espèces réactives de l'oxygène.	72
Figure 10 : Carte de France localisant les anciens sites miniers uranifères. Les carrés bleus représentent les sites d'extraction de l'uranium et les triangles rouges les lieux de stockage des résidus de traitement d'uranium. <i>Source : IRSN</i>	84
Figure 11 : Schéma d'un lipopolysaccharide d'une bactérie Gram ⁻ . D'après Swain et al. (2008).	94

- Figure 12 : Localisation des étangs d'intérêt de Haute-Vienne et du Cantal. Les étoiles vertes correspondent aux anciens sites miniers uranifères (1 : Margnac-Peny / 2 : Bachellerie / 3 : Venachat / 4 : Santro / 5 : Saint-Pierre)..... 105
- Figure 13 : Photographie d'une épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*)..... 107
- Figure 14 : Planisphère indiquant en rouge la distribution mondiale de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). 108
- Figure 15 : Production basale d'ERO par les leucocytes contenus dans la rate des épinoches en fonction des étangs et des temps de prélèvement. Les lignes bleues représentent les résultats au bout de 14 jours, tandis que ceux en rouge au bout de 28 jours. Les différences significatives de ce biomarqueur entre les étangs lors du D14 sont représentées par différentes lettres minuscules et bleues ($\alpha = 5 \%$). Les différences significatives entre les étangs lors du D28 sont représentées par différentes lettres majuscules et rouges ($\alpha = 5 \%$)..... 117
- Figure 16 : Mise en place d'un stress biologique via les lipopolysaccharides au laboratoire. Les épinoches n'ayant subi aucune sédation constituent les témoins sédation, tandis que les épinoches n'ayant subi qu'une sédation constituent les témoins injection. Pour chaque condition d'injection et chaque temps de prélèvement, 10 épinoches ont été sacrifiées. Les épinoches témoin ne sont prélevées qu'à 1 jour après les injections (D+1). 165
- Figure 17 : Nécrose leucocytaire en fonction de la condition d'exposition au stress biologique (LPS) et du temps de latence entre injection (D) et dissection. Les boxplots représentent la médiane, les quartiles et valeurs extrêmes. Les p -valeurs écrites en haut du graphique correspondent à la comparaison de moyennes ou de rangs entre les différents temps de prélèvement pour une même condition d'injection. a, b, c, d : groupes significativement différents 1 jour après les injections (D+1). e, f, g, h : groupes significativement différents 2 jours après les injections (D+2). i, j, k, l : groupes significativement différents 4 jours après les injections (D+4). m, n, o, p : groupes significativement différents 8 jours après les injections (D+8). * : différence significative entre l'injection de PBS et les témoins sédation. # : différence significative entre l'injection de PBS et les témoins injection. Pour chaque test statistique, $\alpha = 5 \%$ 168
- Figure 18 : Activité oxydative stimulée en fonction de la condition d'exposition au stress biologique (LPS) et du temps de latence entre injection (D) et dissection. Les boxplots représentent la médiane, les quartiles et valeurs extrêmes. Les p -valeurs écrites en haut du graphique correspondent à la comparaison de moyennes ou de rangs entre les différents temps de prélèvement pour une même condition d'injection. a, b, c, d : groupes significativement différents 1 jour après les injections (D+1). e, f, g, h : groupes significativement différents 2 jours après les injections (D+2). i, j, k, l : groupes significativement différents 4 jours après les injections (D+4). m, n, o, p : groupes significativement différents 8 jours après les injections (D+8). * : différence significative

entre l'injection de PBS et les témoins sédation. # : différence significative entre l'injection de PBS et les témoins injection. Pour chaque test statistique, $\alpha = 5 \%$ 170

Figure 19 : Capacité de phagocytose des leucocytes (1) et peroxydation lipidique au niveau du foie des épinoches (2) en fonction des étangs et du stress biologique. Les lignes bleues représentent les résultats obtenus sur les épinoches ayant subi un stress biologique (injection de LPS), tandis que les lignes rouges représentent les résultats obtenus sur les épinoches n'ayant pas subi ce stress (injection de PBS). Les différences significatives pour ces biomarqueurs entre les étangs pour une condition d'injection sont représentées par différentes lettres minuscules ($\alpha = 5 \%$). La différence significative entre les conditions d'injection (LSP et PBS) pour les épinoches encagées dans le même étang est représentée par une astérisque ($\alpha = 5 \%$). 175

Figure 20 : Schéma et dimensions d'une cage utilisée lors des expérimentations *in situ* avec l'épinoche à trois épines. 216

Figure 21 : Photographies au MET de leucocytes provenant de la rate d'épinoches et ayant ingéré des microbilles fluorescentes (apparaissant en noir). 267

Figure 22 : ACP représentant les individus regroupés en fonction de l'étang (A) ou du stress biologique (B) (variables illustratives). Les composantes principales (CP 1 et CP 2) sont construites à partir de tous les biomarqueurs analysés. Le nombre de dimensions sélectionnées est de 2. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux valeurs propres de chaque axe, suivies par les valeurs d'inertie. Le tableau à droite résume les contributions aux axes de chaque variable (en pourcentage), avec les contributions supérieures à 10 % indiquées en gras. K : facteur de condition de Fulton ; HSI : indice hépatosomatique ; Néc. : nécrose leucocytaire ; Apop. : apoptose leucocytaire ; Lympho : pourcentage de lymphocytes ; IML : intégrité de la membrane lysosomale ; Phago. : capacité phagocytaire ; ROS b. : activité oxydative basale ; ROS s. : activité oxydative stimulée ; SI: indice de stimulation de la flambée oxydative ; Gr : glutathion réductase ; GPx : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion total; GST : glutathion-S-transférase ; CAT : catalase ; SOD : superoxyde dismutase; TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique ; DNA : dommages à l'ADN..... 274

Figure 23 : Activité de la glutathion peroxydase (en U / g de protéines totales) en fonction de l'étang d'exposition et du sexe des épinoches lors du D14 (PBS) de la deuxième expérimentation *in situ* (avril 2014). Po : Pontabrier, Ma : Malessard, Js : Jonchère Saint-Maurice. Un astérisque correspond à des différences significatives pour le même étang entre mâles (♂) et femelles (♀) avec ** : $0,01 < p \leq 0,001$ et *** : $p \leq 0,001$ 278

Figure 24 : Réponses biologiques en fonction des étangs et de la période d'exposition (D14 pour chaque période). Les lignes bleues représentent les résultats obtenus en avril 2013, en rouge ceux d'avril 2014 et en vert ceux de septembre 2014. Les différences significatives entre les périodes sont représentées par différentes lettres minuscules ($\alpha = 5 \%$), les différences entre les étangs n'étant pas représentées. 284

Figure 25 : Réponses biologiques (suite) en fonction des étangs et de la période d'exposition (D14 pour chaque période). Les lignes bleues représentent les résultats obtenus en avril 2013, en rouge ceux d'avril 2014 et en vert ceux de septembre 2014. Les différences significatives entre les périodes sont représentées par différentes lettres minuscules ($\alpha = 5\%$), les différences entre les étangs n'étant pas représentées.....	285
Figure 26 : Températures à l'intérieur des cages des trois étangs de la Haute-Vienne pendant l'expérience d'avril 2014 (en haut) et celle de septembre 2014 (en bas). La température a été enregistrée toutes les heures de la mise en eau à la fin des expériences.....	289
Figure 27 : Analyse en composantes principales effectuée sur les réponses obtenues chez les épinoches encagées dans les trois étangs de la Haute-Vienne en avril 2013, avril 2014 et septembre 2014. La variable pH (en rouge) est illustrative, donc non- utilisée lors de la construction de l'ACP. Les pourcentages au niveau des deux composantes principales (CP1 et CP2) sont leur inertie. K : indice de condition de Fulton ; HSI : indice hépatosomatique ; Mo : nécrose leucocytaire ; Oa : production basale d'ERO ; LMI : intégrité de la membrane lysosomale ; Pg : capacité de phagocytose ; GSH : glutathion total ; CAT : catalase ; GPx : Glutathion peroxydase ; SOD : superoxyde dismutase ; DNA : dommages à l'ADN.....	291
Figure 28 : Variations hypothétiques de pourcentage de phagocytose entre les injections de LPS et les dissections.....	304

LISTE DES ABREVIATIONS

2,4D :	acide 2,4-dichlorophénoxyacétique
ACh :	acétylcholine
AChE :	acétylcholinestérase
ACP :	analyse en composantes principales
ADN :	acide désoxyribonucléique
AMPA :	acide aminométhylphosphonique
ANOVA :	analyse de la variance
ATP :	adénosine triphosphate
BChE :	butyrylcholinestérase
CAT :	catalase
COV :	composé organo-volatile
DCMU :	diuron ou 3-(3,4-dichlorophényl)-1,1-diméthyl-urée
ERE :	évaluation du risque environnemental
ERO :	espèces réactives de l'oxygène
EROD :	éthoxyrésorufine-O-dééthylase
G6PDH :	glucose-6-phosphate déshydrogénase
GPx :	glutathion peroxydase
Gr :	glutathion réductase
GSH :	glutathion réduit
GSSG :	glutathion oxydé
GST :	glutathion-S-transférase
HAP :	hydrocarbure aromatique polycyclique
HSI :	indice hépatosomatique
IBGN :	indice biologique global normalisé

IML :	Intégrité de la membrane lysosomale
IPNV :	virus de la nécrose infectieuse du pancréas
K :	indice de condition de Fulton
LD :	limite de détection
MDA :	malondialdéhyde
MET :	microscopie électronique à transmission
MT :	métallothionéines
NADPH :	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
LPS :	lipopolysaccharides
NOEC :	concentration sans effet observé
OCDE :	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
PBS :	tampon phosphate salin
PCB :	polychlorobiphényle
PMA :	phorbol myristate acétate
ROS b. :	activité oxydative basale
ROS s. :	activité oxydative stimulée
SI :	index de stimulation de la flambée oxydative
SOD :	superoxyde dismutase
SOeS :	Service de l'Observation et des Statistiques
TBA :	acide thiobarbiturique
TBARS :	substances réactives à l'acide thiobarbiturique
TNF :	facteur de nécrose tumorale
UF :	unité de fluorescence

CHAPITRE 1 - INTRODUCTION GENERALE



Source : Dissident média

La période des « Trente Glorieuses », allant de 1945 à 1974 a été une révolution d'un point de vue démographique, économique, technologique et industriel. En plus de l'utilisation accrue de matières premières, de nouveaux produits chimiques ont fait leur apparition dans l'industrie mondiale, en même temps que leurs technologies associées, tels que les engrais, les pesticides ou les radioéléments. Ce n'est qu'après un grand nombre de catastrophes environnementales, comme des marées noires (1975, Showa-Maru libère dans l'eau 237.000 tonnes de pétrole dans la mer d'Indonésie), des accidents nucléaires (1986, explosion d'un réacteur nucléaire à Tchernobyl) et des pollutions de lacs et de fleuves (1969 : déversement de 500 tonnes d'endosulfan dans le Rhin) que l'Homme a commencé à comprendre les effets néfastes des produits chimiques qu'il utilise, dans un premier temps sur sa santé, puis sur celle de l'environnement. Cette prise de conscience écologique a débuté il y a maintenant plus de quarante ans (fin des années 60) et prend de plus en plus d'ampleur au fil des années. En 2013, la protection de l'environnement est devenue le 3^{ème} intérêt des Français après le chômage et la crise (*source : Eco observer*). Parmi les problèmes environnementaux qui les préoccupent le plus, la pollution de l'air, du sol et de l'eau totalisent le quart des opinions (*source : SOeS volet environnement des enquêtes sur les conditions de vie et aspiration des français*). Cette prise de conscience a conduit aux notions de protection de l'environnement, du risque environnemental et d'écotoxicologie.

L'écotoxicologie provient du regroupement de deux domaines, l'écologie et la toxicologie. Ce terme avancé par Truhaut (1977) peut être défini comme le domaine de la toxicologie étudiant les effets néfastes d'une substance naturelle ou synthétique sur les écosystèmes. Cependant, ce terme a été remanié par de nombreux auteurs, faisant référence plus à l'environnement ou aux organismes vivant en son sein (Forbes et Forbes, 1997). Nous proposons ici une définition modifiée d'après celle de Forbes et Forbes (1997) : l'écotoxicologie est l'étude des effets toxicologiques et écologiques des polluants naturels ou de synthèse sur les individus, les populations, les communautés et l'écosystème, ainsi que leur devenir dans cet écosystème.

La pollution est un terme à différencier de la contamination. En effet, une contamination est définie comme la présence d'une ou plusieurs substances dans un environnement qui en était

dépourvu ou comme l'élévation de sa concentration au-delà du seuil naturel, tandis que la pollution entraîne la notion de danger de cette substance sur l'environnement (Chapman, 2007). Parmi ces sources de pollution, les métaux constituent un important problème environnemental actuel (Chezhian et al., 2012). Bien que certains, dits essentiels, soient indispensables aux organismes, tous les métaux peuvent être toxiques lorsqu'ils sont présents en excès (Valavanidis et Vlachogianni, 2010; Förstner et Wittmann, 2012). Leur dangerosité ne se résume pas qu'à leur présence ubiquitaire, mais aussi au fait qu'ils existent sous plusieurs formes chimiques (Goyer et Clarkson, 1996). Chacune de ces formes présente des caractéristiques uniques, pouvant modifier leur solubilité ou encore leur conférer le pouvoir de passer à travers les membranes biologiques (Spry et Wiener, 1991; Playle, 1998).

La contamination de l'environnement par les métaux provient de leurs nombreuses utilisations dans les activités anthropiques, et notamment l'industrie. Pour ces activités, les métaux, naturellement présents dans la croûte terrestre, ont été extraits en grandes quantités lors du siècle dernier. En France, les principaux métaux extraits sont l'aluminium, le plomb, le fer, l'uranium et le zinc (Minéralinfo, 2013). Ces extractions ont modifié les proportions et la forme chimique de ces métaux dans les différents compartiments des écosystèmes (eau, air, sol), pouvant ainsi rendre certains d'entre eux biodisponibles, et potentiellement néfastes pour les organismes.

Ce fut le cas de l'uranium en France, extrait entre 1945 et 2001 à partir de quelques centaines de mines (IRSN, 2007b). La contamination uranifère qui en a découlé provient des roches pauvres en uranium, extraites simultanément avec le minerai et laissées sur les sites miniers, de l'eau utilisée pour noyer les mines à ciel ouvert ou les galeries souterraines, ainsi que des boues déposées après le curage des sédiments.

Dès les années 70, les écologistes ont soulevé le problème de l'extraction et de l'utilisation de l'uranium (Cf. Figure 1). Le manque de rendement uranifère des sols français, et pour une moindre partie, la pression exercée par les écologistes ont conduit à la fermeture des mines d'uranium en France et au démantèlement des usines de traitement des minerais. Les gestionnaires des mines ont maintenant le devoir de limiter les impacts radiologiques et chimiques des activités passées. Afin de décontaminer les eaux présentes au-dessus des

mines en radioéléments, certains sels métalliques sont utilisés, ce qui a pour effet l'augmentation de la contamination métallique présente au niveau des sites d'uranium abandonnés. Cependant, cette contamination métallique peut aussi s'étendre au niveau des milieux avoisinants, via des phénomènes d'érosion ou par rejets.

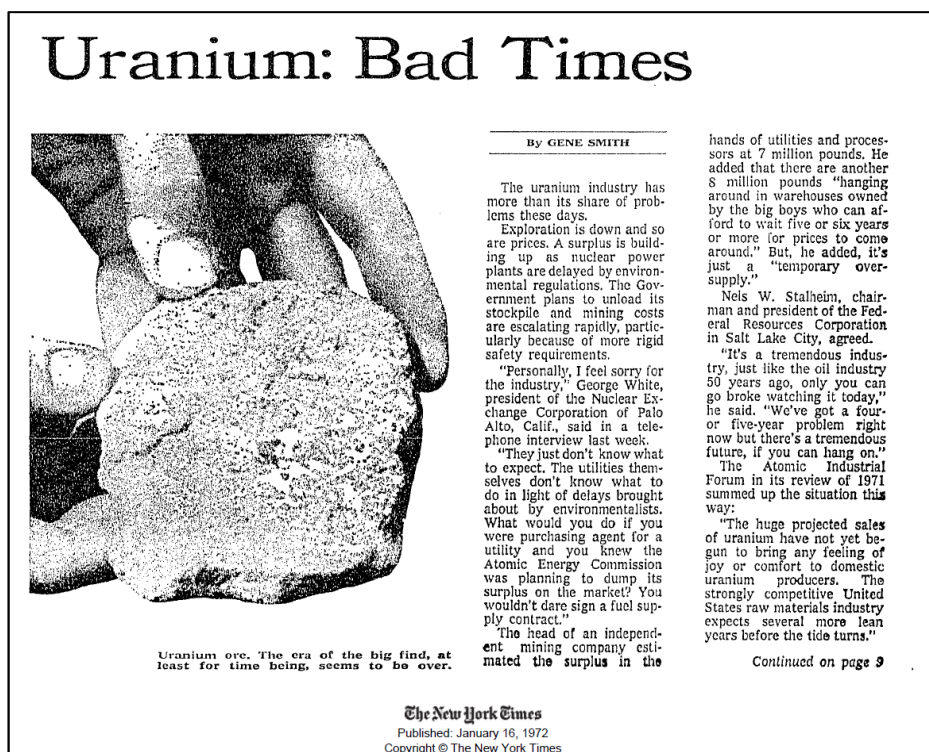


Figure 1 : Une du New York Times du 16 janvier 1972 : « Uranium : bad times ».

De cette contamination polymétallique, liée aux rejets d'anciennes mines d'uranium, en découle la première problématique de ces travaux de thèse :

- (1) La contamination métallique représente-t-elle un risque pour un poisson, l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*), encagé dans des étangs sous l'influence de rejets miniers uranifères.

Afin de caractériser ce risque, plusieurs outils et méthodologies sont à la disposition des écotoxicologues. En plus de la caractérisation chimique des métaux ou encore la présence ou l'abondance d'organismes sensibles dans le milieu, la surveillance environnementale peut

intégrer la mesure des effets de la pollution sur les organismes, au niveau populationnel, individuel et même sub-individuel. Ces effets ou réponses mesurables au sein d'un organisme sont communément appelés biomarqueurs. Il existe de nombreux biomarqueurs, en lien avec de nombreuses fonctions biologiques, telles que les activités antioxydantes ou encore le système immunitaire. L'analyse de ce dernier possède un fort intérêt en écotoxicologie de par son rôle dans le maintien de l'intégrité de l'organisme ainsi que pour la défense envers de nombreux stress biologiques (Magnadottir, 2006).

il est maintenant admis que les activités anthropiques ont conduit à une contamination des écosystèmes par de multiples contaminants (Amiard et Amiard Triquet, 2008). Les effets peuvent être différents sur les êtres vivants occupants ces écosystèmes selon l'exposition à un stress unique ou multiple. Ainsi, un polluant impactant des fonctions immunitaires d'un organisme peut le laisser sans défense envers un pathogène (bactérie, virus ou parasite), pouvant mener à l'apparition de maladies, voire à la mort. Dans ce cadre, la deuxième problématique de la thèse est :

(2) L'exposition à la contamination polymétallique à tendance uranifère modifie-t-elle les réponses des épinoches à trois épines envers un stress biologique soudain ?

Conjointement à ces deux problématiques, les travaux réalisés s'appuient sur l'utilisation d'une approche multi-biomarqueurs comprenant des immunomarqueurs, ainsi que sur l'encagement de l'épinoche à trois épines lors d'études environnementales. De l'utilisation de la technique d'encagement découle la troisième problématique :

(3) Les conditions d'encagement de l'épinoche à trois épines valident-elles cette technique lors de prochaines expériences *in situ* ?

Une première partie de cette thèse (chapitre 2) constitue une étude bibliographique concernant les modalités d'évaluation du risque environnemental avant de s'intéresser à celui causé par les rejets miniers uranifères. Le troisième chapitre justifie les choix méthodologiques qui ont été faits dans cette étude (les sites d'étude, le modèle biologique et

les biomarqueurs étudiés). Les trois chapitres suivants sont constitués des trois articles scientifiques découlant des travaux de thèse :

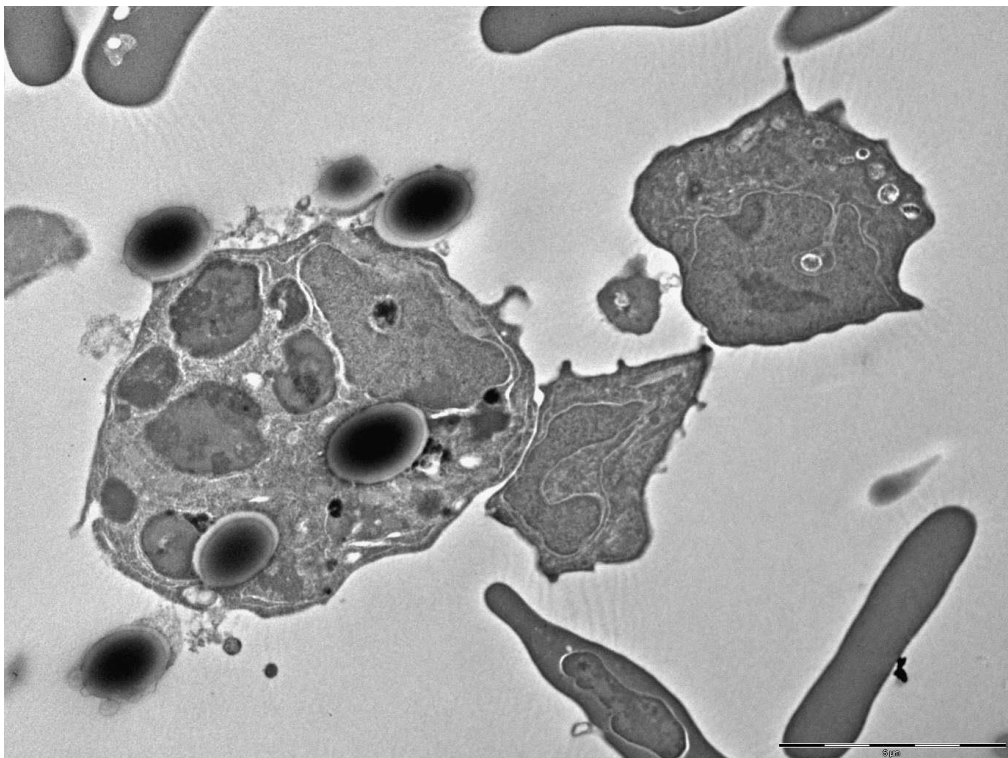
Le quatrième chapitre expose la méthodologie ainsi que les résultats obtenus pour répondre à la première question. Pour cela, les épinoches ont été soumises à un mélange métallique présent au niveau d'étangs recevant des rejets miniers uranifères. Les effets de cette contamination polymétallique ont été évalués en analysant plusieurs biomarqueurs.

Pour répondre à la deuxième problématique, les épinoches ont été exposées de nouveau à ce mélange métallique avant de subir un stress biologique soudain. Les résultats obtenus sur leur susceptibilité envers ce stress biologique sont précisés dans l'article scientifique du chapitre 5, suivant une description de l'étude préliminaire de ce stress appliqué aux poissons.

Afin d'évaluer les conditions d'utilisation de l'encagement de l'épinoche lors d'études environnementales (troisième problématique), trois expériences évaluant les possibles interactions de ce système sur des biomarqueurs d'écotoxicité ont été réalisées et décrites dans le dernier article scientifique présent dans le chapitre 6.

Enfin, les différents résultats sont rassemblés afin d'être plus longuement discutés dans le chapitre 7. La conclusion et les principales perspectives regroupant les principaux apports de ces travaux ainsi que les questions laissées en suspens sont présentées dans le chapitre 8.

CHAPITRE 2 – ETAT DE L'ART



1. Le risque environnemental

1.1. Généralités

Peu de temps après la prise de conscience de l’écotoxicité de certains produits chimiques et le développement de l’écotoxicologie est né le concept de l’évaluation du risque environnemental (ERE). C’est aux Etats-Unis, en 1981, que les premières méthodologies d’ERE ont été développées, grâce notamment à l’agence de protection environnementale (Environmental Protection Agency, USEPA) (Hayet et al., 2009). En 1998, cette agence a publié un guide pour l’ERE, *Guidelines for ecological risk assessment*, récapitulant les méthodes d’évaluation du risque environnemental, base de nombreuses études (USEPA, 1998; Hayet et al., 2009).

Le risque environnemental est composé de deux variables : le danger et l’exposition. Le danger est la capacité d’une substance à induire des effets néfastes sur un écosystème et les organismes qui y vivent, tandis que l’exposition rassemble les mouvements, émissions, transformations et dégradations de cette substance pour connaître les doses auxquelles l’écosystème peut être exposé (Van Leeuwen et Vermeire, 2007). Le risque est donc la probabilité qu’un effet négatif d’une substance se produise pour une exposition précise (Van Leeuwen et Vermeire, 2007). Plusieurs définitions ont été attribuées à l’évaluation du risque. La définition de Scala (1991), modifiée par Forbes et Forbes (1997) sera retenue pour l’évaluation du risque environnemental : « C’est un processus qui combine des données biologiques, les relations dose/réponse et le niveau d’exposition pour produire une estimation qualitative et quantitative des effets nocifs d’une activité ou d’un agent chimique sur un écosystème ou un de ses compartiments ». Son but est de caractériser les substances, et de définir dans quelles conditions (concentrations, voies d’exposition, etc.) elles sont capables d’induire des effets néfastes sur l’environnement. Pour cela une démarche d’ERE a été formulée.

1.2. La démarche de l’évaluation du risque environnemental

Le risque environnemental fait intervenir de nombreuses personnes, aussi bien des scientifiques que des gestionnaires. En effet, la première partie de la démarche, qui se concentre sur la caractérisation du risque, fait intervenir des questionnements scientifiques, tandis que la deuxième partie fait appel à des questions de gestion du risque. Toutes les étapes et questionnements sont résumés sur la Figure 2.

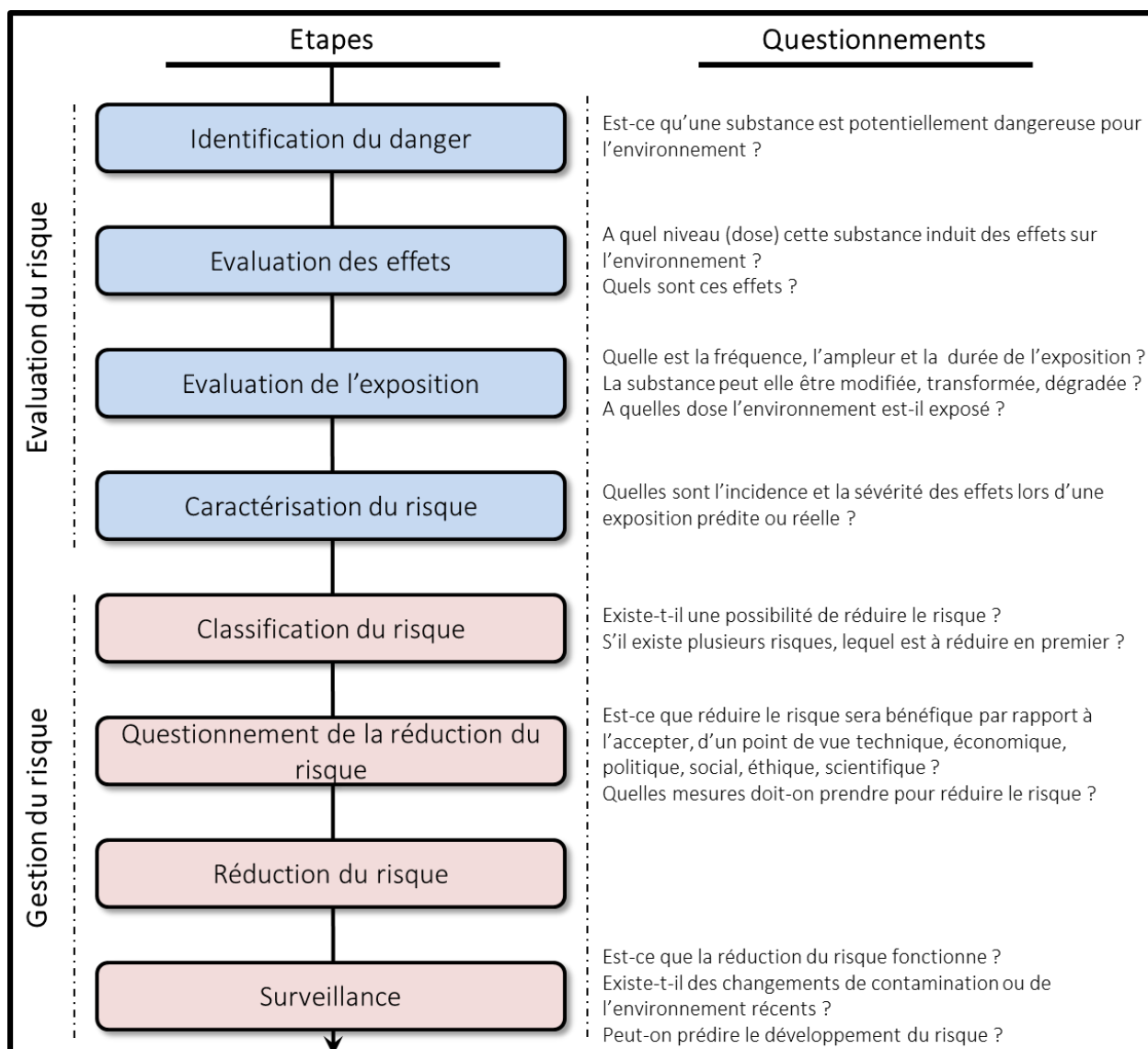


Figure 2 : Récapitulatif du processus de l’évaluation et de la gestion du risque environnemental ainsi que les principales questions que les scientifiques et gestionnaires doivent se poser. D’après van Leeuwen et Vermeire (2007).

La partie scientifique (en bleu sur la Figure 2) sera détaillée dans ce manuscrit. La première étape est l’identification du danger. Pendant cette étape, il est nécessaire de présenter la ou les situations pouvant comporter des risques environnementaux : le problème environnemental (Forbes et Forbes, 1997; Van Leeuwen et Vermeire, 2007; Hayet et al., 2009). Pour cela, la description de la (ou des) substance(s) présente(s), de son (leur) ampleur dans le milieu et des populations potentiellement impactées permettent la création d’un projet d’ERE. La deuxième étape consiste à caractériser la toxicologie (Van der Oost et al., 2003; Van Leeuwen et Vermeire, 2007; Hayet et al., 2009). Grâce à des données pré-existantes, à la modélisation ou à des expérimentations, les scientifiques vont pouvoir déterminer la concentration ou dose de polluant qui induit des effets néfastes aux composants de l’écosystème concernés, c-à-d établir la relation « dose du (des) polluant(s) / réponse (ou effet sur) des composants de l’écosystème » (Forbes et Forbes, 1997; Van Leeuwen et Vermeire, 2007; Valcke et al., 2012). Après ou en parallèle à cette étape, l’évaluation de l’exposition servira à définir les concentrations *in situ* des polluants et les différentes conditions d’exposition (durée, ampleur, fréquence, voies d’internalisation, etc.). Ces trois étapes vont donc être nécessaires à la caractérisation du risque environnemental en regroupant les données toxicologiques et les doses d’exposition. Cela aboutira donc à la définition de l’incidence et des effets des polluants pour la dose observée. La prise en compte de facteurs d’ordre économique, social, politique, éthique et scientifique pouvant influencer la décision finale, le risque environnemental sera soit accepté soit traité pour essayer de le réduire (Van Leeuwen et Vermeire, 2007).

Le déroulement de ce processus n’est pas strict, et quelques étapes peuvent s’intervertir en fonction du contexte et de l’objectif (Valcke et al., 2012). Il n’est donc pas original d’observer l’évaluation de l’exposition avant l’évaluation des effets, notamment pour des polluants bien connus des écotoxicologues.

Ce processus d’évaluation du risque n’est pas sans faille. Forbes et Forbes (1997) ont listé des limites à une ERE efficace. Certaines de ces limites sont identiques à celles de la surveillance (Cf. Ch. 2, partie 1.3), comme le manque de données pour certaines substances, ou encore des limites de mesure. Les mélanges complexes de polluants et des facteurs confondants peuvent entraîner des incertitudes dans l’ERE. Enfin, une limite intéressante est la décision arbitraire de certains seuils de toxicité par les scientifiques. Bien que ces seuils de toxicité

soient d'une importance capitale pour réduire les rejets et donc pour la protection de l'environnement, il existe encore aujourd'hui de nombreuses substances chimiques pour lesquelles aucun test de toxicité n'a été réalisé. Pour ces substances, une décision de leur seuil de toxicité est parfois prise sommairement et plus politiquement que scientifiquement (Forbes et Forbes, 1997). D'autres limites sont liées au ratio coût/bénéfice de la décontamination des eaux : « Les États membres peuvent viser à réaliser des objectifs environnementaux moins stricts que ceux fixés au paragraphe 1, pour certaines masses d'eau spécifiques, lorsque celles-ci sont tellement touchées par l'activité humaine, déterminée conformément à l'article 5, paragraphe 1, ou que leur condition naturelle est telle que la réalisation de ces objectifs serait impossible ou d'un coût disproportionné (...) » (Directive Cadre sur l'Eau, 2000, Article 4, paragraphe 5).

Des missions de surveillance peuvent ensuite être mises en place afin de s'assurer de l'absence de toute modification du risque ou de la bonne réduction du risque.

1.3. Les programmes de surveillance

1.3.1. De la surveillance chimique à la surveillance biologique

La surveillance environnementale peut être définie comme l'ensemble des analyses i) chimiques pour vérifier et quantifier la présence d'une contamination dans un écosystème et ii) biologiques afin de prévoir ou de déterminer l'impact possible de cette contamination sur le vivant. Elle permet de déterminer l'état de santé d'un écosystème donné. De nombreux outils sont à la disposition des scientifiques pour répondre aux objectifs de la surveillance environnementale.

Le premier outil de surveillance pour évaluer la contamination d'un habitat est la mesure **physico-chimique** des substances présentes dans les différents compartiments de l'environnement (eau, air, sol). Cependant ce renseignement seul ne représente pas une grande importance pour l'évaluation du risque environnemental. Ces valeurs de concentrations doivent aussi renseigner sur la disponibilité de ces substances au biote, qui varie en fonction de leurs concentrations dans les différents compartiments, de leur

spéciation mais aussi en fonction des caractéristiques physico-chimiques de ces compartiments (pH, dureté, turbidité, etc.) (Newman et Jagoe, 1994). Ces données fournissent la nature et la proportion des substances présentes dans un environnement capables d’interagir avec ses habitants (Luoma, 1983).

La bioaccumulation permet de fournir les concentrations des produits chimiques emmagasinés dans les êtres vivants ou dans une partie de leur organisme (Van der Oost et al., 2003; Besse et al., 2011). Cette mesure est donc complémentaire à l’évaluation des concentrations des polluants dans le milieu. Elle inclut l’accumulation de ces produits après ingestion, la biomagnification, ainsi que l’accumulation directe après exposition à ces polluants, la bioconcentration (Markert et al., 2010).

Cependant, cette surveillance chimique du milieu, bien qu’indispensable, ne reflète pas l’impact des produits chimiques sur le vivant, puisqu’elles ne donnent pas d’éléments sur la transformation, la dégradation et les conséquences de l’internalisation de ces produits dans les organismes (Amiard et Amiard Triquet, 2008). En outre, des limites économiques et technologiques (e.g. limite de détection des appareils de mesure) ne permettent pas forcément la quantification des substances ou leur discrimination lorsqu’elles sont présentes en mélange dans l’environnement (Forbes et Forbes, 1997). C’est à partir de ces observations qu’est née la notion de biosurveillance.

La biosurveillance peut être définie comme l’ensemble des méthodes utilisées pour détecter et mesurer la concentration des polluants dans les compartiments **biologiques** des écosystèmes et leurs effets sur le vivant (Forbes et Forbes, 1997; Besse et al., 2011). La complémentarité entre les surveillances chimique et biologique peut permettre de connecter les concentrations de xénobiotiques dans l’environnement aux effets mesurés chez les organismes (Van der Oost et al., 2003). En plus de la possibilité de rendre compte des variations spatiales de la contamination dans l’environnement, la biosurveillance peut autoriser le suivi temporel de la contamination (Amiard, 2011).

Lors de la biosurveillance utilisant ces outils, il est nécessaire de sélectionner, après avoir identifié la contamination, une ou plusieurs espèces animales ou végétales indicatrices de

l'étendue des effets et des réponses à cette contamination (Peakall, 1992). Certains poissons peuvent être fréquemment choisis comme espèce sentinelle lors de biosurveillance aquatique, tels que plusieurs espèces de mullet (*Mugil cephalus* et *Liza aurata*), le rouget (*Mullus barbatus*), ou encore le flet commun (*Platichthys flesus*), etc. (Morcillo et al., 1997; Ferreira et al., 2004).

La biosurveillance peut être subdivisée en deux stratégies : la biosurveillance passive et la biosurveillance active. Ces deux stratégies sont utilisées pour répondre à des questions différentes. Pour la biosurveillance passive, les effets de la contamination sont étudiés sur des organismes prélevés directement au niveau du site contaminé. Pour une biosurveillance passive utilisant le poisson comme modèle biologique, la stratégie développée est régulièrement la pêche (ligne ou électrique). Cette surveillance permet de suivre les tendances temporelles de la contamination. Cependant, une étude spatiale importante n'est pas envisageable à cause de la possible adaptation des organismes indigènes aux pressions présentes dans leur milieu. A l'inverse, la biosurveillance active repose sur l'importation des organismes sentinelles, provenant d'un élevage ou d'un site témoin, au niveau du site contaminé, via par exemple l'encagement (Cf. Ch. 2, partie 1.4). Cette stratégie permet aussi de réduire les disparités de réponses individuelles au polluant si les organismes proviennent du même élevage. Cette stratégie autorise davantage le suivi des tendances spatiales que temporelles de la contamination. Une de ces deux stratégies va donc être préférentiellement sélectionnée en fonction de la problématique préalablement décrite. Les limites de la biosurveillance peuvent être les identiques à celles de l'ERE, listées par Forbes et Forbes (1997). Cependant, des inconvénients et avantages sont inhérents à la biosurveillance passive ou active. Ces avantages/inconvénients concernant la biosurveillance aquatique à l'aide de poissons sont énumérés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Liste des avantages et inconvénients de la biosurveillance passive et active avec un modèle poisson.

Biosurveillance passive	Biosurveillance active
Avantages	
Surveillance temporelle réalisable	Surveillance spatiale réalisable (plusieurs sites)
Résultats obtenus rapidement	Contrôle des individus (âge, sexe, poids, taille, etc.)
Accumulation des polluants plus importante à cause de la période d'exposition plus longue	Possibilité du choix de l'espèce (espèce sentinelle), pas forcément présente dans le site contaminé
Coûts plus faibles	Organismes originaires d'environnements propres (site contrôle ou élevage)
	Facilité de l'échantillonnage lors d'encagements
	Moins de prédation si les organismes sont encagés
	Peut être standardisé
Inconvénients	
Surveillance spatiale limitée à l'occurrence des populations indigènes	Surveillance temporelle limitée au temps d'exposition
Absence d'individus ou choix limité de l'espèce	Les valeurs de bioaccumulation peuvent être faibles si le temps d'exposition l'est aussi
Pas de contrôle sur les individus (âge, sexe, poids, taille, etc.)	Limite géographique de la dispersion des individus lors d'encagements
Tolérance et résistance (voire adaptation) des autochtones à la contamination	Manipulations plus longues (temps d'exposition souhaité)
Facteurs confondants (température, autre stress, etc.)	Facteurs confondants (température, autre stress, etc.)
Stress de la capture	Stress de l'encagement, du transport vers le site d'étude
Prédation possible	Vandalisme
	Coûts plus élevés (modèle biologique, cages, etc.)

D'après Vandamme et al. 2004 et Oikari 2006

1.3.2. Les outils de la biosurveillance

Plusieurs outils permettent la biosurveillance (Hopkin, 1993; Van der Oost et al., 2003) (Cf. Figure 3) :

A l'échelle de la communauté, les **bioindicateurs** sont définis comme des espèces animales ou végétales dont les variations de présence (disparition ou apparition) ou de l'abondance relative d'une (ou plusieurs) espèce(s) au sein d'une communauté signalent une perturbation de l'environnement (Echaubard, 1995; Vindimian, 1996). Ces bioindicateurs peuvent témoigner d'une perturbation écologique (e.g. variations de facteurs environnementaux) ou écotoxicologique, telle que l'apparition d'une substance chimique dans l'écosystème. Ces bioindicateurs ont permis le développement d'indice de qualité du milieu, dont l'indice

biologique global normalisé (IBGN) basé sur l'occurrence d'espèces de macro-invertébrés (Archaimbault et Dumont, 2010). A l'échelle de la population, les critères retenus pour être témoins d'une pollution sont la densité, l'âge ou la structure d'une population dans un milieu (Van der Oost et al., 2003).

Les **bioaccumulateurs**, espèces utilisées pour évaluer la quantité de polluants intégrés dans leur organisme, se doivent d'être abondants, d'une taille conséquente pour les analyses, d'une durée de vie suffisante pour l'intégration de ces polluants et d'une répartition spatiale importante (Amiard, 2011).

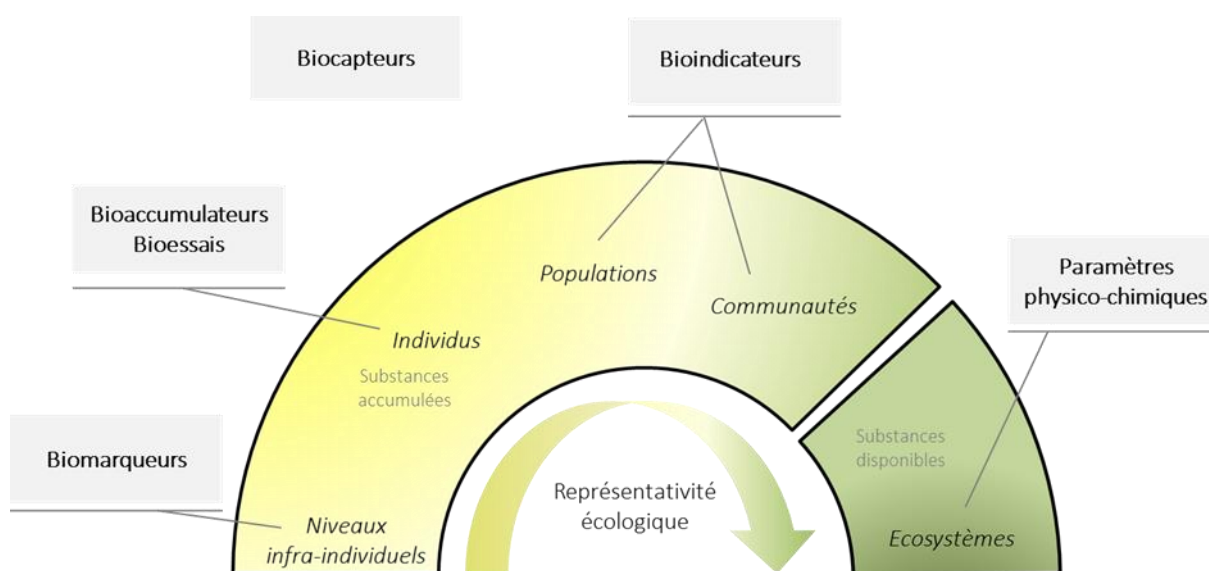
Les **biocapteurs** ne peuvent pas être placés dans les niveaux d'organisation du vivant. Il s'agit d'une construction entre un biorécepteur, matériel biologique (enzymes, chemorécepteurs, cellules, etc.) et un transducteur. Le biorécepteur va reconnaître spécifiquement un contaminant du milieu dans lequel il est placé, tandis que le transducteur va reconnaître l'information du biorécepteur (e.g. fixation d'une molécule sur un récepteur, réaction enzymatique, etc.) et de la remanier en signal analytique (Guedri, 2010). Cette méthode permet de lier la présence d'un contaminant particulier à une fonction biologique, et autorise un suivi sur une longue période (Vindimian, 1996).

Ces trois outils couvrent presque tous les niveaux d'organisation du vivant (communautés, populations et individus), mais ne permettent pas de faire le lien entre contamination chimique et perturbations des populations ou communautés (Sanchez, 2007). Corrélativement, l'apparition ou la disparition d'une espèce au sein d'une communauté ainsi que la modification de la structure d'une population sont les conséquences d'une exposition à long terme à des pressions environnementales, soulignant le fait que ces outils ne sont pas instantanés après la modification du milieu des organismes (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003; Sanchez, 2007). Les bioessais et les biomarqueurs ont donc été développés pour l'écotoxicologie.

Les **bioessais** sont réalisés au laboratoire, sous conditions contrôlées avec des modèles biologiques connus (ex : daphnie, poisson zèbre, etc.), pour observer les effets d'un polluant sur les traits d'histoire de vie d'un organisme (croissance, reproduction, survie) (Van der Oost

et al., 2003). Ces outils permettent de connaître les doses nocives d’un polluant pour cet organisme modèle.

Les **biomarqueurs** peuvent être définis comme des « changements structuraux ou fonctionnels observables et mesurables, qui prennent place à différents niveaux de l’organisation biologique, depuis la molécule jusqu’à l’organisme pris dans son intégralité, qui traduisent une exposition persistante ou passée d’un individu à une ou plusieurs substances polluantes » (Lagadic et al., 1997).



D’après Lagadic et al. (1997)

Figure 3 : Outils possibles pour la surveillance environnementale en fonction des différents niveaux d’organisation du vivant.

Parmi tous ces outils, un seul permet d’évaluer les effets de l’exposition d’une pollution à une échelle sub-individuelle, le biomarqueur. Cet intérêt a engendré le développement d’un grand nombre de biomarqueurs depuis 30 ans. La partie 2 de ce chapitre est consacrée à définir plus en détail le biomarqueur et à décrire certains de ces outils de la surveillance environnementale.

1.4. Les modalités des études environnementales *in situ*

1.4.1. Généralités

L'évaluation du risque environnemental peut donc se faire au laboratoire, via des bioessais ou autres expérimentations. Ces études de laboratoire sont indispensables pour comprendre les mécanismes d'action d'un polluant sur un organisme, puisqu'ils permettent un contrôle quasi-total sur l'exposition. De plus, ces expérimentations sont pour la plupart standardisées, permettant la comparaison inter-expérimentale. Cependant, ces expériences ne sont pas représentatives de l'écosystème puisqu'un nombre important de variables ne sont pas prises en compte, telles que les variations des variables environnementales, les interactions entre les espèces biologiques, les polluants, les variations des concentrations de ces polluants, etc.

Les mésocosmes constituent un intermédiaire entre le laboratoire et le terrain. En effet, ils permettent le contrôle de l'exposition, la reproductibilité des expériences, l'utilisation de plusieurs niveaux trophiques, voire même le contrôle de quelques variables environnementales tout en étant plus représentatif de l'écosystème que les expériences de laboratoire (Caquet et al., 1996; Caquet et al., 2000). De par ses avantages, ce système d'exposition est de plus en plus utilisé, et particulièrement pour les pesticides (Jüttner et al., 1995; Caquet et al., 1996; Bony et al., 2008). Malheureusement, les mésocosmes présentent aussi des inconvénients freinant leur utilisation, tels que le coût et la durée d'installation avant les manipulations ou bien encore sa représentativité imparfaite de l'écosystème (Caquet et al., 2000).

Malgré un manque de contrôle sur les variables extérieures et une forte difficulté à la standardisation des méthodes, les études *in situ* (sur le terrain) sont les plus proches de la réalité environnementale (Baird et al., 2007). Pour ces études *in situ*, plusieurs stratégies existent, comme les biocapteurs (Cf. Ch. 2 , partie 1.3.2), le transfert d'individus d'un site à un autre, ou bien l'encagement d'organismes dans un milieu contaminé (Geffard et al., 2010).

1.4.2. L'encagement

L'encagement est une technique de biosurveillance active qui permet d'exposer des organismes, dont des poissons, à une pollution environnementale. Cet outil permet l'évaluation des impacts d'une contamination sur les individus encagés, souvent complexe et impossible à recréer au laboratoire (Geffard et al., 2010). Les poissons sains destinés à être encagés dans un milieu contaminé peuvent provenir d'un élevage ou bien d'un étang de référence, du moment qu'ils n'étaient pas précédemment exposés à une contamination avant le début de l'encagement.

Les avantages et limites de cette technique sont nombreuses, et listés par Oikari (2006) ainsi que Geffard et al. (2010). Les deux principaux avantages de l'encagement sont sans doute le contrôle de l'exposition et de l'organisme encagé. En effet, l'encagement permet de choisir la saison, la durée, les sites d'étude, tout en y amenant une espèce de poisson voulue, avec un âge, un sexe ratio et une taille déterminés. L'encagement autorise aussi l'utilisation d'un nombre suffisant d'individus pour les analyses statistiques. Cette stratégie d'exposition permet aussi de choisir l'emplacement des cages dans la colonne d'eau (en surface, au contact du sédiment, etc.) et de réduire le risque de prédation. Comparée au laboratoire, cette technique reste moins coûteuse car la contamination n'a pas besoin d'être créée artificiellement, générant d'importants déchets, et permet surtout de prendre en compte les variables environnementales, pouvant influencer sur les organismes et les polluants. En effet, ces variables, telles que la température, le pH, etc., et leurs variations, peuvent influencer le comportement des organismes encagés, leur métabolisme, la disponibilité des polluants, mais aussi leur internalisation dans les organismes. De surcroît, l'encagement prend en compte les interactions entre polluants et autres stress, difficiles à retranscrire au laboratoire (Pereira et al., 2006).

Cependant, l'encagement a des limites, liées à l'encagement en lui-même ou aux conditions environnementales. En plus de se limiter à des espèces sentinelles, résistantes à la pollution, seules quelques-unes peuvent être encagées. En effet, une espèce pratiquant du cannibalisme, asociale, avec un régime alimentaire restreint ou ne tolérant pas une large gamme de conditions climatiques, ne peut pas être encagée. Même si l'espèce choisie ne présente aucune de ces caractéristiques limitantes, l'encagement peut lui-même provoquer du stress, dû au confinement, à la densité utilisée ou toute autre contrainte (Ruane et al.,

1999; Brydges et al., 2009; Vargas-Chacoff et al., 2014; Andrade et al., 2015). Ce stress peut donc interagir sur les réponses de l’organisme engagé à la contamination (Vazzana et al., 2002; Andrade et al., 2015), voire même induire des effets plus importants (Trevisan et al., 2013). Les poissons engagés ne sont exposés qu’à une contamination localisée près de la cage, posant le problème de la représentativité spatiale. Cependant, ce critère peut aussi bien être un avantage si le milieu d’étude possède un fort gradient de concentration. La disponibilité en nourriture est un facteur limitant qui réduit la durée possible de l’engagement. Oikari (2006) préconise même d’éviter un engagement de plus d’une semaine si les poissons engagés ne sont pas nourris fréquemment. L’engagement d’une espèce rend difficile l’extrapolation des effets et réponses observés à l’échelle de la population ou de la communauté. Les conditions environnementales et leurs variations constituent des facteurs confondants, ainsi que la présence d’autres stress et leur interaction avec la contamination à étudier. Ces facteurs confondants peuvent influencer sur les effets de la contamination et les réponses des organismes engagés, et peuvent donc compliquer l’interprétation des résultats. Ces limites sont surtout dues aux conditions environnementales et non inféodées à l’engagement. Cependant, le nombre de facteurs confondants est certainement plus élevé avec l’engagement puisque les poissons ne peuvent pas bouger dans le milieu, comme par exemple pour éviter une température élevée. Enfin le vandalisme et le manque d’harmonisation des méthodes d’engagement chez les poissons peuvent aussi être considérés comme des inconvénients à l’engagement.

2. Un outil : le biomarqueur

2.1. Evolution de la notion de biomarqueur

La définition d'un biomarqueur donnée par Lagadic et al. (1997) citée dans la partie précédente (*changements structuraux ou fonctionnels observables et mesurables, qui prennent place à différents niveaux de l'organisation biologique, depuis la molécule jusqu'à l'organisme pris dans son intégralité, qui traduisent une exposition persistante ou passée d'un individu à une ou plusieurs substances polluantes*) a été remaniée par plusieurs auteurs (Huggett et al., 1992; Burgeot et Bessinetton, 1999; Van der Oost et al., 2003), jusqu'à la formulation de plusieurs critères que doit respecter un biomarqueur :

- Un biomarqueur se doit d'être évalué facilement et rapidement, être le moins invasif possible tout en étant fiable.
- Des liens entre les effets observés au niveau sub-individuel et aux niveaux d'organisation plus élevés doivent être observés pour confirmer la pertinence écologique de ces biomarqueurs, tout autant que les liens mécanistiques entre la contamination chimique et les effets / réponses analysés.
- La variabilité basale des biomarqueurs (due aux paramètres biotiques et abiotiques) doit être connue et prise en compte dans les analyses.
- Un biomarqueur doit être sensible à une exposition à un polluant et/ou servir comme un signal précoce d'effet.
- Le temps de réponse des biomarqueurs à une contamination spécifique doit être connu.

Cependant ces critères sont rarement tous respectés (Flammarion et al., 2001). Forbes et al. (2006) ont fait une diatribe de ces critères, en l'argumentant de plusieurs exemples. Brièvement, même si des biomarqueurs ne sont pas invasifs (e.g. évaluation des protéines de stress mesurées sur le mucus, immunomarqueurs analysés à partir de l'hémolymphe sécrétée par certains gastéropodes ou à partir d'un prélèvement de sang, etc.) un grand nombre d'entre eux nécessitent le sacrifice de l'individu, notamment quand ce dernier est de petite taille. Une critique formulée par ces auteurs est liée au manque de recul sur la

correspondance entre la variabilité des réponses biologiques et les effets d'une exposition à des polluants, ou plus simplement, à partir de quel niveau les variations mesurées des réponses biologiques correspondent à un effet ou une réponse à l'exposition à un polluant. De surcroît, hormis au laboratoire, où les conditions environnementales de l'exposition peuvent être calibrées/contrôlées, des facteurs confondants peuvent augmenter la variabilité des réponses biologiques mesurées. Ils remarquent le fait que peu d'études ont réussi à faire le lien entre les réponses biologiques évaluées au sein d'un individu et les conséquences sur la population ou la communauté. Le caractère prédictif des biomarqueurs est aussi remis en cause dans cette étude puisqu'ils soulignent des variations de certains biomarqueurs (e.g. activités antioxydantes, dommages à l'ADN) qui perdurent après l'exposition à une pollution. Les niveaux de dommages ou de réponses ne sont probablement pas identiques lorsqu'ils sont analysés le jour suivant l'exposition ou quelques jours après. Enfin, Forbes et al. (2006) appuient sur l'ambiguïté des classifications des biomarqueurs réalisées par De Lafontaine et al. (2000) (c-à-d, biomarqueurs de dommages et de défenses) ou par Van der Oost et al. (2003) (c-à-d, biomarqueurs d'exposition, d'effet ou de susceptibilité), en soulignant qu'il est difficile de conclure si un biomarqueur de réponse indique une détérioration (ou un effet) ou une réponse homéostatique, indiquant seulement que le poisson a été exposé à un xénobiotique.

Malgré ces critiques justifiées, les biomarqueurs présentent des avantages certains qui leur confèrent une place (pour quelques uns pour l'instant) dans des programmes de surveillance environnementale. C'est le cas notamment pour l'activité du lysozyme, les dommages à l'ADN, les agrégats macrophagiques, etc. (Sanchez et Porcher, 2009). Les biomarqueurs peuvent donner des informations quant à la biodisponibilité des polluants et leur métabolisation dans le vivant (Sanchez et Porcher, 2009).

L'analyse d'un seul biomarqueur ne peut ni refléter l'état de contamination d'un milieu, ni l'étendue des effets et réponses de l'organisme soumis à cette contamination (Sanchez, 2007). Il est donc préférable d'utiliser une approche multi-biomarqueurs (Sanchez, 2007; Bacchetta et al., 2014). Cette approche multi-biomarqueurs n'est utile que si les biomarqueurs utilisés sont complémentaires (Galloway et al., 2004; Amiard et Amiard Triquet, 2008). Cependant, un ensemble de biomarqueurs centralisés sur une seule fonction

biologique, comme par exemple la reproduction, ne permet pas d’observer les effets globaux de la contamination. Il est donc nécessaire de bien choisir les biomarqueurs avant de lancer une étude environnementale avec une approche multi-biomarqueurs. Par ailleurs, en améliorant les connaissances sur la variabilité des réponses biologiques sans contamination, ces biomarqueurs pourraient garder leur rôle de signal précoce de perturbation chez un organisme (Sanchez et Porcher, 2009).

Sanchez et Porcher (2009) concluent que les biomarqueurs, après l’approfondissement des connaissances (variabilité des niveaux de base, compréhension de certains mécanismes d’action), pourraient être intégrés dans une approche multi-paramétrique et multi-organisationnelle (différents niveaux du vivant) permettant d’améliorer l’ERE.

Une approche multi-biomarqueurs a été mise en place lors des études *in situ* réalisées pendant la thèse comprenant des biomarqueurs d’immunotoxicité, du stress oxydant, de génotoxicité, de neurotoxicité, de détoxification et d’atteintes cellulaires et tissulaires.

La justification succincte du choix de ces biomarqueurs, ainsi que des analyses associées est argumentée dans le chapitre 3, partie 3. Les possibles liens entre ces biomarqueurs (ainsi que leur nature) lors d’une exposition à un polluant métallique sont schématisés sur la Figure 4. Il faut toutefois préciser que ce schéma n’a pas pour ambition de lister exhaustivement les biomarqueurs qui peuvent être évalués lors d’une contamination métallique, ni d’être complet sur les possibles effets de cette contamination.

Les paragraphes suivants détaillent le rôle physiologique des fonctions biologiques analysées ainsi que l’intérêt et les limites de l’utilisation des biomarqueurs associés pour l’écotoxicologie.

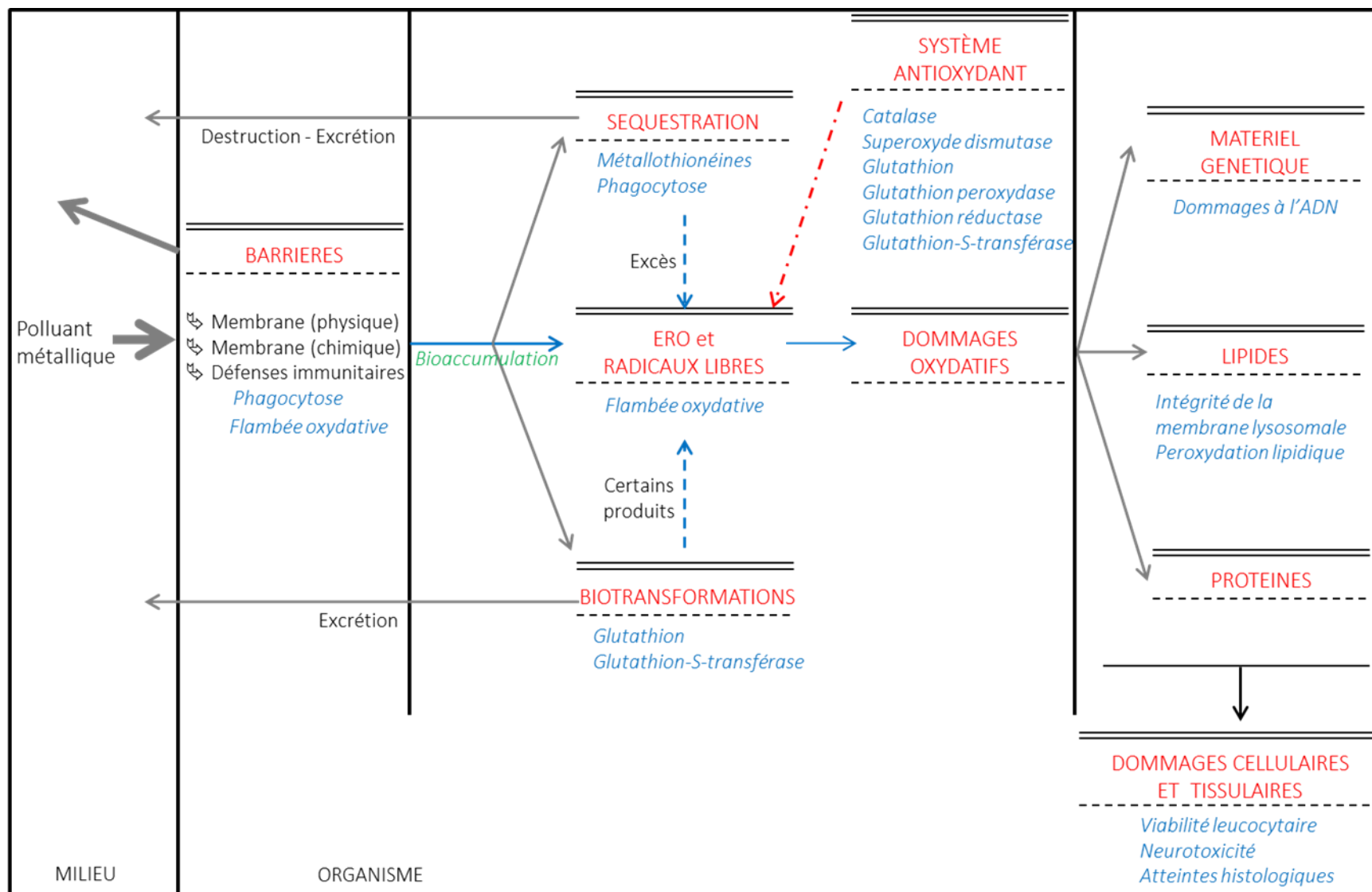


Figure 4 : Schéma illustrant le choix des biomarqueurs utilisés pour les travaux de thèse. Les biomarqueurs analysés sont inscrits en bleu. Cette liste n’a pas pour ambition d’être exhaustive, et ce schéma reliant les biomarqueurs entre eux et à une contamination métallique ne se veut pas complet.

2.2. Les immunomarqueurs

2.2.1. Quelques rôles physiologiques du système immunitaire

Le système immunitaire est crucial pour le maintien de l'intégrité de l'organisme et sa protection envers les constituants étrangers (xénobiotiques, bactéries, virus et parasites) ainsi que les constituants du « soi » modifiés (Kouassi et al., 2003; Magnadottir, 2006).

Le système immunitaire peut être divisé en deux types : l'immunité innée ou naturelle et l'immunité acquise ou adaptative. L'immunité innée constitue la première barrière de défense face aux pathogènes. Elle est immédiate mais ni dotée de mémoire ni spécifique, contrairement à l'immunité acquise, mise en place soit par des composants de l'immunité innée, soit par mémoire. L'immunité innée peut elle-même être divisée en deux parties, l'immunité innée externe, représentée par des barrières physiques (peau, tractus digestif, branchies, mucus) et par une barrière humorale présente dans le mucus. La deuxième partie du système immunitaire inné est interne, caractérisée par une défense humorale, cellulaire et par le phénomène de l'inflammation.

Dans ce manuscrit, seuls des biomarqueurs de l'immunité innée seront évalués, et donc les protagonistes de l'immunité acquise ne seront pas détaillés ci-dessous.

2.2.1.1. Défense humorale de l'immunité innée

Ces défenses sont présentes dans le mucus, des tissus et le plasma des poissons, généralement sous forme de protéines ou de molécules. On y distingue le lysozyme, les protéines de phase aiguë de l'inflammation ainsi que les interférons (Bols et al., 2001).

Le lysozyme est une enzyme avec un fort pouvoir bactéricide. Il dégrade la paroi des bactéries, notamment les bactéries Gram⁺, et peut s'attaquer à la couche interne des bactéries Gram⁻ si cette dernière est accessible (Bols et al., 2001; Saurabh et Sahoo, 2008). Grâce à sa nature opsonique, il permet l'activation des phagocytes et du complément. Il peut aussi s'attaquer à la paroi des champignons et de quelques invertébrés. Il a également été démontré que le lysozyme pouvait créer un film protecteur du tube digestif (Saurabh et Sahoo, 2008).

Les protéines de la réaction inflammatoire, dont la production est activée après une blessure ou infection, sont un ensemble de protéines qui regroupe des constituants du complément,

des opsonines, des anti-protéases, des lectines, des facteurs de coagulation, etc. (Gerwick et al., 2002; Magnadottir, 2006). Leurs rôles sont de contenir les agents infectieux et de les éliminer en fonction de leur nature et d'aider le retour à l'homéostasie ainsi que la réparation tissulaire (Bayne et Gerwick, 2001; Bols et al., 2001).

2.2.1.2. Défense cellulaire de l'immunité innée

Lors d'une infection ou d'un dommage tissulaire, de nombreuses cellules non-spécifiques sont mises en place pour la défense de l'organisme. Parmi ces défenses cellulaires, se trouvent les globules blancs ou leucocytes (composés des lymphocytes, granulocytes et macrophages/monocytes), les centres mélano-macrophagiques, le système réticuloendothélial et les cellules cytotoxiques non-spécifiques. Dans cette partie, nous détaillerons davantage les deux fonctions communément utilisées comme indicateurs du système immunitaire inné lors d'études environnementales, à savoir la phagocytose et la flambée oxydative.

La phagocytose est le processus d'ingestion et de destruction de particules solides et inertes. Elle est réalisée par certains types de leucocytes, alors appelés phagocytes : les granulocytes neutrophiles ainsi que les macrophages (au niveau des tissus) ou monocytes (au niveau du sang) (Bonga, 1997). Ils peuvent phagocyter aussi bien des particules étrangères, que des particules du « soi » (cellules sénescents, débris cellulaires) (Allen et Aderem, 1996). Cette activité se déroule en plusieurs étapes, décrites dans la Figure 5.

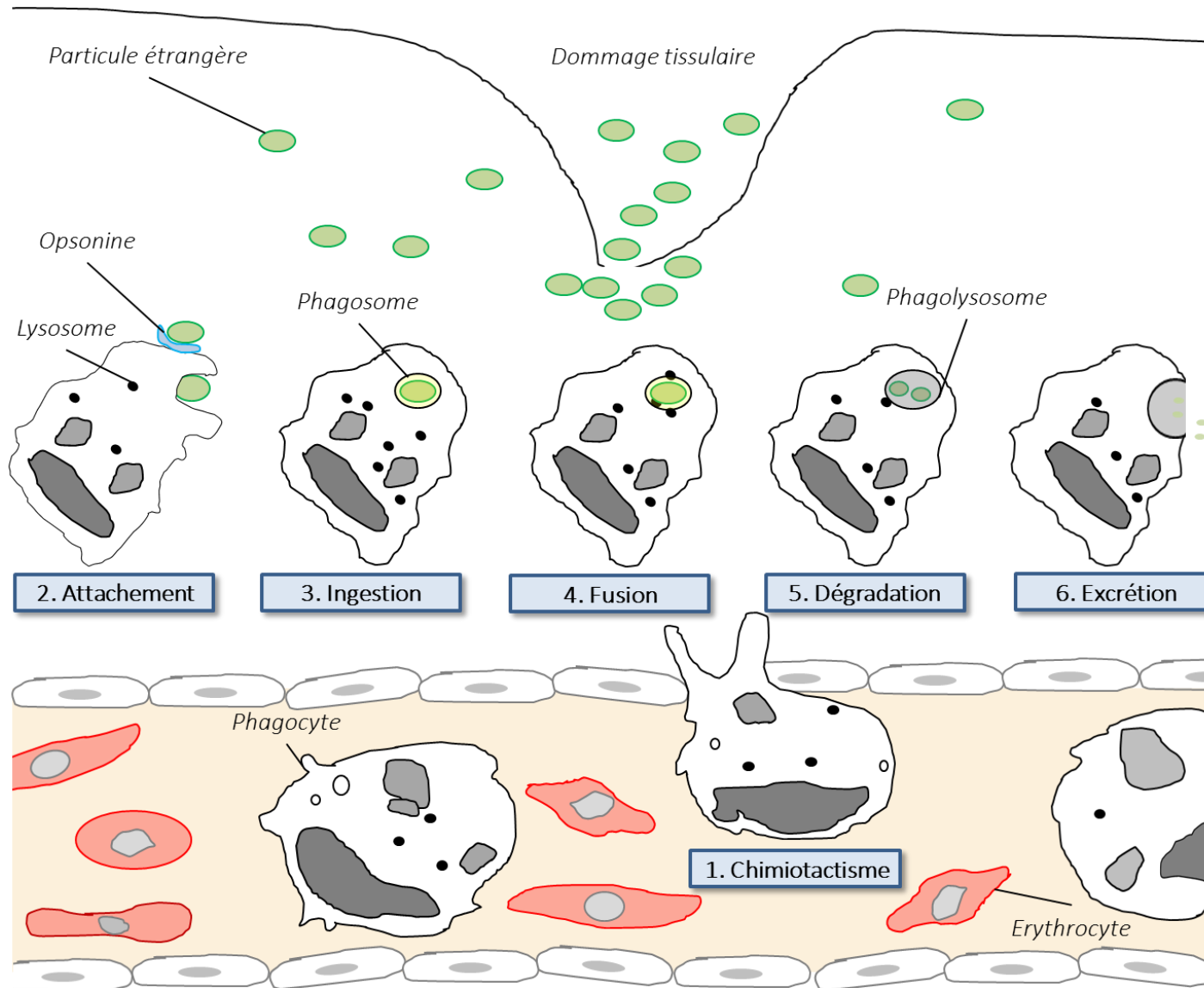


Figure 5 : Schéma simplifié du processus de phagocytose suite à un dommage tissulaire.

Dans un premier temps, les cellules phagocytaires sont attirées sur le site de l'infection ou de l'inflammation par **chimiotactisme**. Ce phénomène est déclenché par plusieurs agents, dits chimiotactiques, provenant des pathogènes qui les libèrent lors de leur lyse, ou bien par des composants du système immunitaire, tels que d'autres leucocytes ou bien via le complément. Lorsque ces agents se fixent à un récepteur, soit directement, soit par l'intermédiaire d'opsonines (lysozyme, lectines, anticorps ou composants du complément, etc.), la particule étrangère va donc s'**attacher** à la membrane des phagocytes (Revillard, 2001; Kouassi et al., 2003). Cette fixation engendre la création d'extensions de la membrane, ou pseudopodes, qui vont entourer la particule étrangère pour ensuite l'**ingérer** lorsque ces pseudopodes fusionnent (Revillard, 2001). Cette fusion va donner lieu à la formation du phagosome, vésicule contenant la particule étrangère. Cette vésicule cytoplasmique va **fusionner** avec le lysosome pour former le phagolysosome. C'est à l'intérieur de ce dernier organe que va s'effectuer la **dégradation** des particules étrangères. Les processus de dégradation sont schématisés sur la Figure 6. Le lysosome, vésicule cytoplasmique, procure les protéines et enzymes capables de lyser les particules étrangères, tout en amenant un pH acide (Holtzman, 2013). Il s'agit d'une lyse indépendante de l'oxygène (Revillard, 2001). L'autre voie de dégradation est la flambée oxydative, et est donc dépendante de l'oxygène. Cet oxygène est apporté par une surconsommation lors de la formation du phagosome (Revillard, 2001). La formation des espèces réactives à l'oxygène (ERO) dépend de trois processus enzymatiques : la myéloperoxydase, l'oxyde nitrique (NO) synthase et la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase (Cf. Figure 6). La flambée oxydative commence par la réduction de l'oxygène en radical anionique superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) par la NADPH oxydase, puis cette ERO peut être modifiée, grâce ou non à l'action d'enzymes en autres ERO comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), l'acide hypochloreux (HOCl), le radical hydroxyle (HO^{\bullet}) et l'oxygène singulet (1O_2) (Bols et al., 2001). Ces ERO ont un fort pouvoir de lyse vers les exogènes, mais aussi envers l'organisme lui-même. En plus de ces ERO, la formation d'espèces réactives de l'azote peut aussi se mettre en place contre les bactéries et les cellules tumorales (Neumann et al., 2001; Revillard, 2001), dont le radical monoxyde d'azote (NO^{\bullet}). L'**excrétion** des débris des particules étrangères par le phagocyte est possible après leur dégradation.

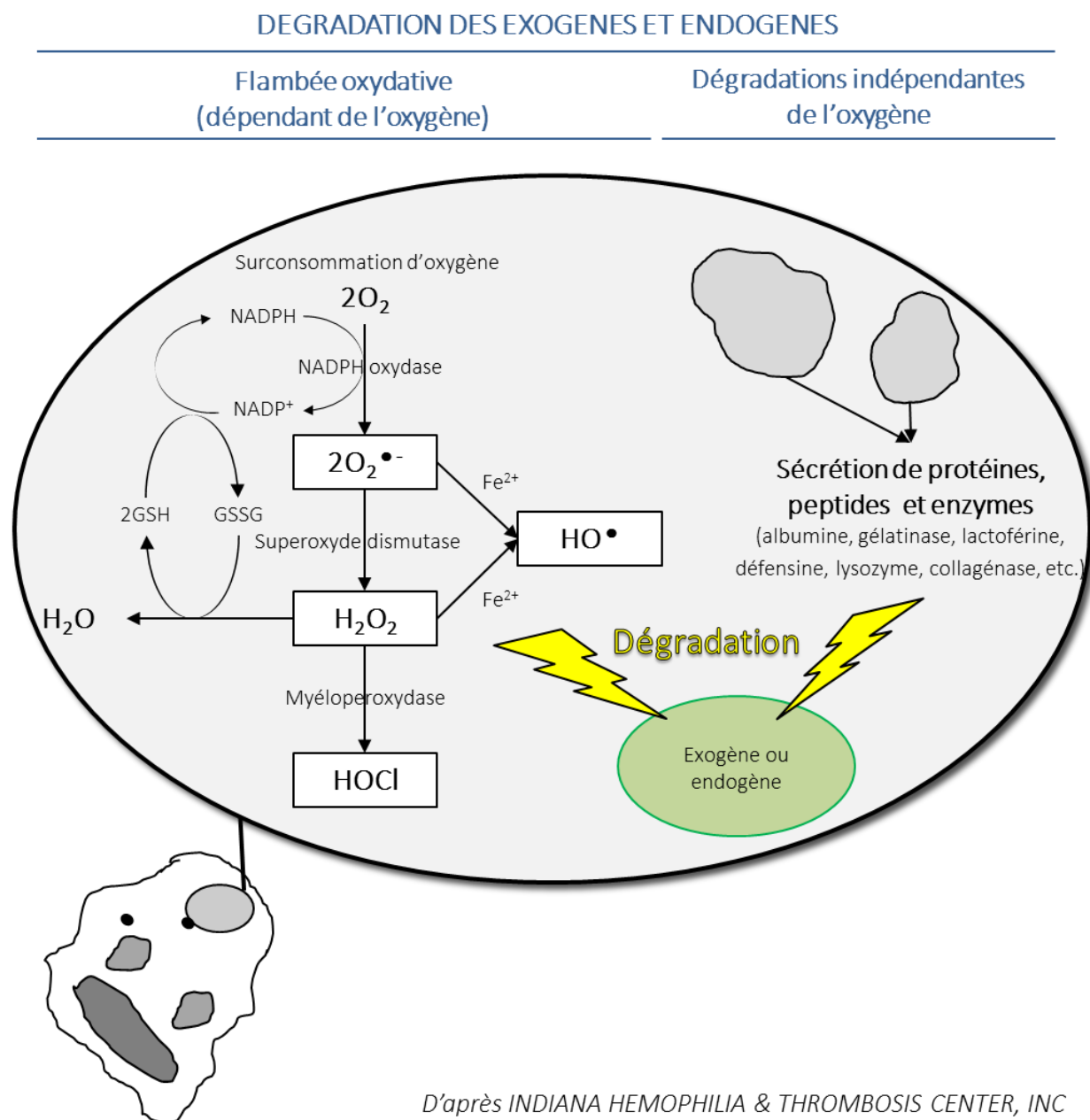


Figure 6 : Processus de dégradation des exogènes et endogènes dans un phagocyte.

D’autres mécanismes cellulaires sont caractéristiques de l’immunité non-spécifique, tels que le système réticuloendothélial et les cellules cytotoxiques non-spécifiques.

Bien que les composants cellulaires de l'immunité innée soient divers et nombreux, les études écotoxicologiques se sont concentrées principalement sur les mécanismes de phagocytose, et plus particulièrement l'ingestion et la création d'ERO, la flambée oxydative (Fournier et al., 2000).

2.2.2. Intérêts et limites des immunomarqueurs

L'immunotoxicité peut être définie comme l'ensemble des effets délétères directs ou indirects des xénobiotiques sur les composants du système immunitaire et interférant avec leurs fonctions de protection, ou induisant une ou plusieurs réponses immunitaires d'un organisme (Krzystyniak et al., 1995; Kouassi et al., 2003). Ces immunotoxiques peuvent impacter tous les composants du système immunitaire, de la structure des protagonistes (organes, tissus et cellules), les mécanismes de l'immunité innée et acquise ainsi que les fonctions associées à ce système.

Le premier avantage de l'évaluation de plusieurs immunomarqueurs est certainement le fait qu'elle renseigne sur l'état de santé de l'organisme. Lorsque le système immunitaire est modifié par un polluant, l'organisme peut devenir immunodéficient. L'organisme devient moins résistant face à ce polluant et plus susceptible envers la formation de cancers et tumeurs, mais aussi envers l'infection de pathogènes (bactéries, virus, parasites) (Brousseau et al., 1997; Fournier et al., 2000; Bols et al., 2001). Ceci peut avoir des répercussions sur les populations ou communautés lorsque tous les individus sont exposés à un agent immunosuppresseur capable de diminuer leur résistance à un stress pathogène (Bols et al., 2001). Inversement, l'exposition à un contaminant peut entraîner une immunostimulation, pouvant mener à des maladies auto-immunes, porter atteinte aux tissus ou développer des allergies (Brousseau et al., 1997). Cette réactivité envers un stress pathogénique fait des composants immunitaires des marqueurs de choix lors d'un stress biologique (Neumann et al., 2001).

Les biomarqueurs du système immunitaire sont très variés, interagissant entre eux, mais aussi avec de nombreuses autres fonctions physiologiques et métaboliques (Brousseau et al., 1997; Bols et al., 2001). Bien que le système immunitaire chez les vertébrés soit très complexe, il reste toutefois important lors d'études d'écotoxicité du fait que ces composants et

mécanismes soient conservés au fil de l'évolution (Bols et al 2001, Hoffman et al 1999). Ces mécanismes sont donc mesurables chez un grand nombre d'organismes, aussi bien vertébrés qu'invertébrés. Cette complexité présente aussi un avantage. En effet, de nombreux paramètres peuvent être mesurés (la capacité de phagocytose, l'activation des lymphocytes, l'activité du lysozyme, la production d'anticorps, etc.), avec au moins une méthode associée et connue (Bols et al., 2001). De plus, l'analyse d'une grande partie de ces biomarqueurs couvre une large gamme d'effets et peut renseigner sur l'état global des capacités de défense d'un organisme soumis à un stress (Amiard et Amiard Triquet, 2008).

Les impacts des polluants sur le système immunitaire, ainsi que les réponses qui en découlent, bien que dépendants de la nature de ce polluant, sont généralement considérés comme très précoces (Brousseau et al., 1997; Fournier et al., 2000; Auffret et al., 2006). Par exemple, les métaux peuvent agir sur ce système à des concentrations n'impliquant aucun autre effet (Brousseau et al., 1997).

Les variations des immunomarqueurs peuvent être liées à des fluctuations d'autres biomarqueurs. En plus du lien évident entre certains immunomarqueurs et des marqueurs du statut oxydatif de l'organisme, ils peuvent être régulés par des biomarqueurs neurologiques (Song et al., 2015; Weinstein et al., 2015).

Grâce à toutes ces raisons, l'immunotoxicité des produits chimiques est de plus en plus souvent analysée lors d'études écotoxicologiques, que ce soit au laboratoire, ou bien sur le terrain, pour évaluer les possibles effets de divers polluants, tels que des métaux (Rougier et al., 1994; Garcia-Medina et al., 2011), des perturbateurs endocriniens (Bado-Nilles et al., 2014b), des composés organo-phosphorés (Dunier et al., 1991; Díaz-Resendiz et al., 2015) ou encore un mélange de ces polluants (Salo et al., 2007; Jolly et al., 2012; Bado-Nilles et al., 2015a).

Si l'utilisation de biomarqueurs immunitaires lors d'études écotoxicologiques présente de nombreux avantages, elle a aussi certaines limites. Le fait que les immunomarqueurs réagissent à de nombreuses sources de pollution ne permet pas de statuer sur la contamination présente dans le milieu d'étude et encore moins de quantifier cette pollution. La caractérisation chimique des polluants dans le milieu et dans le biote doit donc être

complémentaire à l'évaluation de l'immunotoxicité. La complexité du système immunitaire, démontrée comme avantageuse dans le paragraphe précédent, entraîne aussi un inconvénient. Les différents protagonistes de l'immunité peuvent réagir différemment à un polluant et à des moments différents, rendant la conclusion des effets de ce polluant sur le système immunitaire délicate (Brousseau et al., 1997; Auffret et al., 2006). Un exemple est donné par Sanchez-Dardon et al. (1999) qui ont montré que la phagocytose des truites arc-en-ciel, *Onchorynchus mykiss*, exposées à deux concentrations d'un mélange métallique (cadmium, mercure et zinc) était diminuée. Par contre, l'activité oxydative de ces mêmes truites n'était pas impactée à la plus faible concentration du mélange, mais augmentée à la plus forte. Même pour des biomarqueurs identiques, les réponses à un polluant peuvent varier en fonction de l'organe lymphoïde choisi. Jolly et al. (2014) ont montré ces différences sur le gardon, *Rutilus rutilus*, en soulignant une surproduction d'ERO après une exposition à de l'aluminium, des lipopolysaccharides, ou les deux uniquement au niveau des leucocytes contenus dans le rein antérieur, et pas au niveau de ceux de la rate de ces poissons.

Ces biomarqueurs sont connus pour varier selon un grand nombre de variables, telles que la nature, la concentration du toxique, l'espèce, le sexe et l'âge de l'organisme testé, la durée et la période de l'exposition, les paramètres physicochimiques de l'eau, etc. (Brousseau et al., 1997; Fournier et al., 2000; Magnadottir, 2006; Saurabh et Sahoo, 2008). Même s'il est possible de calibrer la plupart de ces variables lors d'expériences, certaines comme le stress de manipulation, ou les conditions environnementales lors d'études *in situ* ne peuvent pas l'être. Les possibles effets de ces facteurs confondants sur les réponses immunitaires sont discutés dans le chapitre 7, partie 3 de ce manuscrit. Cette limite en induit une nouvelle. En effet, afin de limiter les effets d'un facteur confondant, il serait intéressant de standardiser les protocoles d'évaluation de ces biomarqueurs. Or, même si des projets sont en cours, aucune harmonisation d'évaluation de ces biomarqueurs n'est, à ce jour, réalisée (Holsapple, 2002; Amiard et Amiard Triquet, 2008).

Enfin, puisque qu'encore aujourd'hui, aucune valeur seuil des immunomarqueurs n'a été définie, il est difficile de conclure sur la gravité d'un polluant sur les défenses immunitaires d'un organisme et ses conséquences.

2.3. Les biomarqueurs du stress oxydant

2.3.1. Le stress oxydant

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre de la balance oxydante, qui met en relation d'un côté les activités pro-oxydantes, et de l'autre les activités antioxydantes. Sans stress, cette balance est à l'équilibre, avec des activités pro-oxydantes naturelles, comme la respiration mitochondriale, parfaitement contrôlées par les activités antioxydantes (Favier, 2003). Cependant, de nombreux mécanismes et polluants peuvent faire pencher cette balance et donc créer un stress oxydant via :

- Une surproduction d'ERO
- Des altérations des fonctions antioxydantes
- Une surproduction d'ERO et une altération des fonctions antioxydantes

Parmi les phénomènes précurseurs d'ERO, la respiration mitochondriale est le plus important. Lors du métabolisme basal, un faible pourcentage d'oxygène (2 à 5 %) peut être transformé en anion superoxyde après la fuite d'un électron (Michiels et al., 1994; Lushchak, 2011). Ce pourcentage peut être augmenté lors de stress induisant une respiration plus élevée (Favier, 2003).

Des mécanismes enzymatiques peuvent aussi créer des ERO, notamment lorsque cela inclut des cycles d'oxydo-réduction. Le cytochrome P450, complexe enzymatique catabolisant des cellules ou xénobiotiques, peut créer des ERO dans le réticulum endoplasmique, le cytosol et les peroxysomes (Michiels et al., 1994; Lushchak, 2011). D'autres enzymes sont aussi actrices de la création d'ERO, comme la xanthine oxydase et la tryptophane dioxygénase. Comme décrit ci-dessus (Ch. 2, partie 2.2.1.2), la réaction immunitaire lors d'une infection chez un organisme peut conduire à une augmentation de la consommation d'oxygène et la création d'ERO par la NADPH oxydase et la NO synthase. Ces ERO peuvent aussi provenir de l'auto-oxydation de petites molécules, comme les catécholamines, oxydation alimentée par l'oxygène et les irradiations, et notamment les rayons ultraviolets (Sies, 1997; Favier, 2003). Ces rayonnements peuvent aussi scinder une molécule d'eau pour produire le singlet d'oxygène et l'anion superoxyde (Favier, 2003). Enfin, les métaux peuvent catalyser des réactions produisant des radicaux hydroxyles à partir de peroxydes d'hydrogène et de l'anion

superoxyde (Michiels et al., 1994; Favier, 2003). Cette réaction est appelée réaction de Haber-Weiss, et est particulièrement catalysée par le fer, le cobalt ou bien le cuivre (Revillard, 2001).



C'est surtout le cas pour le fer, métal essentiel qui catalyse une autre réaction (réaction de Fenton), qui n'a besoin que du peroxyde d'hydrogène pour créer un radical hydroxyle :



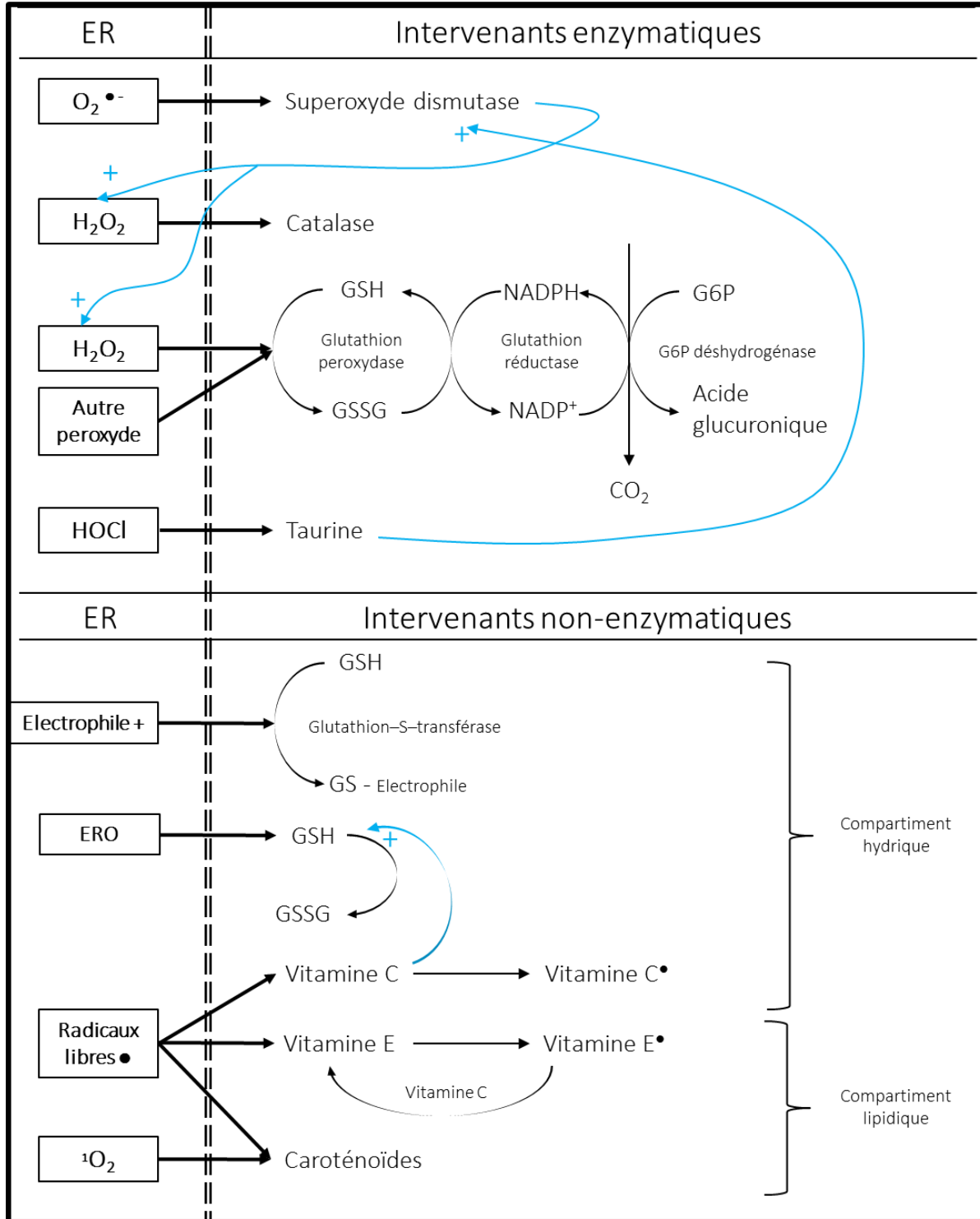
Toutes ces ERO sont essentielles à l'organisme pour des fonctions comme la médiation cellulaire, ou la défense envers divers exogènes. Par contre lors d'un stress oxydant, les ERO ne ciblent pas que les cellules étrangères à l'organisme, mais vont aussi attaquer les cellules du « soi » pouvant causer des dommages à l'hôte, notamment au niveau des lipides, des protéines et des acides nucléiques (Sies, 1997; Revillard, 2001).

Afin d'éliminer les causes du dommage oxydatif, ou de le limiter, l'organisme peut mettre en place plusieurs systèmes, enzymatiques ou non-enzymatiques, schématisés sur la Figure 7.

2.3.2. Activités antioxydantes non-enzymatiques

Les protagonistes antioxydants non-enzymatiques ont pour but général de piéger les radicaux libres, en récupérant un électron libre et les transformant en ion stable. Ces activités peuvent se dérouler dans un compartiment hydrique, où vont agir la vitamine C et le glutathion réduit (GSH), et dans un compartiment lipidique avec la vitamine E, et les caroténoïdes (Sies, 1997; Lushchak, 2011).

Le glutathion réduit est un tripeptide avec de nombreux rôles, comme la régulation de la synthèse de certaines protéines, et est un cofacteur de plusieurs enzymes (Ross, 1988). Ses plus grands rôles demeurent dans la régulation du statut redox des cellules et tissus, mais aussi dans la défense antioxydante de l'organisme (Meister et Anderson, 1983). En effet, de par sa nature de nucléophile, il peut se lier avec les électrophiles, mais peut aussi réduire plusieurs autres ERO (Kosower, 1978; Ross, 1988). Il agit donc dans les activités antioxydantes non-enzymatiques mais aussi enzymatiques (Cf. Ch. 2, partie 2.3.3). Cette interaction entre le GSH et des composés électrophiles est catalysée par une enzyme, la glutathion-S-transférase (GST) (Smith et al., 1983; Saez et al., 1990).



D'après JP REVILLARD, 1998

Figure 7 : Elimination ou piégeage des différentes espèces réactives par les mécanismes enzymatiques et non-enzymatiques. ER : espèces réactives ; ERO : espèces réactives de l’oxygène ; $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde ; H_2O_2 : peroxyde d’hydrogène ; HOCl : acide hypochloreux ; HO^{\bullet} radical hydroxyle ; 1O_2 oxygène singulet ; GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; G6P : glucose-6-phosphate ; GS : radical glutathionyl.

2.3.3. Activités antioxydantes enzymatiques

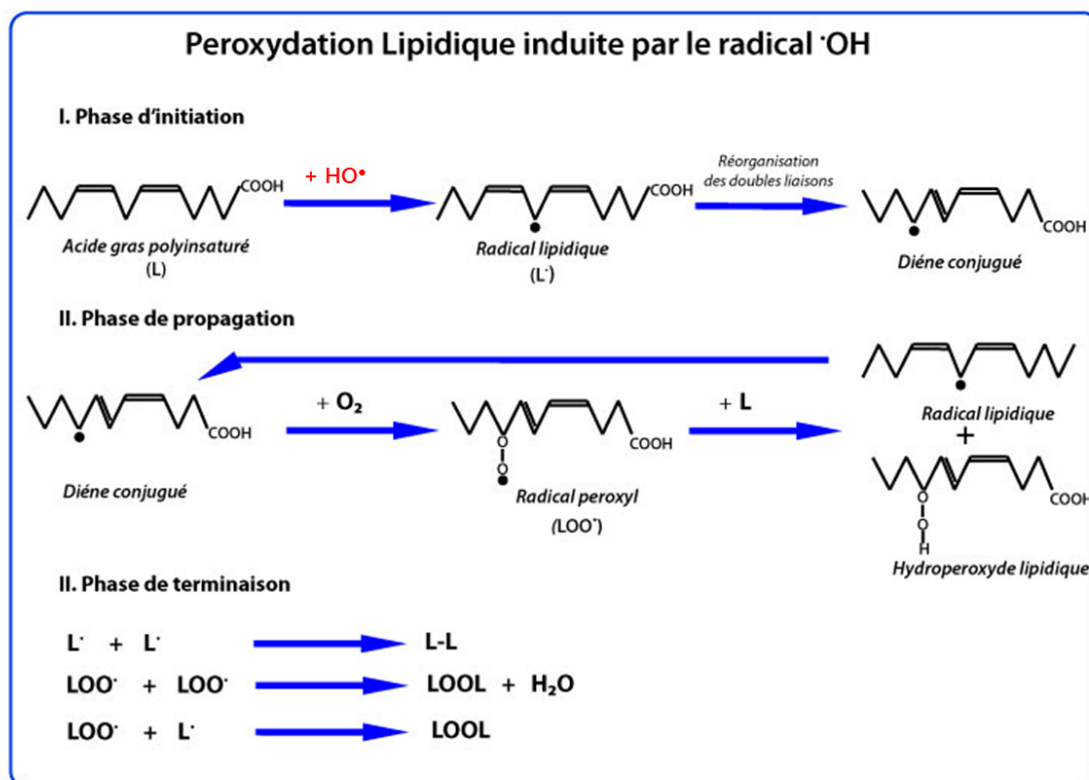
Lorsque le radical anionique $O_2^{\bullet-}$ est créé pour son pouvoir lytique, il est ensuite pris en charge par l'enzyme ubiquitaire superoxyde dismutase (SOD). Comme son nom l'indique, cette enzyme va donc catalyser la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène, une autre ERO (Ross, 1988). La SOD est considérée comme l'enzyme antioxydante la plus importante puisqu'elle est la première barrière de défense contre les ERO (Kosower, 1978; Aksnes et Njaa, 1981; Michiels et al., 1994). L'organisme dispose de deux mécanismes pour ensuite se protéger de ce peroxyde nouvellement formé. Premièrement, la catalase (CAT) va éliminer le peroxyde d'hydrogène ainsi que son pouvoir de dégradation en le transformant en molécules d'eau et d'oxygène (Aksnes et Njaa, 1981). L'activation de la CAT est coûteuse, notamment en NADPH, si bien qu'une autre voie de dégradation du peroxyde d'hydrogène est possible, via le complexe glutathion/glutathion peroxydase (GPx) (Amiard et Amiard Triquet, 2008). Bien que le rôle chimique de dégradation du glutathion soit décrit dans le paragraphe ci-dessus, il a aussi un rôle dans la voie enzymatique. Grâce à deux autres enzymes et au GSH, l'organisme peut se protéger du peroxyde d'hydrogène et des peroxydes organiques via la glutathion peroxydase. Cette enzyme catalyse la réduction des peroxydes en produits non réactifs, au détriment de l'oxydation du glutathion réduit en glutathion oxydé (GSSG) (Kosower, 1978; Ross, 1988; Parihar et al., 1997). Afin de renouveler le GSH, une enzyme est nécessaire : la glutathion réductase (Gr). Cette enzyme est toutefois dépendante du NADPH, pour que la transformation de GSSG en GSH soit effective (Ross, 1988). Enfin, une enzyme (la glucose-6-phosphate déshydrogénase, G6PDH) permet de récupérer le NADPH. Une diminution d'une seule de ces enzymes (GPx, Gr, G6PDH) peut donc enrayer toute cette réaction en chaîne et donc conduire à un stress oxydatif (Morales et al., 2004). De plus, ces activités enzymatiques ne peuvent pas fonctionner sans le GSH, cofacteur pour la GST et pour le GPx (Morales et al., 2004). Le rôle de détoxication de la GST est de conjuguer le GSH avec un composé électrophile, le rendant plus soluble et facile à éliminer (Nimmo, 1987).

2.3.4. Le dommage oxydatif

Lors d'un déséquilibre de la balance oxydante, les ERO peuvent entraîner des dommages oxydatifs au niveau des protéines, lipides et acides nucléiques. Bien que l'organisme mette en

place des systèmes antioxydants pour empêcher ou limiter ces dommages, ces systèmes peuvent ne pas être assez efficaces, ou même être altérés par certains xénobiotiques.

Les dommages oxydatifs sont le plus souvent évalués au niveau des lipides des organismes, et plus particulièrement des organismes aquatiques, pourvus de plus d'acides gras polyinsaturés que des organismes terrestres (Lushchak, 2011). En effet, les lipides sont sujets aux dommages oxydatifs du fait que l'oxygène et la plupart des radicaux libres sont lipophiles. Ces radicaux libres attaquent plus les acides gras polyinsaturés que les acides gras monosaturés ou saturés (Michiels et al., 1994; Hulbert et al., 2007; Lushchak, 2011). Les radicaux vont extraire un atome d'hydrogène à un atome de carbone au niveau de sites allyliques, plus facile d'accès au niveau des acides gras polyinsaturés (Hulbert et al., 2007). Le carbone se retrouve avec un électron libre et formera un radical lipidique. La dégradation des acides gras polyinsaturés peut mener à la formation d'autres composés, tels que des cétones, des alcanes, des époxydes et aldéhydes dont le malondialdéhyde (MDA) (Amiard et Amiard Triquet, 2008). Le radical lipidique formé peut ensuite se lier à une molécule d'oxygène dissous pour créer un radical peroxyde, hautement réactif (Ross, 1988; Hulbert et al., 2007). Ce dernier peut attaquer les protéines membranaires ainsi que l'ADN (Hulbert et al., 2007; Monaghan et al., 2009). En présence d'un autre acide gras polyinsaturé, cette réaction peut se reproduire, et donc se propager si aucune défense antioxydante n'intervient (Ross, 1988; Michiels et al., 1994). Des hyperoxydes lipidiques peuvent aussi être créés, modifiant les fonctions des membranes, dont leur fluidité. De surcroît, la fragmentation de ces hyperoxydes donne lieu à des intermédiaires réactifs, tels que des aldéhydes qui sont plus réactifs que les radicaux libres en agissant sur les groupes nucléophiles des protéines et en créant des adduits sur l'ADN (Hulbert et al., 2007). La peroxydation lipidique est donc considérée comme un dommage oxydatif, mais aussi comme une cause de la production de radicaux libres et d'ERO capables de dommages protéiques et à l'ADN. La Figure 8 résume les grandes étapes de la peroxydation lipidique.



Source : Michel DEMARCHEZ, 2012, *Le stress oxydant cutané*

Figure 8 : Récapitulatif des étapes de la peroxydation lipidique due au radical hydroxyle.

Une autre cible des ERO et des radicaux libres sont les protéines. En plus de dommages dus aux résidus de la peroxydation lipidique, les protéines peuvent être directement oxydées, et plus particulièrement les enzymes cellulaires et les protéines de transport (Favier, 2003).

L'acide désoxyribonucléique (ADN) est aussi une molécule cible des ERO. Les effets des ERO sur cette molécule sont décrits dans ce chapitre, partie 2.4.1.

2.3.5. Intérêts et limites des marqueurs du stress oxydant

La possibilité d'évaluer les causes (production d'ERO), les conséquences (dommages oxydatifs) et les réponses de l'organisme (système antioxydant) au stress oxydant constitue un important intérêt à l'évaluation de ces marqueurs. En effet, cette vision multi-paramétrique permet plus facilement la relation entre les biomarqueurs et la pollution (Ruas et al., 2008). De plus, cette analyse multi-paramétrique permet de prendre en compte les

interactions (synergiques ou antagonistes) entre différents biomarqueurs du stress oxydant, qui peuvent masquer ou amplifier les effets d'une pollution lorsque seuls un ou deux de ces marqueurs sont analysés (Monaghan et al., 2009).

Du fait qu'un grand nombre de polluants peuvent induire la formation d'ERO, les biomarqueurs du stress oxydant sont largement employés lors d'études environnementales (McCarthy et Shugart, 1990; Pandey et al., 2003; Van der Oost et al., 2003; Amiard et Amiard Triquet, 2008; Ruas et al., 2008; Maria et al., 2009). Cette surproduction d'ERO peut intervenir dans tous les organismes capables de respiration cellulaire. Les biomarqueurs du stress oxydant peuvent donc être évalués chez de nombreuses espèces (Amiard et Amiard Triquet, 2008), mais aussi dans plusieurs organes et fluides au sein d'une même espèce, tels que le foie, le rein, le cerveau ou encore les érythrocytes (Kelly et Janz, 2009; Kumar et al., 2009; Mieiro et al., 2011). Cependant, le stress oxydant est très lié au métabolisme des organismes, et donc à leur durée de vie, ainsi qu'à leur croissance (Monaghan et al., 2009), rendant les comparaisons inter-espèces peu viables. Un exemple est donné par Aksnes et Njaa (1981), qui ont montré que l'activité de la Mn-SOD chez la truite arc-en-ciel pouvait être, sans contamination, 22 fois supérieure à celle du capelan (*Mallotus villosus*).

La peroxydation lipidique, considérée par plusieurs auteurs comme le marqueur le plus précoce du dommage oxydatif (Cossu et al., 1997; Charissou et al., 2004; Mieiro et al., 2011) est majoritairement évaluée via l'occurrence de substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) mettant en avant la formation de MDA (Janero, 1990). Ce biomarqueur peut aussi varier en fonction de l'organisme choisi puisque les espèces n'ont pas les mêmes niveaux d'acides gras polyinsaturés, victimes de la phase de propagation de la peroxydation lipidique (Hulbert et al., 2006). Plusieurs études ont montré que la peroxydation lipidique peut être considérée comme un biomarqueur utile pour évaluer la présence d'une pression extérieure exercée sur un organisme (Sayeed et al., 2003; Sanchez et al., 2007; Amiard et Amiard Triquet, 2008). Cependant, de nombreux auteurs n'ont pas trouvé de relation entre la contamination et ce biomarqueur (Pandey et al., 2003; Ferreira et al., 2008; Kelly et Janz, 2009; Mieiro et al., 2011). Ceci peut s'expliquer par le fait que tous les biomarqueurs du stress oxydant peuvent fluctuer en fonction d'un grand nombre de variables, qui sont plus difficiles à contrôler lors d'études *in situ* (Parihar et al., 1997; Morales et al., 2004; Amiard et Amiard Triquet, 2008; Sanchez et al., 2008b; Monaghan et al., 2009),

ou par certains problèmes analytiques. En effet, l'acide thiobarbiturique (TBA) peut réagir à d'autres composés que le MDA (Janero, 1990; Monaghan et al., 2009), ce qui peut masquer ou amplifier les résultats. Enfin, une limite des biomarqueurs du système antioxydant est inhérente au paradoxe des métaux essentiels. En effet, la SOD a besoin de manganèse, de zinc et de cuivre, la CAT de fer et la GPx de sélénium pour effectuer leurs rôles antioxydants (Michiels et al., 1994; Favier, 2003). Cependant, ces métaux en excès peuvent conduire à un stress oxydant (Hoffman, 2002; Falfushynska et al., 2011; Vieira et al., 2012; Farina et al., 2013; Heier et al., 2013). Il est donc difficile de conclure sur leur implication dans un déséquilibre de la balance oxydative lorsque l'un de ces métaux n'est pas l'unique contaminant de l'étude.

2.4. Autres biomarqueurs de dommage

2.4.1. Les biomarqueurs de génotoxicité

L'ADN, centre de l'information génétique, peut donc être la cible de polluants, soit directement, comme c'est le cas pour les radiations ionisantes ou certains produits chimiques, soit indirectement via la production d'ERO ou de résidus de la peroxydation lipidique (Lee et Steinert, 2003). L'ADN mitochondrial est d'autant plus touché par les ERO à cause de sa proximité avec le site de production d'ERO présent dans la membrane interne mitochondriale (Monaghan et al., 2009). Les conséquences des agents génotoxiques sont variées, en agissant sur l'ADN via l'oxydation de bases azotées, en créant des sites abasiques, des pontages ADN-protéines, des adduits, en cassant un des brins de la double hélice de l'ADN, voire même les deux brins (Michiels et al., 1994; Mitchelmore et Chipman, 1998; Favier, 2003), ou bien en agissant sur les systèmes de réparation de l'ADN (Favier, 2003). Les conséquences visibles sur l'ADN sont schématisées sur la Figure 9.

Les ERO peuvent donc directement oxyder les bases azotées, ou détruire leur liaison avec le désoxyribose, créant ainsi un site sans base, un site abasique (Favier, 2003; Lee et Steinert, 2003). Les cassures simple et double brin résultent d'un effet direct sur le désoxyribose, constituant l'hélice avec le groupement phosphate (Favier, 2003). Enfin des attaques radicalaires, suite à la peroxydation lipidique, par des aldéhydes ou des protéines entraînent

la formation d’adduits, liaison avec une molécule interférant avec l’expression des gènes, ou de pontage entre des protéines et l’ADN (Favier, 2003).

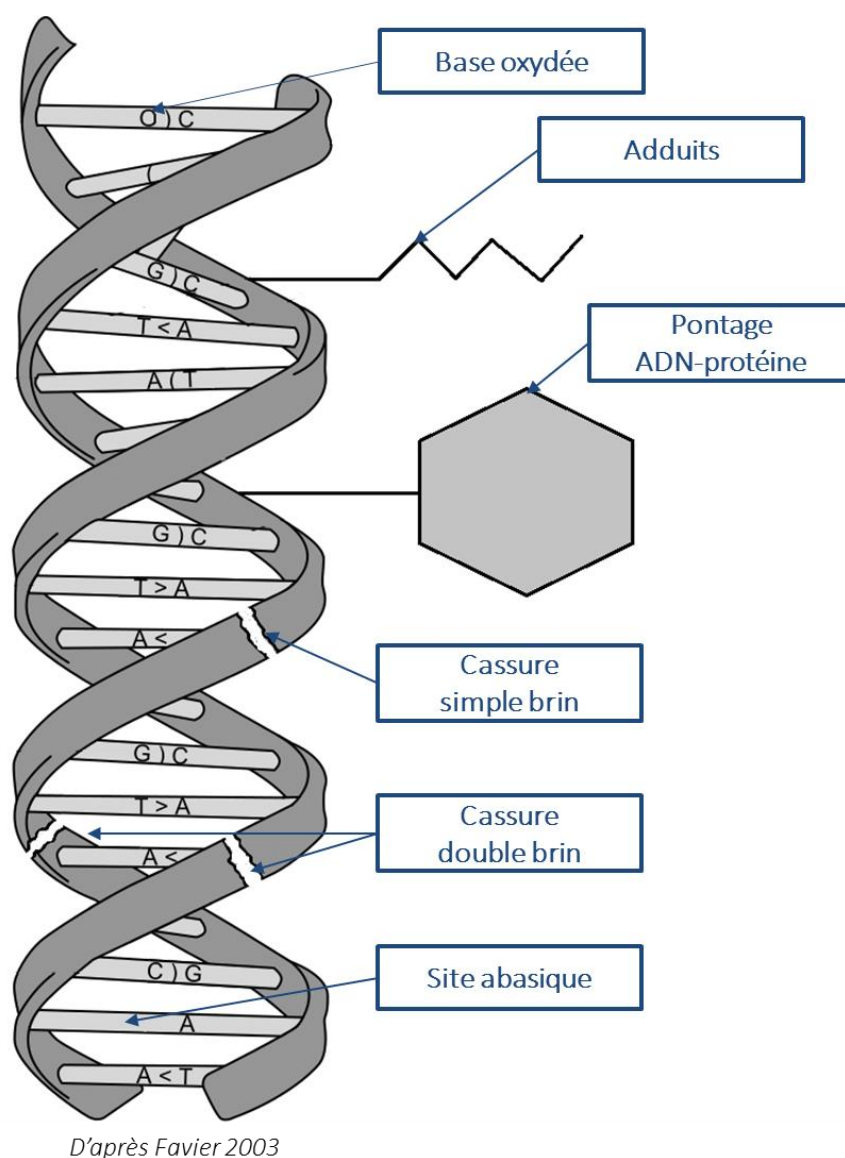


Figure 9 : Schéma récapitulatif des dommages sur la molécule d’ADN d’un polluant ou des espèces réactives de l’oxygène.

Ces lésions arrivent quotidiennement, comme le souligne Monaghan et al. (2009) avec les ERO qui sont responsables de 10 000 modifications de bases azotées par jour et par cellule (Papa et Skulachev, 1997). Mais ces dommages à l’ADN sont généralement éliminés et l’ADN réparé via plusieurs mécanismes, tels que l’excision de bases, de nucléotides ou bien la recombinaison homologue. Cependant, lorsque les dommages sont trop nombreux ou

importants, ou encore lors d'un dysfonctionnement des mécanismes de réparation, dû à des maladies génétiques ou à cause de polluants, les conséquences des dommages à l'ADN peuvent être fâcheuses. En effet, bien que la plupart n'aboutissent pas à de réelles conséquences, la réplication de l'ADN peut être altérée, et des erreurs peuvent arriver dont les mutations, ou bien une impossibilité de la lecture de l'ADN, entraînant la mort cellulaire programmée ou apoptose (Papa et Skulachev, 1997; Favier, 2003).

La pertinence de ces perturbations moléculaires pour l'écotoxicologie est notable puisque leurs conséquences peuvent se répercuter sur plusieurs niveaux d'organisation du vivant, de l'individu à la population. En effet, les lésions à l'ADN peuvent aboutir à la mort de la cellule, mais aussi à des mutations génétiques, causes de nombreuses maladies, cancers, à une baisse de la fitness de l'organisme et peuvent être héréditaires si ces mutations se trouvent au niveau des cellules germinales (Mitchelmore et Chipman, 1998; Akcha et al., 2004).

Afin de déterminer des dommages à l'ADN, les scientifiques ont accès à deux principaux tests : le test des comètes ou le test des micronoyaux. Le test des comètes indique la présence de cassures simple et double brin de l'ADN, et la version alcaline permet aussi de prendre en compte les sites abasiques (Mitchelmore et Chipman, 1998; Cotelle et Ferard, 1999). Le test des micronoyaux quant à lui évalue les dommages chromosomiques en mettant en avant la formation de fragments chromosomiques, appelés micronoyaux (Wirzinger et al., 2007). Ces marqueurs de génotoxicité ont de maintes fois montré leur réactivité à de nombreuses catégories de polluants, telles que les HAP, les métaux, les pesticides, etc. (Akcha et al., 2004; Lankoff et al., 2006; Bony et al., 2008; Marquis et al., 2009)

Sa grande sensibilité aux xénobiotiques (Devaux et al., 1998; Mitchelmore et Chipman, 1998; Wirzinger et al., 2007; Bony et al., 2008), sa rapidité d'évaluation (Bony et al., 2008) et son faible besoin de cellules isolées ont fait que le test des comètes a souvent été privilégié au test des micronoyaux lors d'études au laboratoire et sur le terrain (Devaux et al., 1998; Akcha et al., 2004; De Andrade et al., 2004; Barillet, 2007). Néanmoins, ces deux tests n'évaluent pas les mêmes pressions environnementales. Le test des comètes se focalise sur des dommages rapides, transitoires puisqu'ils peuvent être réparés, tandis que les micronoyaux ne vont apparaître qu'après la division mitotique, mais ces dommages sont irréversibles (Mitchelmore et Chipman, 1998; Wirzinger et al., 2007). L'utilisation des deux méthodes permettrait

d’obtenir des informations sur les effets génotoxiques d’une pollution à court et long terme (Wirzinger et al., 2007). Les avantages de l’évaluation des dommages à l’ADN ont conféré à ce biomarqueur une utilité lors de programme de surveillance (Sanchez et Porcher, 2009).

Malgré leur fort intérêt lors de la biosurveillance, les biomarqueurs de la génotoxicité présentent aussi quelques limites. Les niveaux de base des cassures de brins peuvent varier au sein d’une espèce, comme le prouvent les travaux de Wirzinger et al. (2007), pouvant être expliqués par certains facteurs confondants, comme le sexe, l’âge ou encore les saisons. Une autre limite inféodée au test des comètes est que cette méthode ne s’applique qu’aux cellules isolées. L’évaluation de la génotoxicité par ce test sur des organes ou tissus nécessite une étape préalable d’individualisation des cellules (Cotelle et Ferard, 1999). Par ailleurs, bien que l’évaluation des comètes soit aidée par des logiciels, de nombreux paramètres peuvent être mesurés (pourcentage d’ADN dans la tête de la comète, la migration de la queue de la comète, son intensité, etc.) et aucune harmonisation sur le choix d’un ou plusieurs de ces paramètres n’est encore effectuée (Cotelle et Ferard, 1999).

2.4.2. L’intégrité de la membrane lysosomale

Les effets toxiques d’une pollution sur le système immunitaire peuvent être évalués au niveau d’un organite intracellulaire, le lysosome. Ses rôles sont très nombreux et variés comme le souligne Holtzman (2013). Il va notamment permettre la séquestration et la destruction de particules étrangères. La membrane lipoprotéique de cet organite peut être déstabilisée par de nombreux facteurs biotiques ou abiotiques (Pellerin-Massicotte et Tremblay, 1998; Regoli et al., 1998; Moore et al., 2004; Gagnaire et al., 2006), agissant directement sur la membrane via notamment des radicaux libres, ou en perturbant l’homéostasie du calcium pouvant conduire à une perméabilisation de cette membrane (Mukherjee et al., 1997; Marchi et al., 2004; Viarengo et al., 2007). Les conséquences d’une forte déstabilisation de la membrane lysosomale peuvent être dangereuses pour la cellule, pouvant mener à l’apoptose ou la nécrose de la cellule (Cooley et al., 2000; Johansson et al., 2010). De plus, une perturbation des lysosomes peut entraîner une diminution de la capacité phagocytaire (Grundy et al., 1996; Auffret et al., 2006)

Ce biomarqueur a pour avantage d’être très sensible à la contamination (Pellerin-Massicotte et Tremblay, 1998). En outre, son utilisation est préconisée lors d’études de surveillance environnementales, comme le souligne fortement Viarengo et al. (2007).

Bien que ce biomarqueur réagit à de nombreux polluants d’origine diverse, il varie aussi en fonction d’autres facteurs abiotiques et biotiques (Amiard et Amiard Triquet, 2008), pouvant masquer ou accentuer les effets d’une pollution. Une autre limite à l’utilisation de ce biomarqueur est particulière aux poissons. Encore peu d’études, et notamment *in situ*, évaluent ce biomarqueur au niveau de cellules immunitaires chez ce taxon (Bado-Nilles et al., 2013), rendant donc difficiles les comparaisons entre les études.

2.4.3. Biomarqueurs de mort cellulaire

La mort cellulaire programmée, ou apoptose, est un processus physiologique irréversible qui contrebalance la division cellulaire (Kerr et al., 1972; Bonga et van der Meij, 1989; Piechotta et al., 1999), et dont le but principal est de détruire les cellules, notamment les cellules endommagées, en surplus ou infectées par un virus ou tumorales. En conditions normales, la balance entre division cellulaire et apoptose est à l’équilibre, contribuant au bon renouvellement cellulaire. Cependant, cet équilibre peut être perturbé par plusieurs stress (Piechotta et al., 1999; Hoole et al., 2003). En plus d’éliminer les cellules, ce mécanisme a d’autres rôles, comme la modulation de l’inflammation ou de l’homéostasie tissulaire (Kerr et al., 1972; Hoole et al., 2003).

Le processus de mort cellulaire programmée est complexe et fait intervenir un nombre important de gènes (Hoole et al., 2003). Ce mécanisme induit dans un premier temps un éloignement de la cellule endommagée en début d’apoptose des autres cellules saines, puis une diminution du volume cellulaire, la condensation du noyau et du cytoplasme ainsi qu’à une perturbation du cytosquelette (Kerr et al., 1972; Hoole et al., 2003). En même temps, des endonucléases sont induites et vont fragmenter l’ADN en oligonucléosomes (Kerr et al., 1972; Piechotta et al., 1999). Le cytochrome c activé par les mitochondries va induire la formation de caspases, qui vont ensuite cliver les protéines. Puis, des renflements à la surface de la membrane cellulaire se forment, ce qui va conduire à la fragmentation cellulaire en corps apoptotiques (Kerr et al., 1972; Hoole et al., 2003). Ces corps apoptotiques pourront ensuite être phagocytés sans l’apparition du phénomène d’inflammation (Kerr et al., 1972).

La mort cellulaire programmée peut donc être induite normalement par des stimuli physiologiques tels que des dommages génétiques, des signaux extracellulaires (attachement de ligands sur des récepteurs particuliers, comme le récepteur Fas du facteur de nécrose tumorale, TNF) ou une carence en cytokines (Hoole et al., 2003). Cependant, il se peut que l’apoptose soit initiée par d’autres facteurs externes, comme des polluants chimiques ou des parasites (Piechotta et al., 1999; Berntssen et al., 2001; Hoole et al., 2003). Plusieurs études chez le poisson ont rapporté la mise en place de l’apoptose suite à l’exposition à divers métaux (Piechotta et al., 1999; Xiang et al., 2000). Ces différents stress peuvent agir directement sur l’apoptose, ou bien indirectement via le cortisol, les métallothionéines ou encore les ERO (Papa et Skulachev, 1997; Favier, 2003; Hoole et al., 2003; Rana, 2008). Rana (2008) a listé les métaux capables d’induire une mort cellulaire programmée en détaillant les mécanismes sous-jacents. Cette mort peut être évaluée dans tous les organismes multicellulaires, et sur différentes cellules, dont celles du système nerveux ou immunitaire (Rana, 2008; Bado-Nilles et al., 2014a). De nombreux liens entre la stimulation et l’inhibition de l’apoptose par des polluants et des conséquences physiopathologiques ont été observés, tels que les maladies autoimmunes, l’immunodépression, la neurodégénérescence, etc. (Rana, 2008).

L’évaluation de ce biomarqueur ne fournit pas que des dommages liés à la pollution. En effet, en présence d’un stress oxydant, et lorsque les défenses antioxydantes sont inefficaces face aux ERO, l’apoptose peut alors jouer un rôle d’antioxydant, en détruisant les cellules accumulatrices de peroxydes (Papa et Skulachev, 1997).

Néanmoins, ce biomarqueur n’est utile que s’il est analysé en parallèle avec une autre mort cellulaire, la nécrose. Ces deux morts cellulaires sont liées, et peuvent apparaître différemment en fonction de la nature et du degré de la contamination exercée sur un organisme.

La nécrose, à l’inverse de l’apoptose, intervient comme réaction pathologique et non physiologique suite à des dommages chimiques, physiques ou osmotiques, tels que l’hypoxie, l’hypothermie et donc l’exposition à de fortes doses toxiques de polluants (Buja et al., 1993; Lemasters et al., 1998; Baba, 2009). La nécrose est caractérisée par un dérèglement métabolique, une perte d’adénosine triphosphate (ATP) augmentant la concentration en

calcium, puis un gonflement du cytoplasme et des mitochondries conduisant à la rupture de la membrane plasmique apparaît (Hong et al., 1998; Lemasters et al., 1998; Baba, 2009). Ce phénomène s’accompagne de l’activation d’enzymes de dégradation, qui accélèrent la lyse des cellules voisines et activent l’inflammation du tissu lorsqu’elles sont déversées dans le milieu extracellulaire après la lyse des membranes (Buja et al., 1993; Baba, 2009). Contrairement à l’apoptose qui ne concerne que des cellules isolées, la nécrose touche plusieurs cellules voisines au niveau du dommage ou de l’infection (Baba, 2009).

Comme l’apoptose, la nécrose n’est pas spécifique d’un type de contaminant, mais son niveau peut être corrélé avec le degré et la durée de cette contamination (Eastman, 1993; El Azzouzi et al., 1994; Julliard et al., 1996; Cooley et al., 2000). Elle ne témoigne que des dommages et n’aide pas l’organisme à se défendre, contrairement à l’apoptose, capable de protéger l’organisme de cellules néfastes (Lemasters et al., 1998; Favier, 2003).

2.5. Les métallothionéines

Lors d’une pollution, et notamment une pollution d’origine métallique, une autre classe de biomarqueurs peut être évaluée, les métallothionéines (Baudrimont et al., 2003; Filipović et Raspor, 2003; Amiard et al., 2006). Du fait de sa forte teneur en cystéines, et donc en groupement thiol (-SH), une métallothionéine peut se lier à un ou plusieurs ions métalliques (Pelletier et al., 2004; Amiard et al., 2006), et notamment le mercure, le cuivre, le zinc, le cadmium et l’argent (Engel et Brouwer, 1989; Roesijadi, 1996). Ces protéines ont plusieurs rôles en lien avec les métaux. Les métallothionéines participent à l’homéostasie des ions métalliques essentiels à l’organisme en stockant ces métaux (cuivre et zinc) lorsqu’ils se trouvent en excès, ou en les libérant si besoin (Baudrimont et al., 1997; Amiard et al., 2006). Elles peuvent aussi stocker certains éléments traces métalliques, toxiques, et ainsi réduire leur toxicité (Baudrimont et al., 2003; Pelletier et al., 2004; Amiard et al., 2006). Enfin, elles sont également utiles pour la protection envers les radiations ionisantes (Cai et al., 1999) et contre le stress oxydatif, indirectement en stockant les métaux, ou directement en récupérant le peroxyde d’hydrogène ou l’anion superoxyde (Amiard et al., 2006).

Ces protéines cytosoliques de faible poids moléculaire sont hautement conservées durant l’évolution, soulignant l’importance de leurs rôles (Dos Santos Carvalho et al., 2004; Pelletier

et al., 2004; Amiard et al., 2006). Bien que ces rôles soient dépendants de l'organisme étudié (espèce, âge, sexe, etc.) (Olsson, 1996; De Boeck et al., 2003), les métallothionéines constituent un biomarqueur très fréquemment utilisé lors de l'évaluation des effets d'une contamination métallique au laboratoire (Filipović et Raspor, 2003; Zhang et Wang, 2005; Atli et Canli, 2008; Company et al., 2010), ou sur le terrain (Roch et al., 1982; Olsvik et al., 2000; Linde-Arias et al., 2008; Maria et al., 2009). Elles sont d'ailleurs utilisées lors de programme de surveillance environnementale (Sanchez et Porcher, 2009), et considérées comme de bons candidats comme biomarqueurs lors de l'ERE (Olsson, 1996; Van der Oost et al., 2003). Il se doit d'être noté que tous les métaux ne vont pas être liés aux métallothionéines de manière égale, et que certains ions métalliques ont une capacité plus importante que d'autres à se lier aux groupements thiols des métallothionéines, tels que le cadmium ou le mercure (Roesijadi, 1996; Baudrimont et al., 1997). En dernier lieu, d'autres facteurs qu'une exposition métallique peuvent les induire, tels que l'infection, la saison, le jeûne, le stress en général, les conditions environnementales et d'autres polluants chimiques (Baudrimont et al., 1997; Pelletier et al., 2004; Baykan et al., 2007).

2.6. Les biomarqueurs de neurotoxicité

Certains polluants peuvent impacter le comportement des organismes, aboutissant à de fâcheuses répercussions sur l'organisme (Grue et al., 2002; Scott et Sloman, 2004), mais aussi sur la population, en impactant par exemple la reproduction (Jones et Reynolds, 1997). Une cause de cette perturbation comportementale est l'impact neurotoxique de certains polluants, et notamment sur les cholinestérases (Bocquené et al., 1997; Zarros et al., 2013). Ici, nous nous intéresserons spécialement à l'une d'entre elles, l'acétylcholinestérase (AChE). Son mécanisme d'action se présente ainsi : l'acétylcholine (ACh) est un neurotransmetteur qui véhicule l'information nerveuse entre neurones ou entre un motoneurone et un muscle squelettique (Bocquené et al., 1997; Sturm et al., 2000). Son action se déroule au niveau des jonctions neuromusculaires ou interneuronales, la synapse. Lorsqu'un potentiel d'action arrive au niveau d'une synapse, des canaux calciques s'activent, permettant la fusion des vésicules possédant l'ACh avec la membrane plasmique. L'ACh est donc libérée dans la fente synaptique et va pouvoir s'accrocher à des récepteurs présents sur l'autre neurone, les récepteurs cholinergiques (muscarinique et nicotinique). Ceci va donc aboutir à la

propagation de l'influx nerveux après dépolarisation de la membrane post-synaptique, pour la contraction des muscles squelettiques, l'excitation ou l'inhibition de certaines fonctions biologiques (Bocquené et al., 1997). Le rôle de l'AChE est d'hydrolyser l'ACh en choline et acide acétique, inactivant les récepteurs cholinergiques et permettant au système cholinergique de se mettre au repos (Bocquené et al., 1997; Sturm et al., 2000). Si l'AChE est inhibée par une contamination, l'ACh se trouvera en quantité trop importante dans la fente synaptique, maintenant l'activité permanente du système cholinergique. Ceci peut entraîner un dysfonctionnement irréversible de la synapse, qui ne pourra plus transmettre l'information nerveuse (Bocquené et al., 1997).

De nombreux types de contaminants peuvent impacter le rôle de l'AChE. Olson et Christensen (1980) ont testé l'effet *in vitro* de plus de 70 substances sur l'activité de l'AChE d'un poisson (*Pimephalus promelas*, le tête de boule). Quarante-huit de ces substances peuvent induire une inhibition de 50 % de l'activité de cette enzyme, dont des carbamates, des composés organo-phosphorés et des métaux. Ces substances peuvent impacter la transmission nerveuse de plusieurs manières, dépendantes du contaminant. Les polluants peuvent donc s'accrocher aux récepteurs cholinergiques tout en étant indifférents à l'action de l'AChE, cliver le site estérasique de l'AChE, fermer les canaux ioniques indispensables à la dépolarisation, ou modifier la structure de l'AChE (Coppage et al., 1975; Bocquené et al., 1997). Ce biomarqueur a de nombreuses fois souligné son utilité lors d'études écotoxicologiques chez le poisson, et notamment lors de programme de surveillance (Coppage et al., 1975; Shaw et Panigrahi, 1990; Payne et al., 1996; Sturm et al., 1999; Sturm et al., 2000; Sanchez et Porcher, 2009; Oliva et al., 2012b). Ce biomarqueur présente l'avantage que sa forte perturbation peut aboutir à des conséquences très négatives sur le comportement du poisson, pouvant entraver leur nage, leur interaction sociale, leur survie et donc avoir des répercussions sur des niveaux d'organisation supra-individuels (Coppage et al., 1975; Fulton et Key, 2001; Scott et Sloman, 2004; Amiard et Amiard Triquet, 2008). Fulton et Key (2001) ont souligné un autre avantage de l'utilisation de ce biomarqueur. Le retour à des niveaux de base de l'activité de l'AChE après une inhibition est long, et peut donc indiquer une exposition aiguë à un polluant. Cependant, ces niveaux de base varient grandement d'un individu à un autre, rendant délicate la détermination d'un seuil de base pour ce

biomarqueur. Une variation inter-individuelle de 25 % de l'activité de base de l'AChE a été rapportée par Sturm et al. (1999) chez l'épinoche à trois épines. Comparée à d'autres biomarqueurs, l'activité de l'AChE varie peu selon la température, ou alors pour de grandes variations de ce paramètre (Sturm et al., 1999; Beauvais et al., 2002). En plus de fluctuer en fonction de l'espèce et de l'organe étudiés (Fulton et Key, 2001; Amiard et Amiard Triquet, 2008), ce marqueur de neurotoxicité est fonction de l'âge (et donc de la taille) des poissons (Shaw et Panigrahi, 1990; Sturm et al., 1999; Beauvais et al., 2002). Il est donc important de calibrer la taille des poissons avant toute étude écotoxicologique utilisant ce biomarqueur. A cause de ces variations, Van der Oost et al. (2003) préconisent d'approfondir les recherches sur ce biomarqueur avant de pouvoir l'utiliser lors de programmes d'évaluation du risque environnemental. Une dernière limite quant à l'utilisation de ce biomarqueur est liée à sa mesure dans le muscle des poissons. Bien que ce tissu contienne principalement de l'AChE, il présente aussi une autre enzyme, la butyrylcholinestérase (BChE), mesurable par la même méthode que l'AChE (Ellman et al., 1961), et qui peut accentuer les effets d'une exposition à des polluants (Fulton et Key, 2001).

2.7. Les indices morphométriques

Ces indices sont, pour la plupart du temps, des données biométriques permettant d'obtenir des données sur le bien-être, la croissance et le cycle de développement des organismes. Ces indices sont fiables, mais ne sont pas précoces par rapport à d'autres biomarqueurs, comme par exemple les marqueurs biochimiques. Cependant, ils peuvent traduire physiologiquement les altérations biochimiques, et doivent donc être associés à ces mesures biochimiques au niveau tissulaire, cellulaire ou moléculaire (Amara et al., 2007). De surcroît, ces indices peuvent être très rapidement mesurés, et certains d'entre eux ne sont pas invasifs, comme par exemple l'indice de condition de Fulton qui évalue l'embonpoint des poissons (Van der Oost et al., 2003). Ces derniers permettent de sacrifier moins d'individus à des fins scientifiques et l'évaluation temporelle sur les mêmes individus. Ici, deux indices de condition sont évalués : l'indice de condition de Fulton (Fulton, 1902), ainsi que l'indice hépatosomatique (HSI), possible indicateur de qualité environnementale (Slooff et al., 1983).

3. Les stratégies de réponse au stress

Lorsqu'un nouveau stress se manifeste dans l'habitat des poissons (apparition d'un polluant ou d'un pathogène, ou changement d'une variable écologique), et entre en contact avec l'organisme, sans qu'il puisse y échapper (évitement, barrières physiques telles que la peau ou le mucus), l'individu peut donc subir les effets et/ou y faire face. Plusieurs stratégies existent pour faire face à la pollution, telles que la résistance et la tolérance.

Lorsqu'un organisme est soumis à un stress et qu'il ne peut pas l'éviter, il peut mettre en place des mécanismes pour ne pas rester en contact avec l'origine du stress, et réduire les dommages causés par ce stress (Forbes et Forbes, 1997; Horns et Hood, 2012). L'organisme est alors **résistant** envers ce stress. Cette résistance implique la dépense d'énergie de l'organisme, qui ne sera pas utilisée pour un autre processus, tel que la reproduction, et qui peut aussi être néfaste si la pression du stress perdure. Si la durée du stress est longue, l'organisme peut devenir **tolérant** au stress. Cette stratégie met souvent en place des changements génétiques adaptatifs pour le maintien d'une population entière dans l'écosystème dans lequel agit le stress. Bien que cette stratégie va permettre à la population de vivre dans cet écosystème, la tolérance est souvent coûteuse, et va réduire la diversité génétique (Amiard et Amiard Triquet, 2008). En effet, tous les organismes ont intérêt à avoir les modifications génétiques permettant de vivre dans le milieu stressant. Cette homozygotie peut devenir un inconvénient si un nouveau stress arrive dans le milieu de vie de ces organismes (Amiard et Amiard Triquet, 2008).

Ces deux éléments sont liés, et assez souvent confondus, comme nous le prouvent les définitions de Forbes et Forbes (1997), de Hubert-Vincent (2007) d'Amiard et Amiard Triquet (2008) et celles de Markert et al. (2010). En effet, certains travaux relient la tolérance à une adaptation génétique, comme elle a été définie plus haut (Forbes et Forbes, 1997; Amiard et Amiard Triquet, 2008), tandis que d'autres études la relient à une acclimatation sans modification génétique (Hubert-Vincent, 2007; Markert et al., 2010). Aussi, pendant que des auteurs assimilent la tolérance à une forme de résistance (Hubert-Vincent, 2007), d'autres séparent distinctement ces deux termes (Markert et al., 2010).

Afin d'éviter quelques confusions, pour la suite de ce manuscrit, nous parlerons préférentiellement d'acclimatation, de plasticité phénotypique et d'adaptation.

Lorsqu'un organisme est exposé à une pollution, il est **stressé** et peut mettre en place des réponses pour faire face à celle-ci. Il y devient alors résistant. Cependant, cette stratégie ne peut perdurer dans le temps si la pollution persiste. L'individu succombera, à cause des effets de la pollution, ou à cause des coûts de la résistance qui auront été trop élevés. Si l'organisme peut vivre « **normalement** » avec cette pression (c-à-d présentant les mêmes caractéristiques physiologiques, métaboliques, comportementales que la moyenne de ces caractéristiques observées dans un groupe d'organismes non-soumis à cette pression ; définition modifiée de Chassagnard-Pinet (2011)), il y devient tolérant. Ainsi l'organisme s'est adapté à la pollution.

Lors d'un nouveau stress, des modifications métaboliques, physiologiques, anatomiques sont mises en place par l'organisme pour maintenir leurs conditions internes face au changement du milieu ambiant (Mbakwiravyo, 2009; Ramade, 2009). Ces changements au niveau individuel sont rapides et réversibles et sont considérés comme les capacités d'**acclimatation** des organismes envers un stress (Hubert-Vincent, 2007). Les organismes sont donc résistants au stress. L'acclimatation peut aussi être nommée adaptation physiologique. Un exemple d'acclimatation, parmi d'autres, est la surproduction de métallothionéines suite à une exposition métallique.

Lorsque l'on parle d'**adaptation**, ou plus particulièrement d'adaptation génétique, c'est que l'organisme a mis en place des changements génétiques pour faire face aux changements de son habitat (Ramade, 2009). Ces changements génétiques sont donc bien plus longs à mettre en place que l'acclimatation, sont irréversibles, et peuvent même être héréditaires (Mbakwiravyo, 2009). Les changements de l'habitat doivent être permanents, ou au moins d'une période longue pour pouvoir observer des changements dans le matériel génétique des organismes. Lorsque ces changements génétiques permettent à un organisme de vivre dans les nouvelles conditions de son habitat, ces individus sont sélectionnés pour former la nouvelle population et ces modifications sont conservées au cours des générations (Hubert-Vincent, 2007). Meyer et Di Giulio (2003) ont montré que la descendance de choquemort (*Fundulus heteroclitus*) était adaptée à une contamination lorsque la première génération avait été exposée à la même contamination.

Enfin, l’organisme peut aussi s’accommoder à une pression extérieure. Ce processus peut aussi être défini comme de l’adaptation phénotypique ou encore de la **plasticité phénotypique**, bien qu’il n’implique pas de modifications génétiques (Mbakwiravyo, 2009; Ramade, 2009). En fonction de l’habitat et des pressions s’y exerçant, le génotype peut produire différents phénotypes permettant de vivre avec ces pressions. L’accommodation s’accompagne toujours d’un rétablissement du phénotype normal lorsque les pressions extérieures s’estompent. Un exemple d’accommodation chez la truite mouchetée (*Salvelinus fontinalis*) a été observé par Imre et al. (2002). La moitié des truites juvéniles ont été exposées à un courant fort, et l’autre moitié à un courant faible. Après deux semaines d’exposition, les poissons soumis au plus fort courant ont présenté de plus grandes nageoires caudales que leurs congénères soumis au faible courant pour pouvoir nager plus facilement. L’accommodation est cependant majoritairement observée chez les végétaux et rarement lors de l’apparition d’une pollution.

4. Les mines d'uranium en France

4.1. L'extraction de l'uranium en France

L'uranium est un actinide présent sous trois isotopes à l'état naturel, l'uranium 234, 235 et 238. Ce dernier représente plus de 99 % de l'uranium naturel présent sur Terre. Pour son utilisation comme combustible nucléaire, son extraction des sols français a débuté le lendemain de la Seconde Guerre Mondiale pour se terminer en 2001 (IRSN, 2009). L'exploitation s'est concentrée sur 25 départements, représentant 210 sites, majoritairement localisés dans cinq régions (le Limousin, l'Auvergne, les Pays de la Loire, la Bretagne et le Languedoc-Roussillon) (IRSN, 2007b). Le département de la Haute-Vienne (Limousin) détient à lui seul environ le quart des anciens sites miniers de France. La Figure 10 localise les anciens sites miniers uranifères de France.

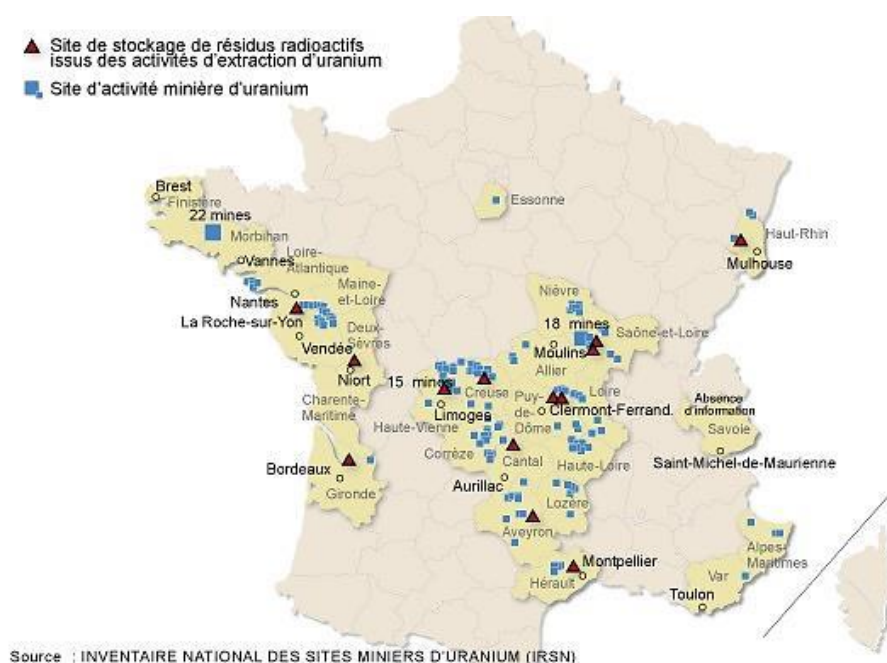


Figure 10 : Carte de France localisant les anciens sites miniers uranifères. Les carrés bleus représentent les sites d'extraction de l'uranium et les triangles rouges les lieux de stockage des résidus de traitement d'uranium. Source : IRSN.

Lors de l'extraction de l'uranium, les mineurs charriaient de grandes quantités de roches. La radioactivité de ces roches était évaluée sur place. Lorsque la radioactivité était jugée trop faible, ces roches étaient regroupées et constituaient des stériles. Les stériles miniers peuvent être définis comme l'ensemble des roches excavées pour accéder au minerai d'uranium. On distingue deux types de stériles : les stériles « francs », constituant les roches pauvres en uranium qui entourent l'exploitation et les stériles « de sélectivité » extraits directement de la mine (IRSN, 2009). Ces derniers pouvaient contenir plus d'uranium que les stériles « francs », allant même jusqu'à plusieurs centaines de g/t (la concentration maximale d'uranium dans les stériles « francs » étant fixée à 100 g/t). Inversement, des roches avec une radioactivité jugée suffisante étaient acheminées à l'usine de traitement la plus proche, pouvant se situer sur le site d'extraction, et constituaient donc du minerai d'uranium (IRSN, 2009). Afin de récupérer l'uranium (le « yellow cake »), ces roches étaient traitées physiquement et chimiquement, et les déchets produits étaient appelés résidus. Ces déchets étaient donc pauvres en uranium, mais présentaient une radioactivité assez importante puisque les produits de dégradation de l'uranium, dont le radium 226 se situaient encore à l'intérieur de ces résidus. Le « yellow cake » pouvait ensuite être véhiculé dans des raffineries pour y être purifié (IRSN, 2009).

L'exploitation de l'uranium en France ne fut pas rentable, à cause du faible rendement des gisements. En effet, pour une tonne de roche extraite, seulement un kilogramme pouvait être utilisé pour la combustion nucléaire. Ce faible rendement, ainsi que l'épuisement des plus grandes mines d'uranium de France, expliquent en grande partie la fin de l'activité minière uranifère française dès 2001. Au total, $7,3 \cdot 10^5$ t d'uranium ont été produites en France de 1945 à 2001, à partir de $5,2 \cdot 10^7$ t de minerais, avec autant de résidus, et entraînant l'extraction de plus de $2,0 \cdot 10^8$ t de stériles (IRSN, 2007b).

Depuis que les sites miniers français ont cessé leur activité, les gestionnaires des mines ont pour obligation réglementaire de les réhabiliter. Pour cela, plusieurs missions leur ont été confiées. Ils doivent sécuriser ces sites pour le public, les réaménager pour les intégrer dans le paysage, ainsi que surveiller et réduire si nécessaire leurs impacts chimiques et radiologiques.

4.2. Problème environnemental lié à ces anciens sites miniers

Bien que l'uranium et ses descendants soient des composés naturels, les activités minières ont été à l'origine d'une modification de l'état physique, chimique et radiologique de l'environnement naturel.

A la suite du tri « grossier » des roches selon leur radioactivité, des minerais d'uranium pouvaient être mélangés aux stériles, les rendant plus concentrés en uranium. De plus, lors de la baisse du cours de l'uranium dans les années 90, le seuil de coupure entre stériles et minerais a été relevé de 100 à 400 g/t, ce qui a aussi augmenté les concentrations uranifères dans ces déchets (IRSN, 2009). Ces stériles ont ensuite été laissés sur place et mis en tas, communément nommés verses, ou bien utilisés pour remblayer les anciennes mines d'uranium. En plus des mines, des lieux de stockage de résidus de traitement pouvaient se trouver au niveau des anciens sites miniers. Les résidus pouvaient être seulement stockés sur le site ou servir à remblayer une partie des mines à ciel ouvert (IRSN, 2009). Pour cette dernière condition, les résidus ont ensuite été recouverts de stériles et de végétation. De surcroît, certains sites miniers abritent une usine de traitement des minerais d'uranium que les gestionnaires des mines doivent démanteler. Toutes ces sources possibles d'uranium contribuent donc à la contamination uranifère des écosystèmes avoisinants les anciens sites miniers. Lors du réaménagement des anciens sites uranifères, les mines à ciel ouvert ainsi que les galeries souterraines ont été soit noyées, soit remblayées ou les deux. Cet ajout d'eau a entraîné une modification chimique de l'uranium présent au contact des sédiments et de l'eau ; et cet actinide s'est donc concentré dans le compartiment aquatique. Les mines d'uranium se trouvant généralement en altitude, les phénomènes d'érosion, de ruissellement ou de rejet ont donc conduit à augmenter les concentrations en uranium dans les milieux aquatiques proches.

Afin de traiter l'uranium et ses descendants au niveau des mines noyées, les gestionnaires des mines ont ajouté du chlorure de baryum et du sulfate d'alumine (IRSN, 2007a; Herlory et al., 2013; Hudcova et al., 2013). Ces deux composés peuvent co-précipiter l'uranium et le radium, qui peuvent être ensuite récupérés avec des filtres. L'aluminium et le baryum qui en ressortent envahissent donc les cours et plans d'eau en aval, le milieu aquatique étant le dernier refuge des métaux (Fleeger et al., 2003).

Enfin les activités minières peuvent transférer des métaux naturellement présents dans les roches minières au niveau des eaux de mines ; ces métaux seront ensuite présents dans les rejets miniers (GEP, 2010). Dans le Limousin et en Auvergne, ces eaux de mines vont donc se charger en fer et en manganèse, ce dernier métal étant souvent lié aux minerais de fer (GEP, 2010). Ces deux métaux peuvent aussi faire l’objet d’un traitement au niveau des anciennes mines d’uranium via leur oxydation (Herlory et al., 2013; Hudcova et al., 2013).

La contamination polymétallique retrouvée au niveau des anciens sites miniers français se constitue donc de cinq métaux majoritaires, l’uranium, l’aluminium, le baryum, le fer et le manganèse. Ce mélange de métaux constitue donc le stress chimique utilisé lors des études *in situ* présentées dans ce travail.

5. Le stress chimique métallique et le stress biologique

5.1. Le stress chimique lié aux métaux

Les métaux, ou plutôt les éléments trace métalliques, représentent environ les trois quarts des éléments du tableau périodique. Bien qu'une partie des métaux se retrouve piégée dans un compartiment précis (exemple : la croûte terrestre), les activités anthropiques (extraction de minerais, combustion d'énergies fossiles, industries métalliques) ont modifié les concentrations en métaux dans l'atmosphère, le sol et l'eau, pouvant les rendre biodisponibles et bioaccumulables pour les êtres vivants (Chezhian et al., 2012; Sigg et al., 2014).

Plusieurs catégories chimiques d'éléments trace existent, les métaux vrais (les alcalins et les alcalino-terreux), les métaux de transition et les éléments métalloïdes, bien que ces derniers ne soient considérés ni métaux, ni non-métaux (Alloway, 2013). En écotoxicologie, les métaux essentiels au vivant se distinguent des métaux non-essentiels. La première catégorie, ou oligoéléments métalliques, est constituée du cuivre, du zinc, du cobalt, du fer, du manganèse, du nickel, du chrome, du vanadium, du molybdène, du sélénium et de l'étain. Ils sont indispensables pour le vivant, mais seulement en petites quantités. Absorbés en grandes quantités, les métaux essentiels peuvent devenir toxiques pour les organismes (Goyer et Clarkson, 1996; Sigg et al., 2014). Les métaux non-essentiels sont quant à eux beaucoup plus nombreux, et peuvent être toxiques même à faible concentration.

La dangerosité des métaux vient du fait qu'ils peuvent être accumulables par les organismes, être toxiques en fonction de leurs concentrations, et qu'ils sont bioamplifiés le long de la chaîne trophique (Goyer et Clarkson, 1996; Chezhian et al., 2012). Cependant, leur bioaccumulation par les organismes dépend de nombreux facteurs, dont la nature de ces métaux, leur spéciation (différentes formes chimiques du métal pouvant être ou non bioaccumulables et/ou toxiques), des facteurs abiotiques (température, pH, dureté de l'eau, etc.), certains facteurs biotiques, l'espèce impactée ou encore la présence d'autres métaux (Sindayigaya et al., 1994; Goyer et Clarkson, 1996; Ribeiro et al., 2005; Saglam et al., 2013). En

plus de ces éléments, le fait que les métaux soient d’origine naturelle (pour la plupart) complique l’interprétation des résultats. En effet, de par leur présence naturelle dans les écosystèmes, les organismes sont déjà pré-exposés à de faibles concentrations métalliques qui constituent un bruit de fond (European-Commission, 2003).

Dans ce manuscrit, le stress chimique appliqué sur les épinoches était lié aux rejets d’anciennes mines d’uranium françaises. Comme précédemment décrit, la contamination polymétallique liée aux rejets miniers en Auvergne et au Limousin se constituait de l’uranium, de l’aluminium, du fer, du manganèse, et du baryum. En ajoutant le radium, ces six métaux sont très fréquemment recherchés lors d’ERE liée aux rejets miniers uranifères français (Areva, 2004). Les prochains paragraphes s’attardent donc à la description succincte de ces cinq métaux.

5.1.1. L’uranium

L’uranium ($Z = 92$) est un métal radioactif qui appartient à la famille des actinides. Il est naturellement présent sur Terre sous trois isotopes (contre 14 isotopes de synthèse), l’uranium 234, 235 et 238. L’uranium est présent dans les sols, l’eau ou l’air sous quatre états de valence ($U^{3+} / U^{4+} / UO^{2+} / UO_2^{2+}$) (Ribera et al., 1996; Garnier–Laplace et al., 2001). Du fait de son rôle dans l’industrie civile nucléaire et son utilité militaire, son extraction de la croûte terrestre a considérablement perturbé sa répartition dans ces compartiments.

La toxicité de l’uranium a longuement été étudiée, aussi bien sur l’homme que les autres mammifères sans oublier les poissons et les invertébrés. Bien qu’il soit radioactif, sa radiotoxicité est négligeable par rapport à sa chimiotoxicité (Goyer et Clarkson, 1996; Mathews et al., 2009). Comme le baryum, Goyer et Clarkson (1996) l’ont classé parmi les métaux ayant une faible toxicité. Néanmoins, de nombreuses études ont montré que l’uranium était un néphrotoxique (Cooley et al., 2000; Sheppard et al., 2005), mais aussi qu’il pouvait agir, en fonction de sa spéciation et de sa concentration, sur un grand nombre de fonctions et structures, aussi bien sur les vertébrés supérieurs que sur les poissons (Cf. Tableau 2).

5.1.2. L’aluminium

L’aluminium ($Z = 13$) est le métal le plus abondant sur Terre, et un des plus utilisé dans l’industrie automobile, aéronautique, mais aussi dans le bâtiment, ou utilisé comme additif, colorant alimentaire et même dans les cosmétiques. Il est produit à partir de minerais (surtout à partir de la bauxite) pour environ 30 millions de tonnes par an.

Sa toxicité est très liée à sa solubilité, elle-même très dépendante du pH (Goyer et Clarkson, 1996). En effet, sa solubilité via la formation d’ions aluminium est élevée lorsque le pH descend en-dessous de 6, où sa forme chimique la plus toxique est l’hydroxyde d’aluminium (Poléo, 1995). Les principales fonctions et structures cibles chez les poissons de la toxicité de l’aluminium sont les branchies (Flaten et al., 1993; Poléo, 1995), mais aussi les systèmes nerveux et immunitaire (Elsasser et al., 1986; Goyer et Clarkson, 1996) (Cf. Tableau 2).

5.1.3. Le baryum

Le baryum ($Z = 56$) est un métal alcalino-terreux, relativement abondant sur Terre. Ce métal est utilisé en industrie, en radiologie et aussi dans les pesticides (Goyer et Clarkson, 1996).

Comme l’uranium, le baryum est classé parmi les métaux possédant une faible toxicité (Goyer et Clarkson, 1996), ce qui peut expliquer la rareté d’études toxicologiques chez le poisson exposé seulement avec du baryum. Une des seules études sur l’exposition au baryum chez le poisson, réalisée par Payne et al. (2011), a conclu qu’il n’avait pas d’effet sur la structure de plusieurs tissus, sur les indices de condition ou sur l’induction du cytochrome P450 via l’activité de l’enzyme éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) chez la perche de mer (*Tautoglabrus adspersus*). Cependant, des études de toxicité sur l’homme et les autres mammifères ont été réalisées, montrant que le baryum se déposait principalement sur les os, et qu’il pouvait être neurotoxique, néphrotoxique et néfaste pour le système cardiovasculaire (Goyer et Clarkson, 1996; Purdey, 2004; Nordberg et al., 2014).

5.1.4. Le fer

Le fer ($Z = 26$) est très abondant sur Terre (6^{ème} rang). En industrie, il est principalement utilisé en sidérurgie, mais aussi en pharmacie. Du fait de son importance pour les organismes (élément essentiel), il se retrouve dans de nombreux aliments.

Les effets du fer, ainsi que du manganèse sont particuliers car il s’agit de métaux essentiels. Ils peuvent néanmoins être toxiques à fortes concentrations. Le fer est utilisé par la cellule comme cofacteur pour de nombreuses fonctions, telles que la synthèse du matériel génétique, le système immunitaire ou le transport de l’oxygène (Lim et al., 2000; Nordberg et al., 2014). Une carence en fer va donc être néfaste pour un organisme, tout comme son excès. Une déficience en fer peut conduire à une anémie et un dérèglement de nombreuses fonctions métaboliques, ainsi qu’une perte de résistance envers des pathogènes (Goyer et Clarkson, 1996; Sealey et al., 1997). Même si cet élément est facilement régulé par l’organisme, un excès de fer peut conduire à la formation de nombreux radicaux hydroxyles via la réaction de Fenton, des dommages cellulaires et tissulaires, de la peroxydation lipidique, etc. (Cf. Tableau 2) (Dalzell et Macfarlane, 1999; Revillard, 2001; Debnath et al., 2012).

5.1.5. Le manganèse

Le manganèse ($Z = 25$) est un métal de transition, présent sur Terre avec 11 états de valence, qui est souvent utilisé pour fabriquer des alliages, des piles électriques et des pesticides. Parmi ces 11 états de valence, deux sont importants pour l’organisme (MnO_2 / Mn^{3+}). Il s’agit d’un métal essentiel puisqu’il agit comme cofacteur pour plusieurs activités enzymatiques notamment liées à la phosphorylation, la synthèse d’antigènes et le système antioxydant avec la SOD (Michiels et al., 1994; Goyer et Clarkson, 1996). Comme le fer, son excès ou sa carence peuvent être délétères aux organismes. Une carence en manganèse va aboutir à des problèmes squelettiques et reproducteurs, tandis qu’un excès en manganèse peut aboutir à des effets sur la structure et la fonction de plusieurs cellules et organes (Cf. Tableau 2) (Goyer et Clarkson, 1996).

Tableau 2 : Liste non exhaustive d'effets des métaux (U, Al, Fe, Mn) sur le poisson, en fonction de la concentration métallique, de la voie et de la durée d'exposition.

Métal	Concentration	Durée	Spécificité	Effet observé	Espèce	Article
Uranium	20; 250 µg/L	5; 20; 40j		↘ de la reproduction	<i>Danio rerio</i>	Simon et al. (2014)
	100 µg/L	20j			<i>Danio rerio</i>	Barillet et al. (2007)
	0,25 à 1 mg/L	48h		induction d'un stress oxydant	<i>Salmo salar</i>	Song et al (2012)
					<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Buet et al. (2005)
	20; 250; 500 µg/L	17h; 3j	<i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i>	impacte le système immunitaire	<i>Danio rerio</i>	Gagnaire et al. (2014)
	100; 500 µg/L	20j		↗ les dommages à l'ADN	<i>Danio rerio</i>	Barillet et al. (2005)
	100 µg/L	20j		↗ l'activité de l'AChE	<i>Danio rerio</i>	Barillet et al. (2007)
				<i>Danio rerio</i>	Barillet et al. (2010)	
	0,1; 1; 10 mg/L	10; 30; 100j	Voie trophique	dommages tissulaires	<i>Coregonus clupeaformis</i>	Colley et al. (2000)
Fer				induction d'un stress oxydant	review	Lushchak (2011)
					review	Sevcikova et al. (2011)
	0,1 à 0,8 mg/L	24 à 96h		↘ de la masse et comportement léthargique	<i>Ctata catla</i> ; <i>Labeo rohita</i> ; <i>Cirrhinus mrigala</i>	Debnath et al. (2012)
	20; 60; 180 mg/kg	8sem	Voie trophique	↘ production d'anticorps	<i>Ictalurus punctatus</i>	Sealey et al. (1997)
	6,7 à 12,31 mg/L	3j		dommages tissulaires	<i>Salmo trutta</i>	Dalzell et MacFarlane (1999)
Aluminium	10 mg/L	30 à 250min	<i>in vitro</i>		<i>Salmo gaidneri</i>	Elsasser et al. (1986)
	0,05 à 239 mg/L	12 à 96h		impacte le système immunitaire	<i>Cyprinus carpio</i>	Garcia-Medina et al. (2011)
	0,1 mg/L	12 à 96h		le stress oxydant	<i>Ctenopharingodon idella</i>	Fernandez-Davila et al. (2012)
	0,1 mg/L	12 à 96h		↘ adrénaline; ↗ noradrénaline	<i>Ctenopharingodon idella</i>	Fernandez-Davila et al. (2012)
	30 µg/L	34j		impacte le métabolisme	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Allin et Wilson (1999)
	4,3 à 393 µg/L	147j		dommages tissulaires	<i>Salvelinus fontinalis</i>	Tietge et al. (2011)
	0,05 à 239 mg/L	12 à 96h		↗ les dommages à l'ADN	<i>Cyprinus carpio</i>	Garcia-Medina et al. (2011)
Manganèse	40; 80; 120 µg/g poisson	24h	<i>in vitro</i>	↗ des activités des cellules natural killer	<i>Cyprinus carpio</i>	Ghanmi et al. (1990)
	5 à 50 mg/L	96h		induction d'un stress oxydant	<i>Carassius auratus</i>	Vieira et al. (2012)
	0,17; 1,7 mg/L	14j		↗ les dommages chromosomiques	<i>Carassius auratus</i>	Falfushynska et al. (2011)
	0,17; 1,7 mg/L	14j		↘ l'activité de l'AChE	<i>Carassius auratus</i>	Falfushynska et al. (2011)
	60; 180; 300 mg/L	96h		dommages tissulaires	<i>Rutilus caspicus</i>	Hedayati et al. (2014)
	5 mg/L	2sem		↘ de la croissance et de la survie	<i>Argyrosomus japonicus</i>	Patridge et Lymbery (2009)

5.2. Le stress biologique

5.2.1. Les différents types de stress biologique

En plus du stress chimique, d'autres stress peuvent impacter les organismes. Parmi eux, le stress biologique regroupe plusieurs taxons capables d'induire des effets très délétères. On y retrouve les parasites, les bactéries, les biotoxines et les virus.

Brièvement, les parasites sont des organismes qui vivent aux dépens d'un autre organisme, son hôte, en trouvant chez ce dernier les éléments indispensables à sa survie : l'habitat et la nourriture. Les virus ne peuvent se répliquer que dans des cellules de l'hôte, en utilisant son métabolisme et sa machinerie génétique. Les biotoxines regroupent l'ensemble des substances toxiques produites (métabolites secondaires) créées par des animaux et végétaux (phytotoxines et zootoxines).

Les bactéries sont des organismes procaryotes, dont une partie seulement est pathogène. Deux catégories de bactéries se distinguent en fonction de la structure de leur paroi, les bactéries Gram⁺ et les bactéries Gram⁻. Les éléments toxiques non-sécrétés des bactéries pathogènes sont essentiellement les endotoxines. Bien que l'on retrouve des activités semblables à celles des endotoxines chez les bactéries Gram⁺ (*Listeria*) (Swain et al., 2008), ces endotoxines sont retrouvées principalement chez les bactéries Gram⁻. Les plus connues des endotoxines des bactéries Gram⁻ sont les lipopolysaccharides (LPS). Ils sont constitués de trois parties, schématisées sur la Figure 11. Ancré dans la paroi bactérienne, le lipide A représente la partie toxique du LPS, qui est la partie la plus conservée au fil de l'évolution (Solem et al., 1995). Le noyau est constitué d'un oligosaccharide et relie le lipide A à l'antigène O (Szalo et al., 2006).

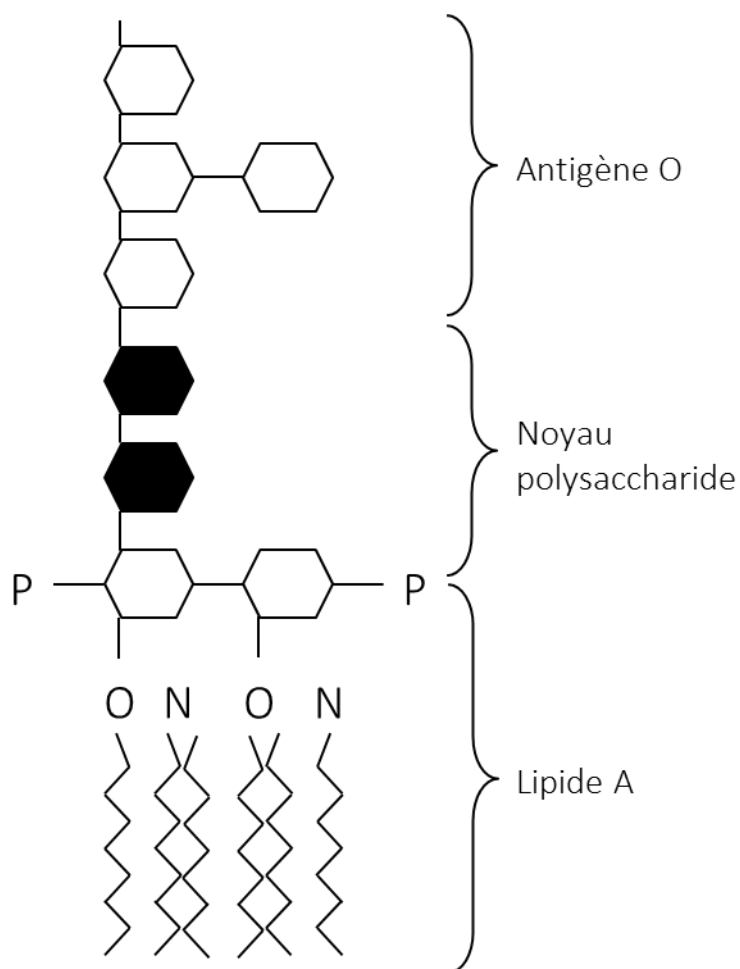


Figure 11 : Schéma d'un lipopolysaccharide d'une bactérie Gram⁻. D'après Swain et al. (2008).

5.2.2. La toxicité des lipopolysaccharides

De nombreuses études ont montré que les LPS pouvaient entraîner des effets pathogéniques, notamment à forte concentration (Dalmo et Seljelid, 1995; Miller et al., 2002; Hang et al., 2013). Leurs impacts sur le système immunitaire proviennent surtout du rôle du lipide A. En effet, lorsque ce lipide se lie à une protéine, le ligand formé peut être lié à un récepteur à la surface des macrophages (Szalo et al., 2006; Swain et al., 2008). Cette liaison va aboutir à la mise en place de l'inflammation via la libération de cytokines pro-inflammatoires, telles que les interleukines ou le TNF- α , et l'activation du complément. Cette augmentation des cytokines pro-inflammatoires due aux LPS a été précédemment observée chez le poisson zèbre, *Danio rerio* (Watzke et al., 2007).

L'exposition aux LPS induit fréquemment une augmentation de la phagocytose et de la flambée oxydative (Dalmo et Seljelid, 1995; Solem et al., 1995; Spolarics et Wu, 1997; Kozinska et Guz, 2004; Nayak et al., 2008), afin de lyser la bactérie et éviter l'infection.

Cependant, grâce aux LPS sur leur paroi, et notamment à l'antigène O, les bactéries peuvent échapper à la phagocytose et au complément. La structure tridimensionnelle de l'antigène et le blocage de la fixation des complexes C3b ou C5b-C8 du complément permettent à la bactérie d'éviter la lyse par le complément ou par phagocytose (Szalo et al., 2006). Les LPS confèrent deux autres fonctions aux bactéries. La première est le mimétisme bactérien, qui lui permet d'exprimer en sa surface des structures similaires aux antigènes du « soi », ce qui conduit à l'évitement des réponses immunitaires ou à la destruction de certaines cellules du « soi » qui présentent les mêmes structures antigéniques (Szalo et al., 2006). La deuxième fonction est l'adhérence, réalisée par toutes les parties du LPS, indispensable à la colonisation bactérienne lors d'une infection (Szalo et al., 2006).

Il existe de nombreux LPS différents, selon la bactérie Gram⁻ qui les détient. Cependant Solem et al. (1995) ont démontré que l'intensité de réponse (du moins pour la flambée oxydative) aux différents LPS était la même.

Les effets néfastes des LPS à fortes concentrations ont de nombreuses fois été observés, menant même jusqu'à la mort, particulièrement chez les mammifères (Morrison et al., 1984; Swain et al., 2008). Cependant, à faible concentration, ils peuvent être utiles à la limitation de l'infection à des bactéries ou virus (Solem et al., 1995; Miller et al., 2002; Anwar et Choi, 2014). En effet, les LPS peuvent amorcer le système immunitaire inné, processus qui peut conférer de la résistance face à une infection (Solem et al., 1995; Swain et al., 2008).

5.3. La combinaison de stress

5.3.1. La contamination polymétallique

Les effets d'une exposition à un seul métal ont majoritairement été étudiés, décrits et compris. Néanmoins, lorsque ces métaux se retrouvent en mélange, cette compréhension des effets est bien plus délicate (Forbes et al., 2006). Excepté lors d'une contamination aiguë, il est rare qu'un seul métal soit présent dans un environnement. Généralement les gestionnaires des risques observent une contamination polymétallique. L'interprétation des

effets et réponses devient donc beaucoup plus difficile puisqu’il faut prendre en compte les interactions chimiques et toxicologiques entre les métaux (Valcke et al., 2012).

De nombreuses études de laboratoire se sont penchées sur les interactions entre métaux, et particulièrement entre deux métaux. En fonction de la nature de ces métaux, de leurs concentrations et du modèle biologique utilisé, les interactions observées entre les métaux sont l’additivité, la synergie, et en moindre importance l’antagonisme des effets (Preston et al., 2000; Margerit et al., 2015). L’additivité est observée lorsque les effets du mélange de métaux sont égaux à la somme des effets des métaux pris individuellement. Lorsque ce mélange induit plus ou moins d’effet que l’addition des effets des métaux individuels, il y a respectivement synergie ou antagonisme (Preston et al., 2000).

Cependant, les modèles d’interaction ne sont pas généralisables sur toutes les réponses ou biomarqueurs d’un même individu. Heier et al. (2013) ont donné un exemple sur le saumon (*Salmo salar*). Ils ont observé un phénomène d’additivité des effets de l’aluminium et du cuivre sur le glutathion réduit et oxydé. Cependant, toutes les autres réponses analysées présentaient la même intensité si les deux métaux sont en mélange, ou si l’aluminium ou le cuivre étaient présents seuls. Ces résultats peuvent être expliqués par une différence de bioaccumulation d’un métal lorsque l’organisme est exposé à ce métal individuellement ou à plusieurs métaux. En effet, une co-exposition à plusieurs métaux peut entraîner des modifications dans la bioaccumulation de ces métaux dans un organisme (Wedemeyer, 1968; Zhang et Wang, 2005). Un métal peut aussi modifier la toxicité d’un autre métal lorsqu’ils sont en mélange, ou même exposés l’un après l’autre. Ceci est d’autant plus vrai lorsque des métaux essentiels sont présents dans le milieu contaminé (Pyle et al., 2005). En effet, Sanchez-Dardon et al. (1999) ont observé qu’une exposition au mercure, au cadmium ou au zinc (métal essentiel) induisait une immunosuppression chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). Ces mêmes effets étaient observés lorsque ce poisson était exposé au mélange cadmium/mercure. Par contre, lorsque l’un de ces deux métaux, ou les deux, était mis en mélange avec du zinc, les effets néfastes sur le système immunitaire se trouvaient diminués. Les auteurs en ont conclu que le zinc apportait une protection à la truite envers la toxicité du cadmium et du mercure, en émettant des hypothèses quant aux mécanismes de protection. Une co-exposition au zinc permettrait de mobiliser les métallothionéines, capables de séquestrer les deux autres métaux, et/ou le zinc entrerait en compétition avec le

cadmium pour entrer dans la cellule, en empêchant donc sa toxicité. D’autres études ont aussi montré une protection apportée par un métal essentiel envers d’autres métaux (Ates et al., 2008; Orun et al., 2008). Inversement, Zhang et Wang (2005) ont observé qu’une pré-exposition par voie directe ou trophique à du zinc favorisait l’accumulation du zinc ou du cadmium chez deux espèces de poissons marins (le pagre à tête noire, *Acanthopagrus schlegeli* et le térapon à lignes courbes, *Terapon jarbua*) lors d’une prochaine exposition, pouvant donc augmenter la toxicité de ces métaux.

En plus de devoir tenir compte des possibles interactions entre les métaux, il faut aussi tenir compte de l’influence de facteurs confondants pouvant influencer leur accumulation et toxicité, mais aussi d’autres sources de stress, comme un autres stress chimique (composés organo-volatiles, pesticides, etc.) ou un stress biologique.

5.3.2. La combinaison stress chimique et stress biologique

Tout d’abord, les effets de l’exposition à deux stress de natures différentes peuvent être dépendants des conditions d’exposition, telles que l’ordre d’apparition de ces stress. Tandis que les études soumettant les poissons à un stress métallique avant un stress biologique montraient une augmentation de la susceptibilité au second stress, Dautremepuits et al. (2002) ont montré qu’une exposition du parasite (*Ptychobothrium* sp.) chez la carpe, *Cyprinus carpio*, réduisait les effets d’une exposition ultérieure au cuivre sur les réponses antioxydantes. Les études appliquant ces deux stress en même temps sont plus récurrentes, et la plupart observent une augmentation des effets toxiques (additivité ou synergie), que ce soit au laboratoire ou sur le terrain, comme le montrent les études de Marcogliese et al. (2005) et de Jolly et al. (2014).

Les études faisant varier l’ordre d’apparition des stress métallique et biologique sont très rares. Chou et al. (1999) n’ont observé aucune différence sur la survie du virus de la nécrose infectieuse du pancréas (IPNV) contenu dans le mérrou, *Epinephelus* sp., lorsque le stress métallique (cuivre, cadmium, ou zinc) est appliqué avant ou après le stress biologique.

Compte-tenu de la contamination polymétallique présente au niveau des étangs à proximité des anciennes mines d’uranium, il a été décidé dans cette étude d’exposer les poissons dans un premier temps à un stress chimique, puis à un stress biologique. Nous détaillerons donc les effets d’un stress chimique sur la susceptibilité des poissons envers un stress biologique.

La susceptibilité peut être définie comme la sensibilité d’un organisme à des changements de son milieu. Si la résistance de l’organisme face à ce changement est faible, alors sa susceptibilité envers ce stress est élevée, et inversement.

Plusieurs études, notamment de laboratoire, se sont déjà concentrées sur ce point en exposant des poissons dans un premier temps à un stress métallique (un ou plusieurs métaux) avant de leur faire subir un stress biologique (LPS, bactérie, virus, parasite). Le Tableau 3 liste les études de la susceptibilité à un stress biologique après un stress métallique. A noter que la contamination métallique n’est pas prolongée pendant le challenge avec le stress biologique excepté pour les études de Roales et Perlmutter (1977), de MacFarlane et al. (1986), de Rougier et al. (1996) et d’Esteve et al. (2012).

Quel que soit le stress biologique mis en jeu, la plupart des études observent une augmentation de la susceptibilité suite à une exposition à des métaux. Cette susceptibilité se traduit par une mortalité due au stress biologique plus importante, ou par d’autres effets plus subtils (Cf. Tableau 3). Le système immunitaire étant primordial pour faire face aux pathogènes, les études se sont concentrées sur sa description. Une exposition aux métaux peut donc entraîner une immunosuppression chez les poissons, qui va résulter en une augmentation de la susceptibilité aux pathogènes (Zelikoff, 1993). Les perturbations du système immunitaire peuvent être variées (Cf. Ch. 2, partie 2.2). Cependant, trois réponses sont souvent analysées. En effet, la prolifération lymphocytaire, la phagocytose et la création d’anticorps peuvent être diminuées par les métaux, laissant les poissons mal équipés envers le stress biologique. Bien que ces études s’intéressent à des modifications sur le système immunitaire, elles ne se concentrent pas sur d’autres biomarqueurs, comme les enzymes antioxydantes ou les dommages à l’ADN.

Tableau 3 : Exemples d’études mettant en avant les effets d’une exposition à un métal, ou à un mélange de métaux sur la susceptibilité envers un stress biologique (bactéries, LPS, virus, parasites) chez un poisson.

Stress chimique	Stress biologique	Espèce de poisson	Susceptibilité au stress biologique		Effet	Référence
Cu	Parasite (<i>Saproleginia parasitica</i>)	<i>Onchorynchus mykiss</i>	-		-	Carballo et Muñoz (1991)
Cu	Bactérie (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	<i>Saccobranthus fossilis</i>	↗		Augmentation de la mortalité	Khengarot et Rathore (1999)
Cu	Bactérie (<i>Yersinia ruckeri</i>)	<i>Salmo gairdneri</i>	↗		Augmentation de la mortalité	Knittel (1981)
Cu	Parasite (<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>)	<i>Carassius auratus</i>	↘		Baisse de la mortalité	Ling et al. (1993)
Fe	Bactérie (<i>Edwardsiella ictaluri</i>)	<i>Ictaluris punctatus</i>	↘		Baisse de la mortalité et immunostimulation (augmentation du chimiotactisme des macrophages)	Sealey et al. (1997)
Fe	Bactérie (<i>Edwardsiella ictaluri</i>)	<i>Ictaluris punctatus</i>	-		-	Lim et Klesius (1997)
Cd	Bactérie (<i>Bacillus cereus</i>)	<i>Tautoglabrus adspersus</i>	↗		Immunosuppression (diminution des anticorps) chez la tanche	Robohm (1986)
		<i>Morone saxatilis</i>	↘		Immunostimulation (augmentation des anticorps) chez le bar rayé	
Cd	Bactérie (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	<i>Heteropneustes fossilis</i>	↗		Immunosuppression (neutralisation des anticorps)	Saxena et al. (1992)
Cr	Bactérie (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	<i>Saccobranthus fossilis</i>	↗		Immunosuppression (diminution de la prolifération lymphocytaires, du nombre d'anticorps et de la phagocytose)	Khengarot et al. (1999)
Hg	Bactérie (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	<i>Oreochromis niloticus</i>	↗		Immunosuppression (diminution des activités bactéricides)	El-Boshy et Taha (2011)
Hg / Cu	Virus (IPNV) et bactérie (<i>Proteus vulgaris</i>)	<i>Trichogaster trichopterus</i>	↗		Immunosuppression (suppression des anticorps). Pas de différence entre le mélange et si les métaux sont pris individuellement	Roales et Perlmutter (1977)
Cu / Zn	Bactérie (<i>Listeria</i>)	<i>Danio rerio</i>	↘		Diminution du nombre de listeria avec le Zn	Rougier et al. (1996)
			↘ ou ↗		Diminution ou augmentation du nombre de listeria avec le Cu	
Fe / Cu	Bactérie (<i>Edwardsiella tarda</i>)	<i>Anguilla anguilla</i>	↗		Augmentation de la mortalité	Esteve et al. (2012)
Zn / Cd / Cu	Virus (IPNV)	<i>Epinephelus</i> sp.	↗		Augmentation de la mortalité	Chou et al. (1999)
As / Cd / Cu / Pb / Se	Bactérie (<i>Flexibacter columnaris</i>)	<i>Morone saxatilis</i>	↘		L'ensemble les cinq métaux / Cu / Cd	Mac Farlane et al. (1986)
			-		Pb / Se	
			↗		As	

L'augmentation de la susceptibilité envers le stress biologique causée par une exposition préalable aux métaux n'est pas le seul effet observé. En effet, les capacités d'acclimatation des poissons au stress biologique peuvent être augmentées ou identiques après une exposition aux métaux, comme le montrent MacFarlane et al. (1986), Robohm (1986), Ling et al. (1993), Rougier et al. (1996) ou encore Sealey et al. (1997). Un élément important est, qu'excepté pour le cadmium (MacFarlane et al., 1986; Robohm, 1986), tous les autres métaux augmentant la résistance envers un stress biologique sont des métaux essentiels (cuivre, zinc, fer). Cette remarque va à l'encontre des conclusions émises par Knittel (1981), Chou et al. (1999), Khangarot et Rathore (1999) ou encore plus récemment par Esteve et al. (2012), où les métaux essentiels provoquaient une augmentation de la susceptibilité aux pathogènes. Ceci est une autre preuve de l'ambiguïté des effets des métaux essentiels sur le vivant. La durée d'exposition à ces métaux ne semble pas avoir d'effet sur les réponses analysées. En effet, les études observant une diminution de la susceptibilité ont une période d'exposition aux métaux allant de 4 jours à 8 semaines alors que les études montrant une augmentation de la susceptibilité ont une durée d'exposition de 2 jours à 3 semaines. La concentration des métaux pourrait avoir des conséquences sur leurs effets sur les capacités d'acclimatation des poissons envers un stress nutritionnel, comme le montre Chou et al. (1999). Le cuivre à faible concentration (0,02 mM) n'influe pas sur la survie du virus chez le mérrou, contrairement aux plus fortes concentrations (de 0,2 à 20 mM). D'autres études ont montré un effet dose-dépendant des métaux sur la susceptibilité à un stress biologique (Knittel, 1981; Saxena et al., 1992; Sealey et al., 1997). Cependant, cette hypothèse n'est pas confirmée lorsque l'on compare les différentes études. En effet, en se focalisant sur le cuivre, certaines études ont montré une augmentation de la susceptibilité à un stress biologique après une exposition à des concentrations de 7 à 320 µg/L, alors que celles observant une diminution de cette susceptibilité ont utilisé des concentrations de cuivre allant de 50 à 225 µg/L. Il est donc préférable de faire l'hypothèse que les effets des métaux sur la susceptibilité des poissons envers un stress biologique dépendent donc d'un ensemble de variables, rendant donc leur interprétation complexe. Tout d'abord, la nature du ou des métaux, du stress biologique et de l'espèce de poisson peuvent faire varier les résultats obtenus (Roales et Perlmutter, 1977; Robohm, 1986; Rougier et al., 1996). Puis, comme mentionné ci-dessus, les concentrations des métaux et la durée d'exposition peuvent faire varier la susceptibilité aux pathogènes. La

méthode d’exposition aux métaux (par voie directe ou trophique) et au stress biologique (par immersion ou par injection) peut aussi faire varier les résultats, comme observé entre les travaux de Ling et al. (1993) et de Khangarot et Rathore (1999) ou entre ceux de Esteve et al. (2012) et de Sealey et al. (1997). Enfin, les facteurs confondants, abiotiques ou biotiques, peuvent aussi interférer avec les effets et réponses observés, soit directement en stressant les organismes (Bowden, 2008; Oliva et al., 2012a; Vinagre et al., 2012), soit indirectement en diminuant l’accumulation des métaux dans les organismes ou leur toxicité (Spry et Wiener, 1991; Ribera et al., 1996; Monette et McCormick, 2008). Les possibles effets des facteurs confondants seront détaillés en discussion (Cf. Ch. 7, partie 3). Enfin, même si presque toutes les conditions sont identiques (même espèce de poisson, même stress biologique, mêmes conditions d’exposition au fer), Lim et Klesius (1997) et Sealey et al. (1997) n’ont pas trouvé les mêmes effets du fer (exposition trophique) sur la susceptibilité à la bactérie *Edwardsiella ictaluri*. En effet, tandis que la première étude ne montre pas de changement dans le chimiotactisme des macrophages de la barbus de rivière (*Ictalurus punctatus*) après une carence en fer ou avec 20 mg/kg de nourriture, la deuxième étude montre une augmentation de ce chimiotactisme avec la même concentration. Seul le temps d’exposition au fer change entre les deux études (13 semaines pour la première et 8 pour la seconde). Il est donc important de calibrer au mieux les variables d’exposition qui le peuvent afin de bien caractériser les effets d’un stress chimique sur la susceptibilité d’un organisme envers un stress biologique.

CHAPITRE 3 :

JUSTIFICATIONS DES CHOIX

METHODOLOGIQUES



1. Les sites uranifères retenus

Suite à une prospection de 13 étangs répartis sur trois départements (Cf. Annexe 1), six d'entre eux ont été sélectionnés en fonction de leur proximité entre eux et à un ou plusieurs anciens sites miniers, ainsi qu'en fonction de leurs concentrations en métaux. Ces six plans d'eau sont situés dans deux départements, le Cantal dans la région de l'Auvergne et la Haute-Vienne dans la région du Limousin. Les emplacements des étangs et des anciens sites miniers sont indiqués dans la Figure 12. Pour chacun de ces départements, un étang se trouvant sous l'influence de rejets miniers, et deux autres en dehors de cette influence ont été sélectionnés. Dans le département de la Haute-Vienne, l'étang de Pontabrier reçoit des rejets miniers uranifères de quatre anciens sites miniers faisant partie de la division minière du Cruzille (Cf. Tableau 4) :

- le site de Margnac-Peny (1), le plus proche de l'étang de Pontabrier. Ce site a hébergé plusieurs mines à ciel ouvert, deux lots de galeries souterraines ainsi qu'une usine de traitement du minerai d'uranium. Ce site a fonctionné pendant plus de 40 ans, ce qui fait de lui le site qui a extrait le plus d'uranium et donc de stériles parmi les quatre, soit plus de quatre millions de tonnes.
- le site de Bachellerie (2). Ce site est beaucoup moins important que celui de Margnac-Peny puisqu'il ne disposait que d'une seule mine à ciel ouvert, sans galerie ni d'usine de traitement d'uranium.
- le site de Venachat (3). Bien que sa superficie soit la deuxième plus grande, ce site ne disposait que d'une mine à ciel ouvert ainsi qu'un lot de galeries souterraines. Cependant, malgré cela, ce site a extrait environ $5 \cdot 10^5$ tonnes de minerais.
- le site de Santro (4), qui ne produisait que 26 tonnes d'uranium en un an.

Deux autres étangs en dehors de l'influence de rejets miniers ont été sélectionnés à proximité de l'étang de Pontabrier : l'étang de Malessard, situé à 14 km à l'est de Pontabrier et l'étang de la Jonchère Saint-Maurice, éponyme du village qui l'entoure, situé à 12 km à l'est de Malessard.

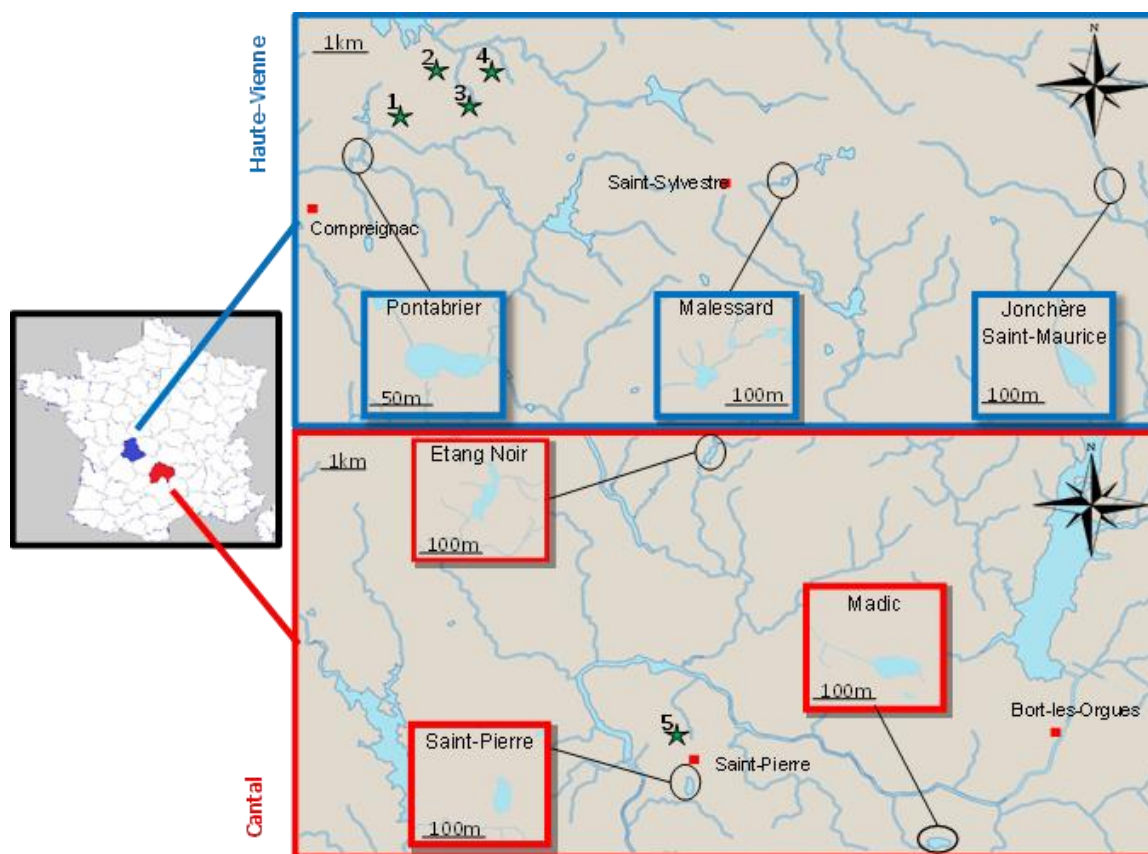


Figure 12 : Localisation des étangs d'intérêt de Haute-Vienne et du Cantal. Les étoiles vertes correspondent aux anciens sites miniers uranifères (1 : Margnac-Peny / 2 : Bachellerie / 3 : Venachat / 4 : Santro / 5 : Saint-Pierre).

Concernant le département du Cantal, l'étang de Saint-Pierre constitue l'étang pollué par les métaux précédemment décrits. Contrairement à Pontabrier, cet étang est proche d'un seul site minier (5), portant le même nom que l'étang et le village (Cf. Tableau 4). Ce site a néanmoins extrait une forte quantité d'uranium pendant 22 ans, hébergeait deux usines de traitement des minerais et était utilisé comme stockage de résidus de traitement. Ces caractéristiques font de ce site une priorité pour les organismes de protection envers les impacts radiologiques comme l'IRSN. En effet, de nombreuses études se sont penchées sur ce site. Historiquement, le village se situait sur le site d'extraction, et la compagnie minière a décidé de le déplacer afin de pouvoir exploiter au mieux les gisements d'uranium. L'usine fut démantelée en 1990, mais le réaménagement de ce site prit fin seulement en 2002. Proches de cet étang, deux autres plans d'eau hors influence minière ont été choisis après prospection. Le lac de Madic, assez proche de l'étang de Saint-Pierre (10 km à l'est), ainsi que l'Etang Noir (20 km au nord) ont donc aussi été sélectionnés afin de mener à bien ces études environnementales.

Tableau 4 : Liste et description des anciens sites miniers proches des étangs d'intérêt de Haute-Vienne et du Cantal. Les chiffres correspondent aux anciens sites miniers localisés sur la figure 2.

Source : IRSN (2007).

DEPARTEMENT	HAUTE-VIENNE (87)				CANTAL (15)
	1	2	3	4	5
N° de site minier					
NOM DU SITE MINIER	MARGNAC-PENY	BACHELLERIE	VENACHAT	SANTRO	SAINT-PIERRE
Surface (ha)	148	2	30	5	25
Début de l'exploitation	oct-53	juin-76	année 1959	oct-83	année 1958
Fin de l'exploitation	févr-95	déc-76	déc-92	oct-84	année 1982
Fin de la réhabilitation	année 2000	année 1977	déc-99	juil-85	année 2002
Mines à ciel ouvert	12	1	1	1	1
Galeries souterraines	2	-	1	-	-
Usine de traitement	1	-	-	-	2
Stockage de résidus	-	-	-	-	oui
Stations de traitement des eaux	7	1	1	-	2
U produits (t)	9.453	64	748	26	1.339
Minerais (t)	4.170.605	34.885	522.664	21.462	707.116
Propriétaire actuel	AREVA	AREVA	AREVA	AREVA	AREVA

2. Le modèle biologique retenu

Le modèle biologique utilisé dans nos études est l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*, L.) (Cf. Figure 13).

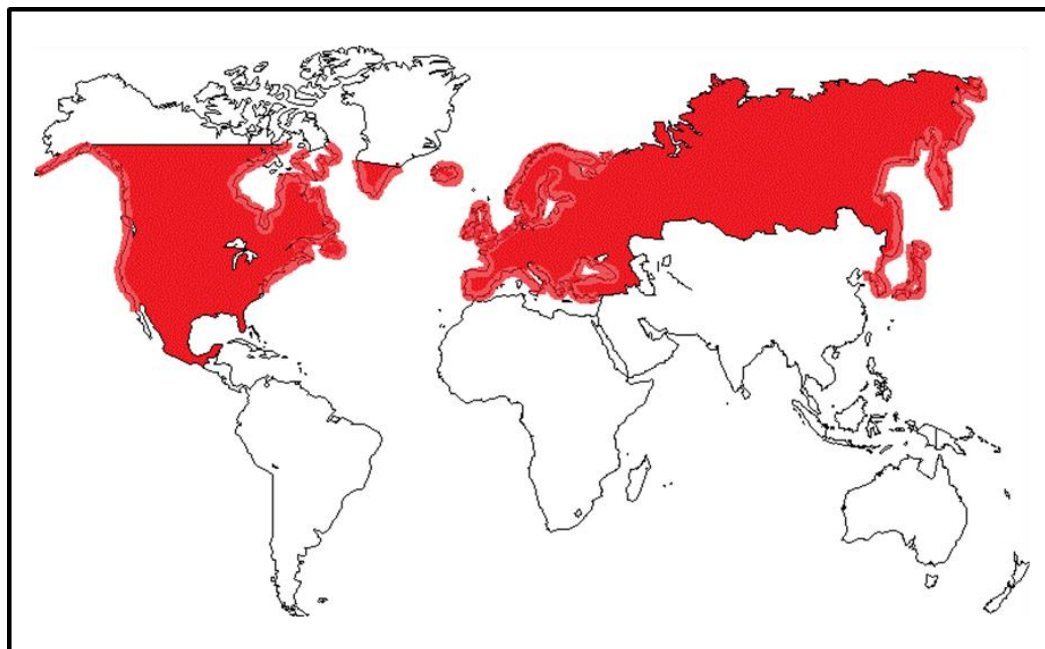


Figure 13 : Photographie d'une épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*).

Il s'agit d'un poisson téléostéen, dont la classification est notée ci-dessous.

Ordre	→	<i>Gasterosteiformes</i>
Sous-ordre	→	<i>Gasterosteoidei</i>
Famille	→	<i>Gasterosteidae</i>
Genre	→	<i>Gasterosteus</i>
Espèce	→	<i>aculeatus</i>

Ce petit poisson (4 à 10 cm) comporte plusieurs populations pouvant vivre dans les eaux douces ou marines. En effet, tandis que des populations sont strictement confinées dans les eaux douces, d'autres passent la moitié de l'année en mer (Wootton, 1976, 1984; McCairns et Bernatchez, 2010). On retrouve donc des populations sédentaires, mais aussi d'autres migratrices. Son aire de répartition est centrée sur l'hémisphère nord, aussi bien en Asie, Amérique qu'en Europe (Cf. Figure 14) (Wootton, 1984).



Source : WOOTTON 1984

Figure 14 : Planisphère indiquant en rouge la distribution mondiale de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*).

Le choix de l'épinoche comme espèce sentinelle lors de nos études *in situ* est argumenté par plusieurs raisons.

Comme le prouvent les ouvrages et études de Münzing (1963), de Wootton (1976, 1984), de Coad (1981), de Bell et Foster (1994) et Hart et Gill (1994), la biologie, le comportement, le mode de vie et l'écologie de cette espèce sont très bien documentés.

L'abondance et la sédentarité sont deux préceptes d'une espèce sentinelle. Sur ce critère, l'épinoche, qui a une large distribution globale (Cf. Figure 14) et qui est une espèce plus sédentaire que migratrice (Wootton, 1984; McCairns et Bernatchez, 2010), peut être considérée comme espèce sentinelle. En addition à ces deux critères, les épinoches d'eau douces vivent généralement dans des eaux peu profondes (espèce pélagique), et, excepté quelques populations, ont un caractère sociale, voire même grégaire, rendant leur capture aisée (Larson, 1976; Wootton, 1976; Marshall et Elliott, 1998).

Sa petite taille, suffisante pour collecter les organes et effectuer des analyses individuelles, permet d'utiliser de petits aquariums ou cages, et facilite donc grandement sa manipulation, son transport, son encagement et son élevage (Pottinger et al., 2002; Katsiadaki, 2006; Sanchez, 2007), critères importants pour définir une espèce sentinelle. D'autres avantages de l'épinoche peuvent être révélés comme atouts pour une biosurveillance active et un

engagement. En effet, le caractère social de ce poisson facilite son engagement, tout comme son régime alimentaire varié (Hart et Gill, 1994). Les proies les plus communes de l'épinoche à trois épines sont des petits crustacés, des œufs de poissons et des microalgues (Wootton, 1976; Hart et Gill, 1994), toujours présents dans les cours ou plans d'eau naturels. Un dernier avantage de l'épinoche pour la biosurveillance active est sa robustesse envers la manipulation, le transport et le courant (Pottinger et al., 2002).

Une espèce sentinelle se doit d'être résistante envers des conditions défavorables, telles que la pollution. En effet, contrairement aux espèces de laboratoires qui doivent être sensibles aux polluants, les espèces utilisées dans des expériences *in situ* doivent résister à des conditions de stress et de pollution plus importantes (Forbes et Forbes, 1997). Cependant, les effets de la pollution doivent tout de même être observables sur cette espèce. Ces caractéristiques ont de nombreuses fois été démontrées chez l'épinoche via des études de toxicité au laboratoire (Katsiadaki et al., 2006; Andersson et al., 2007), en mésocosme (Roussel et al., 2007; De Kermoyan et al., 2013), ou sur le terrain (Pottinger et al., 2002; Sanchez et al., 2007; Pottinger et al., 2013).

Ces études ont permis l'analyse d'un certain nombre de biomarqueurs sur l'épinoche à trois épines, en lien avec le stress oxydant (Sanchez et al., 2007; Sanchez et al., 2008a), le système immunitaire (Bado-Nilles et al., 2013; Bado-Nilles et al., 2014b), le système endocrinien (Katsiadaki et al., 2006; Sanchez et al., 2008a), les protéines et enzymes de stress et de défense (Holm et al., 1994; Andersson et al., 2007; Pottinger et al., 2013) et la neurotoxicité (Sturm et al., 2000; Sanchez et al., 2008a).

Enfin, une espèce sentinelle doit être représentative d'un habitat ou d'un écosystème particulier. Le côté sédentaire des populations d'eau douce, leur utilisation en tant que modèle biologique et leur possibilité de vivre dans plusieurs habitats différents (l'épinoche est relativement tolérante à des variations de salinité, température et taux d'oxygène) leur procurent ce critère. L'épinoche est même devenue espèce modèle pour les effets de perturbation endocrinienne des produits chimiques par l'Organisation de Coopération et de Développement Économiques (OCDE, 2011). Pour toutes ces raisons, nous avons choisi l'épinoche comme modèle biologique dans le travail présenté.

3. Les analyses retenues

En plus de la mesure chimique des métaux dans l'eau et les organes des épinoches, un certain nombre de biomarqueurs ont été évalués lors des différentes expériences *in situ*. Le Tableau 5 condense les différentes analyses réalisées lors des trois prochains chapitres, avec les milieux ou organes utilisés ainsi que la méthodologie associée (la méthodologie détaillée se situe dans les différents articles scientifiques).

La sélection de ces analyses et des organes a été justifiée par plusieurs raisons :

- La plupart de ces analyses sont réalisées en routine dans les différents laboratoires d'accueil.
- La bioaccumulation a été évaluée dans les trois organes d'intérêt pour l'analyse des biomarqueurs réalisée pour ces travaux, à savoir la rate, le foie et le muscle.
- Pour les immunomarqueurs, les défenses immunitaires du poisson s'appuient davantage sur l'immunité innée que sur l'acquise car l'évolution de ce taxon s'est arrêtée plus précocement que les autres vertébrés, fortifiant l'évaluation de ces biomarqueurs dans la thèse (Saurabh et Sahoo, 2008). Ces analyses ont été effectuées au niveau de la rate car cet organe lymphoïde chez l'épinoche ne contient que peu d'érythrocytes par rapport à d'autres poissons. Cette caractéristique permet de ne pas effectuer un protocole de sédimentation (protocole du Ficoll) pouvant réduire le nombre de leucocytes à notre disposition. De surcroît, le rein antérieur, autre organe d'intérêt pour l'immunité, est plus délicate à extraire du corps des épinoches que la rate. Seul le protocole de phagocytose a été optimisé pour la mesure sur le cytomètre (Guava®EasyCyteTM 8HT) par rapport aux études de Chilmonczyk et Monge (1999), Bado-Nilles et al. (2013) et Bado-Nilles et al. (2014b). Ces modifications sont disponibles dans la partie « materials and methods » du premier article (Cf. Ch. 4, partie 2).
- L'activité de l'ACHe a été évaluée dans le muscle des épinoches pour une facilité de prélèvement de cet organe par rapport au cerveau.

- Enfin, les protagonistes du système antioxydant ont été évalués dans le foie, principal organe impliqué dans le métabolisme biochimique des xénobiotiques (Carlberg et Mannervik, 1975; Rocha et Monteiro, 1999; Dautremepuits et al., 2004).

Tableau 5 : Résumé des paramètres analysés lors des expériences *in situ* avec les milieux / organes et analyses correspondants.

<i>Composante</i>	<i>Biomarqueur</i>	<i>Analyse</i>	<i>Milieu / Organes</i>	<i>Références</i>
Contamination métallique	-	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif	Eau (fraction totale et dissoute)	-
Bioaccumulation métallique	-	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif	Rate, foie, muscle	-
Système immunitaire	Nécrose leucocytaire	Cytométrie en flux	Rate	<i>Bado-Nilles et al (2014b)</i>
	Apoptose leucocytaire			<i>Bado-Nilles et al (2014b)</i>
	Pourcentage lymphocytaire			<i>Bado-Nilles et al (2014b)</i>
	Intégrité de la membrane lysosomale			<i>Bado-Nilles et al (2013)</i>
	Capacité de phagocytose			<i>Gust et al (2013)</i>
	Flambée oxydative			<i>Chilmonczyk et Monge (1999)</i> <i>Bado-Nilles et al (2014b)</i>
Système antioxydant	Superoxyde dismutase	Dosage biochimique	Foie	<i>Paoletti et al (1986)</i>
	Catalase			<i>Babo et Vasseur (1992)</i>
	Glutathion total			<i>Vandeputte et al (1994)</i>
	Glutathion peroxydase			<i>Paglia et Valentine (1967)</i>
	Glutathion réductase			<i>Carlberg et Mannervik (1975)</i>
	Glutathion-S-transférase			<i>Habig et al (1974)</i>
Peroxydation lipidique	Substances réactives à l'acide thio barbiturique	Dosage biochimique	Foie	<i>Ohkawa et al (1979)</i>
Matériel génétique	Dommages à l'ADN (cassures de brins et sites abasiques)	Test des comètes en milieu alcalin	Sang	<i>Santos et al. (2013)</i>
Neurotoxicité	Acétylcholinestérase	Dosage biochimique	Muscle	<i>Ellman et al (1961)</i>
Homéostasie/détoxication	Métallothionéines	Polarographie	Foie	-
Atteintes histologiques	Agrégats macrophagiques	Histologie	Rein postérieur	-
Réserves énergétiques	Glycogène, sucres libres, lipides totaux	Dosage biochimique	Foie	<i>Frings et al (1972)</i> <i>Carr et Neff (1984)</i>

4. Rappel des objectifs de la thèse

Le premier objectif de la thèse avait plusieurs finalités. Dans un premier temps, il était nécessaire, avant d'en évaluer les effets, de caractériser la contamination polymétallique des étangs soumis aux rejets d'anciennes mines d'uranium. Cette caractérisation a été réalisée au niveau de l'eau des six plans d'eau ainsi qu'au niveau de trois organes des épinoches encagées dans les différents étangs.

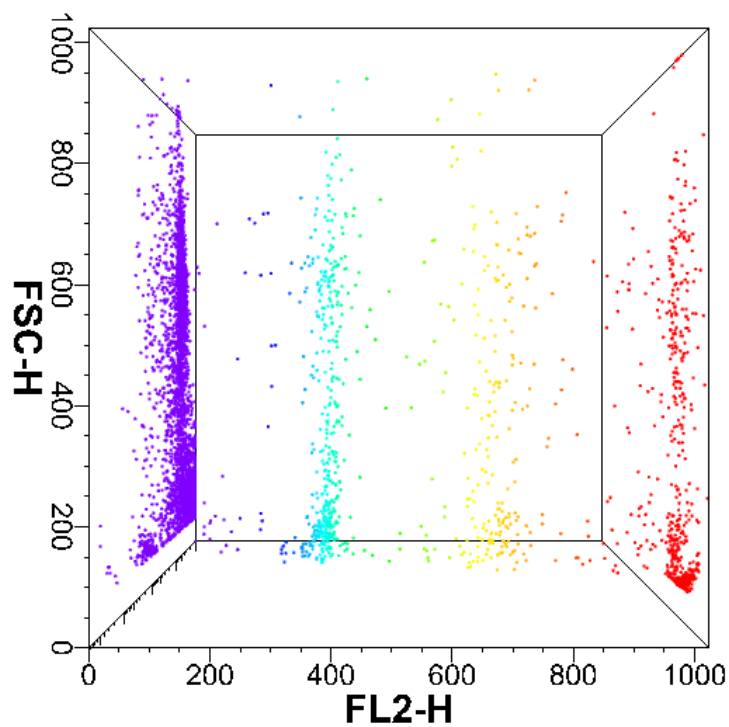
Par la suite, les effets sublétaux de l'exposition des épinoches à cette contamination métallique ont été évalués via l'analyse de plusieurs biomarqueurs précédemment listés (Cf. Tableau 5).

Afin d'approcher la réalité environnementale, nous avons ensuite placé des épinoches dans un contexte de multi-pollution, exposées donc à un stress chimique et à un stress biologique. Le but de ce deuxième objectif était de savoir si l'exposition préalable à la contamination polymétallique (le stress chimique) pouvait modifier les réponses des épinoches à un stress biologique soudain.

Afin de reproduire le stress biologique sur le terrain, une étude de laboratoire préliminaire était nécessaire. Elle avait pour but la mise en place d'un stress biologique chez l'épinoche, via une injection de lipopolysaccharides.

Ces expériences *in situ* utilisant l'encagement, il était important d'évaluer les possibles effets de cette technique sur les biomarqueurs d'écotoxicité, afin de valider cette technique chez l'épinoche. Ce troisième objectif a été réalisé en parallèle aux deux premiers en évaluant les effets de trois contraintes liées directement à l'encagement ou à la logistique des études *in situ* : la densité des épinoches dans les cages, un court transport avant les dissections ainsi qu'un non-apport alimentaire de 14 jours.

CHAPITRE 4 : EFFETS SUBLETAUX DE LA CONTAMINATION METALLIQUE SUR L'EPINOUCHE



1. Résumé de l'article scientifique

1.1. Objectifs

Cette étude a pour finalité la connaissance de la contamination métallique présente au niveau des hydrosystèmes proches d'anciens sites miniers uranifères ainsi que des effets sublétaux de cette contamination sur les épinoches non natives du milieu. Cette connaissance est importante avant de pouvoir répondre au troisième objectif principal de la thèse, et donc avant de faire subir un challenge de stress sur les épinoches. De plus, cette étude a permis de tester l'intérêt de l'approche multi-biomarqueurs dans le cadre d'exposition *in situ* de poissons à des métaux.

1.2. Matériels et méthodes

La complexité des étangs, dont ceux à proximité des anciens sites miniers, ne permettant pas de reproduire ces conditions au laboratoire, l'exposition *in situ* a été privilégiée via l'encagement de l'épinoche à trois épines provenant de l'élevage de l'INERIS dans les étangs d'intérêt. Ces encagements ont été réalisés dans deux départements français, la Haute-Vienne (87) et le Cantal (15), et se sont déroulés en mars-avril 2013. Pour chaque département, trois plans d'eau (étangs ou lacs) ont été choisis en fonction de leur proximité d'un ou plusieurs anciens sites d'uranium et de leur contamination métallique : un sous influence de rejets miniers (Pontabrier pour la Haute-Vienne et Saint-Pierre pour le Cantal), et deux en dehors de cette influence (Malessard et la Jonchère Saint-Maurice pour la Haute-Vienne et Madic et l'Etang Noir pour le Cantal) (Cf. Figure 12). Dans un premier temps, au laboratoire, les épinoches ont été acclimatées aux conditions physico-chimiques retrouvées dans les étangs (température, pH, conductivité) pendant 2 semaines. Puis les épinoches ont été engagées (30 épinoches par cage, 2 cages par étang, densité de 2,31 kg/m³) dans les six plans d'eau pour 28 jours. Quatorze et vingt-huit jours après l'encagement, 15 épinoches ont été sacrifiées pour l'analyse d'une batterie de biomarqueurs (Cf. Tableau 6). A la fin de l'expérience, 10 épinoches supplémentaires ont été sacrifiées pour analyser la bioaccumulation des métaux dans le foie, le muscle et la rate. Durant toute la phase

d'exposition aux métaux, les épinoches n'ont pas reçu d'apport extérieur de nourriture. Enfin, les propriétés physico-chimiques (température, pH, conductivité) ainsi que la concentration en métaux des eaux ont été mesurées après 0, 14 et 28 jours d'exposition.

Tableau 6 : Nature des biomarqueurs analysés, méthodes de mesure et organes associés lors de l'expérience *in situ* d'avril 2013.

Type	Biomarqueur	Abréviations	Mesure	Organe utilisé
Indices de condition	Indice de condition de Fulton	K	Mesures et pesées	Poisson entier
	Indice hépatosomatique	HSI		
Système immunitaire	Nécrose leucocytaire	Nec.	Cytométrie en flux	Rate
	Pourcentage de lymphocytes	Ly		
	Intégrité de la membrane lysosomale	IML		
	Activité oxydative basale	ROS b.		
	Capacité de phagocytose	Phago.		
Système Antioxydant	Catalase	CAT	Dosages biochimiques	Foie
	Superoxyde dismutase	SOD		
	Glutathion total	GSH		
	Glutathion reductase	Gr		
	Glutathion peroxydase	GPx		
Peroxydation lipidique	TBARS	TBARS	Dosage biochimique	Foie
Intégrité de l'ADN	Dommages à l'ADN	DNA	Test des comètes	Sang
Neurotoxicité	Acétylcholinestérase	AChE	Dosage biochimique	Muscle
Détoxication	Métallothionéines	MT	Polarographie	Foie
Histologie	Aggrégats macrophagiques	-	Microscopie	Rein postérieur

1.3. Principaux résultats et discussion

En fonction des concentrations dans la fraction dissoute de l'eau dans les différents étangs nous avons décidé de ne prendre en compte que cinq métaux (en gras) parmi les douze analysés (**uranium, aluminium, manganèse, baryum, fer**, cuivre, zinc, nickel, cobalt, chrome, plomb et cadmium). Les huit autres métaux ont été enlevés des analyses statistiques soit parce que la limite de détection de l'appareil de mesure ne permettait pas de connaître leur concentration, soit car cette concentration semblait très faible par rapport à la littérature. Les métaux restant sont donc dits « majoritaires ».

Les étangs soumis aux rejets miniers uranifères (Pontabrier et Saint-Pierre) ont été caractérisés par des concentrations plus importantes en uranium et manganèse, ainsi qu'en aluminium pour le département de la Haute-Vienne (Cf. Tableau 7). Les quatre autres étangs ont donc constitué, dans notre étude, les étangs de référence, avec néanmoins des variations de concentrations métalliques. En effet, tandis que l'étang de Malessard (département de la

Haute-Vienne) a présenté des concentrations des cinq métaux majoritairement retrouvés toutes plus faibles que l'étang contaminé, ce n'était pas le cas des étangs du Cantal (Cf. Tableau 7). Ces différences entre les étangs ont été confortées par les valeurs de bioaccumulation de l'uranium, fortement corrélées à la concentration de ce métal dans les étangs. Concernant les autres métaux, les corrélations entre bioaccumulation et concentrations métalliques dans l'habitat des poissons étaient plus organo-dépendantes. Il faut toutefois noter que la bioaccumulation des métaux essentiels (le fer et le manganèse) était particulière, ne reflétant pas leurs concentrations dans le milieu (Pyle et al., 2005; Maceda-Veiga et al., 2013).

Tableau 7 : Moyenne des concentrations des cinq métaux majoritaires (en µg/L) dans les étangs de Haute-Vienne et du Cantal au D14 lors de l'expérimentation d'avril 2013. Les écart-types, les valeurs du D28 ou les autres paramètres physico-chimiques analysés peuvent être observés dans le tableau 1 de l'article scientifique. C : étang contaminé. R : étang de référence.

Département	Etang	U	Al	Fe µg/L	Ba	Mn
Haute-Vienne	Pontabrier (C)	23,5	82,7	263,6	18,5	52,2
	Malessard (R)	0,3	44,9	82,0	6,4	16,1
	Jonchère Saint-Maurice (R)	0,0	48,7	396,6	22,1	27,1
Cantal	Saint-Pierre (C)	6,0	44,1	165,7	16,5	218,1
	Madic (R)	0,1	137,0	466,4	40,5	44,3
	Etang Noir (R)	0,2	202,2	295,0	21,2	28,7

Les épinoches encagées dans les étangs contaminés ont présenté un stress oxydant, visible par une augmentation de la production d'ERO par les leucocytes (Cf. Figure 15), par une modification d'une partie du système antioxydant du foie (SOD, CAT, GSH, GPx) et par une déstabilisation des membranes lipidiques (peroxydation). Ces corrélations entre la bioaccumulation et les biomarqueurs étaient néanmoins très dépendantes du département et du temps de prélèvement (D14 ou D28). Le stress oxydant chez les poissons est une conséquence récurrente d'une exposition à des métaux, comme le montrent les études ou revues de Sanchez et al. (2005), de Lushchak (2011) ou encore de Kelly et Janz (2009).

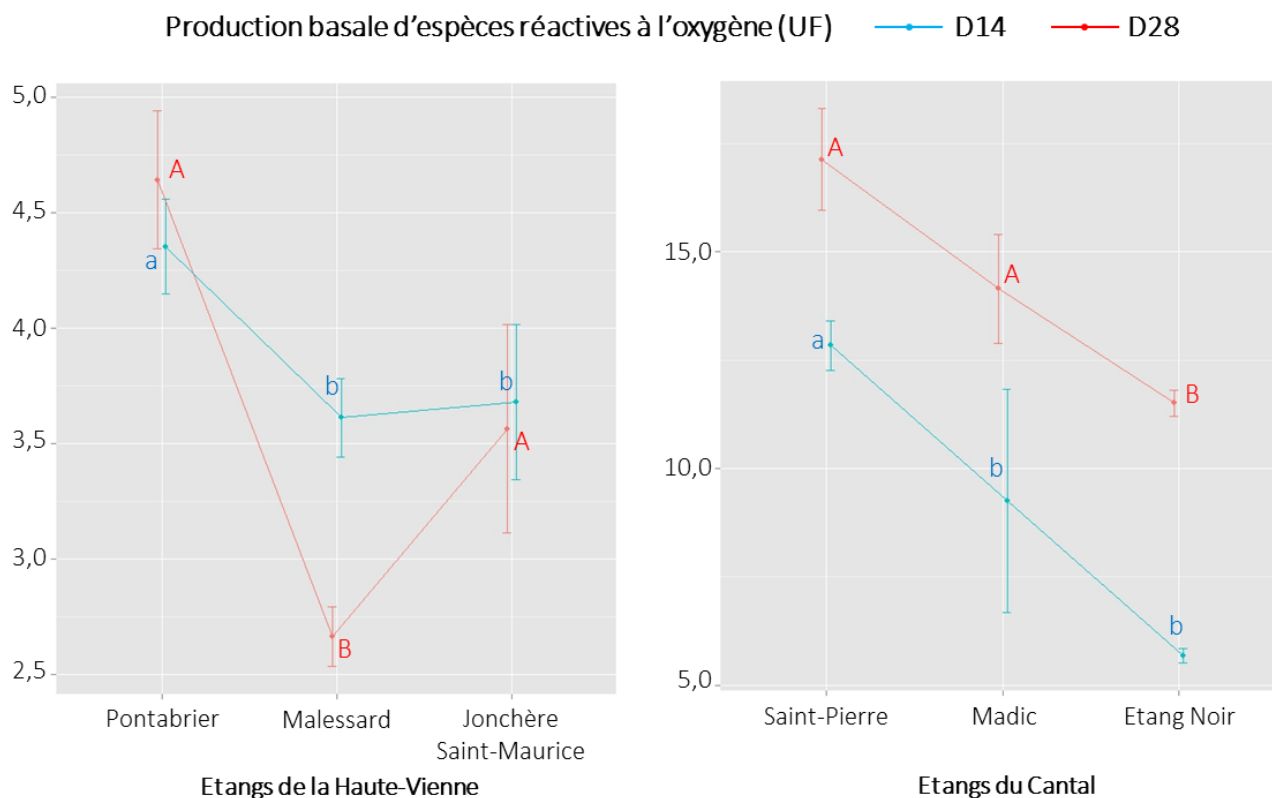


Figure 15 : Production basale d'ERO par les leucocytes contenus dans la rate des épinoches en fonction des étangs et des temps de prélèvement. Les lignes bleues représentent les résultats au bout de 14 jours, tandis que ceux en rouge au bout de 28 jours. Les différences significatives de ce biomarqueur entre les étangs lors du D14 sont représentées par différentes lettres minuscules et bleues ($\alpha = 5\%$). Les différences significatives entre les étangs lors du D28 sont représentées par différentes lettres majuscules et rouges ($\alpha = 5\%$).

D'autres effets de la contamination polymétallique étaient aussi visibles, mais dépendaient des conditions d'exposition des épinoches (département testé et temps de prélèvement). En effet, des dommages à l'ADN ont été observés dans l'étang contaminé du département de la Haute-Vienne après 14 jours d'exposition, mais ne l'étaient plus à la fin de l'encagement. Des systèmes de réparation ont pu être mis en place entre ces deux temps de prélèvement. Ces différences d'effet entre les temps de prélèvement ont également été observées pour l'activité de l'AcHé. Cette activité a été augmentée dans les étangs contaminés comparés aux étangs de référence, mais uniquement après 28 jours. Cette augmentation de l'activité de cette enzyme a aussi été soulignée après une exposition du poisson *Labeo capensis* à une contamination polymétallique (Wepener et al., 2011). Les épinoches encagées dans l'étang de Pontabrier présentaient un embonpoint plus faible que les autres (indice de condition de Fulton), suggérant un effet des métaux ou bien une alimentation différente selon les étangs.

Certains biomarqueurs n'ont pas été impactés par la contamination polymétallique, tels que les métallothionéines, les agrégats macrophagiques (marqueurs d'histopathologie) et le HSI.

Certains paramètres environnementaux sont à considérer comme des facteurs confondants pouvant interférer avec les biomarqueurs analysés. Ces facteurs confondants peuvent modifier la spéciation des métaux, leur bioaccumulation et leur toxicité (Spry et Wiener, 1991; Ribera et al., 1996). Dans cette étude, les concentrations métalliques variaient en fonction des étangs et des temps de prélèvement, mais c'était également le cas pour la température, le pH et la conductivité. Ces trois variables environnementales peuvent aussi interagir avec les fonctions biologiques du modèle et donc impacter les biomarqueurs analysés (Forbes et Forbes, 1997; Bowden, 2008; Besse et al., 2011; Qu et al., 2014). Les différences des réponses mesurées entre le D14 et le D28 pourraient donc être dues aux variations des concentrations métalliques et des conditions environnementales entre ces deux temps de prélèvement, modifiant ainsi le vécu des poissons.

Cette étude a permis de mettre en valeur l'utilisation d'une approche multi-biomarqueurs lors d'expériences *in situ*. En effet, tandis que les métallothionéines, régulièrement évaluées lors d'exposition aux métaux, n'ont pas réagi à la contamination polymétallique, un ensemble de biomarqueurs analysés sur divers organes ont mis en évidence un déséquilibre de la balance oxydative suite à cette pollution. En plus de ce stress oxydant, d'autres effets ont été visibles, pouvant laisser les épinoches plus susceptibles à l'occurrence d'un stress supplémentaire.

2. Article scientifique

***In situ* effects of metal contamination from former uranium mining sites on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.).**

Authors

Antoine Le Guernic^{1,2,3*}, Wilfried Sanchez², Anne Bado-Nilles², Olivier Palluel², Cyril Turies², Edith Chadili², Isabelle Cavalié¹, Laurence Delahaut³, Christelle Adam-Guillermin¹, Jean-Marc Porcher², Alain Geffard³, Stéphane Betoulle³, Béatrice Gagnaire¹.

¹Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Centre de Cadarache, 13115 Saint-Paul-Lez-Durance, France.

²Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), UMR-I 02 (INERIS, Université de Reims Champagne-Ardenne, Université du Havre) SEBIO (Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques), BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France.

³Université de Reims Champagne-Ardenne, UMR-I 02 (INERIS, Université de Reims Champagne-Ardenne, Université du Havre) SEBIO (Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques), Moulin de la Housse, B.P. 1039, 51687 Reims, France.

*Corresponding author: antoine.leguernic@irsn.fr, phone: +33 4 42 19 96 32.

Headings

- Polymetallic contamination linked to former uranium mines is characterized by the presence of high concentrations of uranium, barium and aluminum.
- Three-spined sticklebacks were caged in two ponds receiving mine tailings and four other ponds without these tailings.
- Polymetallic contamination impacted the immune and antioxidant systems, the physiology and DNA integrity of sticklebacks.

Abstract

Human activities have led to increased levels of various pollutants including metals in aquatic ecosystems. Increase of metallic concentrations in aquatic environments represents a potential risk to exposed organisms, including fish. The aim of this study was to characterize the environmental risk linked to a polymetallic contamination from former uranium mines in France on fish health. This contamination is characterized by metals naturally present in the areas (manganese and iron), uranium, and metals (aluminum and barium) added to precipitate uranium and its decay products. Effects from mine releases in two contaminated ponds (Pontabrier for Haute-Vienne department and Saint-Pierre for Cantal department) were compared to those assessed at four other ponds outside the influence of mine tailings (two reference ponds per department). In this way, 360 adult three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) were caged for 28 days in these six ponds before biomarker analysis (immune system, antioxidant system, physiology, histology, DNA integrity, etc.). Ponds receiving uranium mine tailings presented higher concentrations of uranium, manganese and aluminum, especially for the Haute-Vienne department. This uranium contamination could explain the higher bioaccumulation of this metal in fish caged in Pontabrier and Saint-Pierre ponds. In the same way, many fish biomarkers (antioxidant and immune system, acetylcholinesterase activity and biometric parameters) were impacted by this environmental exposure to mine tailings. This study shows the interest of caging and the use of a multi-biomarker approach in a complex metallic contamination.

-

Keywords

Polymetallic contamination; Uranium; Mine tailings; Biomarkers; Caging; Three-spined stickleback.

1. Introduction

Uranium is extracted in large quantities from mines around the world to meet global energy demands. Together, Kazakhstan, Canada and Australia are responsible for more than half the global uranium production. Although it is an actinide, chemical toxicity of natural uranium is considered to be much higher than its radiological toxicity (Mathews et al. 2009). The extraction of uranium from mines can have harmful chemical and radiological effects on ecosystems and human health, even after mining activities have ended (Hudcova et al. 2013; Lourenco et al. 2013; Pereira et al. 2008; Pereira et al. 2006) and these effects can persist for several decades (Lozano et al. 2000). This phenomenon impacts all environmental compartments surrounding former mining sites, via contamination of extractive wastes, sludge from pond treatments, sediments, surface water and groundwater (Hudcova et al. 2013; Pereira et al. 2008). Other trace metals (e.g., iron, manganese, copper, cadmium, and zinc) are also found in former uranium mining areas, either due to their natural presence or to extraction and effluent treatment processes (Pereira et al. 2008). For example, barium chloride and sulfate can be used to bind and precipitate radium (a decay product from uranium) from uranium mining effluents (Hudcova et al. 2013). Aluminum sulfate also can be used to precipitate iron and to increase uranium mobility (Cazala et al. 2008; Herlory et al. 2013). These chemicals pollute water used to fill underground and opencast mines. In addition, contaminated soils have a low retention capacity, which contributes to a higher metal concentration in surrounding water (Clevenger 1990). Contamination of hydrosystems, which are the final destination of trace metals from uranium mining sites, can negatively impact aquatic organisms (Fleeger et al. 2003). Thus, it is necessary to assess the aquatic environmental risk posed by metal discharge from uranium mining sites. In France, extraction of uranium took place during the second half of the twentieth century. More than half of the 373 former uranium mining sites were located in the Limousin and Auvergne regions (IRSN 2007). In these regions, the Saint-Pierre (Cantal, Auvergne, France) and Pontabrier (Haute-Vienne, Limousin, France) sites, are of particular interest due to their extraction activity (1,330 tons of uranium extracted and 600,000 tons of wastes and tailings for the Saint-Pierre site; 9,336 tons of uranium extracted and 450,000 tons of wastes and tailings for the Pontabrier site) (IRSN 2007) and due to the presence of numerous ponds in surrounding areas.

Active and passive biomonitoring can be used to assess the effects of one or more xenobiotics on organism health, which is necessary to environmental risk assessment. In order to work on

the same fish species between ponds and to have a sufficient number at each sampling time, active biomonitoring was used in this study, by using fish caging. Caging presents many advantages (see Oikari, 2006): the control of exposure (location, time) and the selection and characterization of the species used (genetic origin, age, height, weight, sex). For these experiments, a sentinel species, the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) was used. Indeed, many authors highlighted its use as a model species for laboratory (Andersson et al. 2007; Katsiadaki 2006) and field (Pottinger et al. 2002; Sanchez et al. 2007) toxicity studies. Moreover, this fish presents many advantages concerning caging, such as their social behaviour, diversified diet and robustness for handling and transport (Hart and Gill 1994; Pottinger et al. 2002).

The literature is in agreement with the fact that evaluating one response in an organism submitted to pollution is not sufficient to reflect the state of this environmental contamination, thus it is preferable to use a multi-biomarker approach (Amiard and Amiard Triquet 2008; Galloway et al. 2004). Several studies have reported that a metallic exposure can be assessed with specific biomarkers, such as oxidative stress biomarkers or metallothioneins (MT). Indeed, many authors demonstrated that metals, through the production of reactive oxygen species (ROS), can induce or reduce the antioxidant system via total glutathione (GSH), catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) (Maria et al. 2009; Sanchez et al. 2005). As a consequence of oxidative stress, ROS can alter lipid, protein and nucleic acid (Favier 2003; Lee and Steinert 2003; Lushchak 2011; Michiels et al. 1994). Metals are also known to be genotoxic inducers, directly, or indirectly by the overproduction of ROS accompanying metal detoxification (Barillet et al. 2005; Lourenco et al. 2013). They can induce other answers of the organism, such as MT production (Amiard et al. 2006; Roesijadi 1996). MT have a particular affinity for some metals and their roles are to bind and sequester metals (Amiard et al. 2006; Roesijadi 1996).

Nonetheless, the polymetallic contamination linked to former uranium mines is complex, and interaction between metals can impair other biological functions and structures, which can be assessed with generalist biomarkers. Indeed, a polymetallic exposure can alter many essential functions of fish including the immune system, synaptic transmissions, and histology (Dunier 1996; Fernandez-Davila et al. 2012; Kelly and Janz 2009). Among these generalist biomarkers, changes in innate immunity can take place before other physiological changes occur (Bols et al. 2001). The immune system, which plays a fundamental role in organism integrity and defense against pollutants, was shown to be impacted by this type of

contamination (Gagnaire et al. 2015). Immunotoxicity may affect the fitness of organisms, also affect the population and therefore impact the ecosystem (Bols et al. 2001). That is why this type of biomarker is increasingly used in ecotoxicological studies (Bado-Nilles et al. 2011; Gagnaire et al. 2015). In another way, malfunction of the AChE enzyme can lead to neurotoxicity, resulting in disruption of some biological functions and can also affect the behavior of organisms (Fernandez-Davila et al. 2012; Oliva et al. 2012b). Metals can also impact the kidney structure, essential organ for fish to purify the blood and to regulate the water content of organs, and in particular uranium known to be nephro-toxic (Cooley et al. 2000; Lukin et al. 2011). Therefore, metals can impact a large number of structures and functions and can cause numerous responses of organism.

The aims of this study were to validate the use of several biomarkers in the biomonitoring of metal-contaminated sites and to contribute to the environmental risk assessment of former uranium mines. Three ponds in each selected department (Cantal and Haute-Vienne) were chosen: one pond receiving uranium tailings and two without these tailings. Three-spined sticklebacks were caged in these six ponds for 28 days. Biomarkers were analysed 14 and 28 days after caging experiment began. In addition, metal contamination (metal concentration in water and bioaccumulation) were analysed.

2. Materials and methods

2.1. Study sites

A total of six ponds were chosen, according to their level of metal contamination and their proximity to uranium mining site in two French departments: Cantal and Haute-Vienne. For each department, one pond received uranium tailings from mines and two other ponds without these tailings. In the Haute-Vienne department, the Pontabrier pond (46°00'05''N, 1°16'52''E) receives wastes and residues from two former uranium mines, and two other ponds, the Malessard (45°59'48''N, 1°23'30''E) and the Jonchère-Saint-Maurice (45°59'44''N, 1°28'25''E), which do not receive wastes and residues from former uranium mine (Figure 1). In the Cantal department, the Saint-Pierre pond receives tailings from one former mine (45°23'07''N, 2°22'59''E), and the Madic (45°22'20''N, 2°27'33''E) and the Etang Noir (45°28'00''N, 2°23'24''E) ponds, with no uranium tailings, were also selected (Figure 1). Because of mine tailings and metallic concentrations (Cf. part 3.1.1.) the Pontabrier and Saint-Pierre ponds were therefore considered as contaminated ponds, while the

Malessard, the Jonchère-Saint-Maurice, the Madic and the Etang Noir ponds were considered as reference ponds.

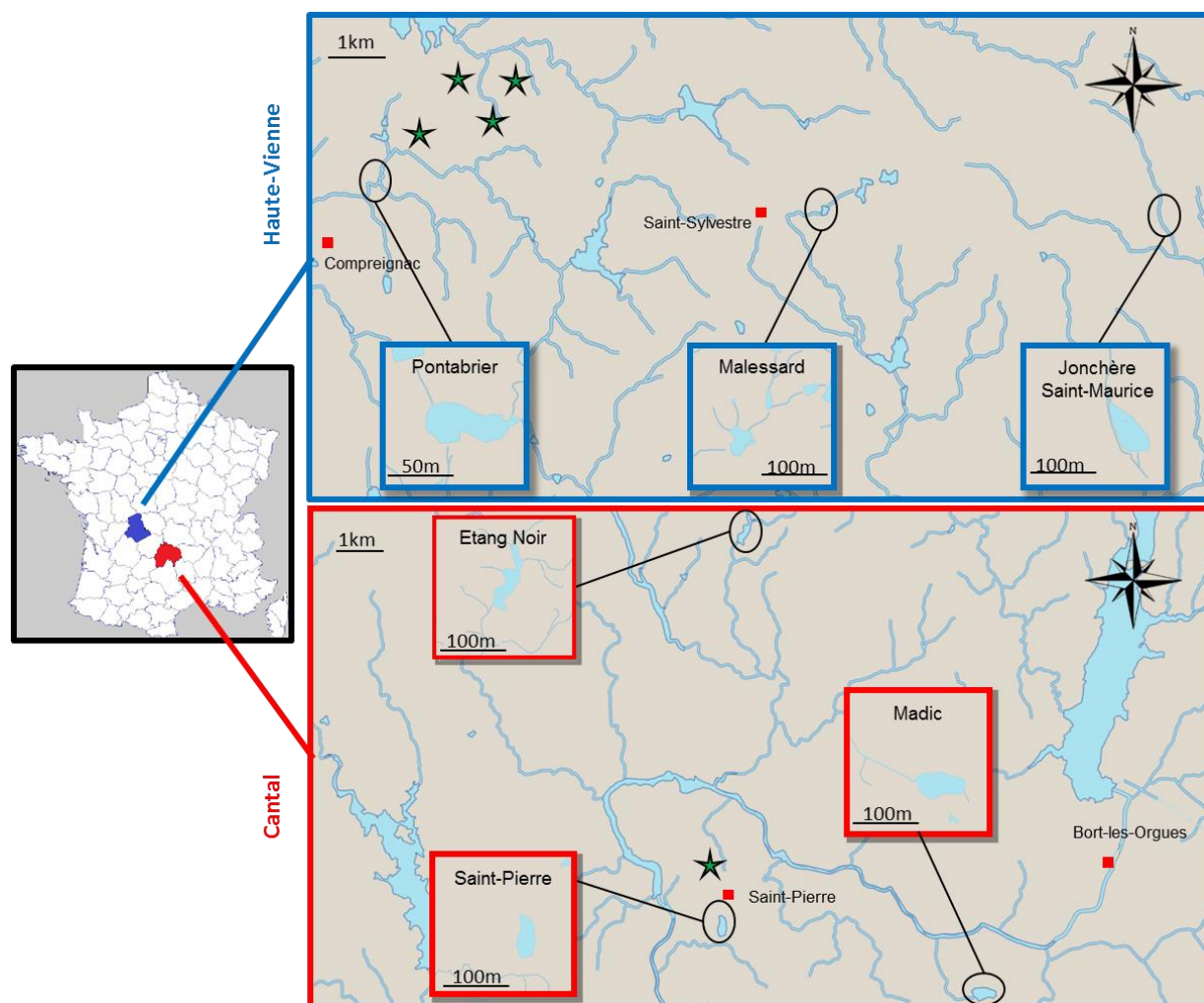


Fig. 1: Map of major watercourses and ponds in the Haute-Vienne (blue) and Cantal (red) departments. Green stars indicate the localization of discharges coming from mining sites in the Pontabrier and Saint-Pierre ponds. The figure also shows close-ups of the three ponds per department used in this study.

2.2 Stickleback exposure by caging

In the laboratory, 360 one-year-old three-spined sticklebacks (5.24 ± 0.32 cm; 1.71 ± 0.37 g; INERIS husbandry) were acclimated to the physical and chemical conditions of the water of the mining sites for two weeks (temperature: 10 °C; pH: 7; conductivity: 50 μ S/cm). Fish were then transported to the six ponds, prior to be engaged (30 fish/cage; 2 cages/pond). In the Cantal department, caging started from the 27th of Mars and finished the 24th of April, while that of the Haute-Vienne department started the 3rd of April and ended the 1st of May 2013. The cage mesh was 3.5 mm x 3.5 mm which allowed water and particle flows and prevented

fish from escaping (cage dimensions: height: 460 mm; radius: 125 mm; volume: 22.5 L; fish density: 1.33 fish/L). Cages were placed directly on the sediment at a water depth of 50 cm. Sticklebacks received no supplementary food intake throughout the experiment. After 14 and 28 days (D14 and D28), 15 sticklebacks from each pond were sacrificed by cervical dislocation. Blood and spleens from each fish were recovered and kept at 4 °C for immune response and genotoxicity analyses respectively. Liver was extracted, weighed, cut into two parts, frozen in liquid nitrogen, stored in freezer at -80 °C and used for oxidative stress and MT analyses. Muscles, used to quantify acetylcholinesterase (AChE) activity, were also frozen in liquid nitrogen before being stored in freezer at -80 °C. Posterior kidney was placed in formalin until histological analysis and digestive tract was kept in ethanol (70 %) before stomach content evaluation. At D28, 10 additional fish per pond were sacrificed to assess metal bioaccumulation in liver, spleen, and muscle.

2.3. Physical and chemical analyses

2.3.1 Physical and chemical characterisation of water

Temperature, pH and conductivity were measured at the beginning of the experiment and at D14 and D28. Trace metal concentrations in water (50 mL of acidified water (HNO₃, 2 %, VWR, Radnor, PA, USA), non-filtered and filtered with 0.45 µm syringe filter, three replicates) were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent Model 7500 Cs, Santa Clara, CA, USA; detection limit: 10 ng/L for all metals) and major cation concentrations by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). Major anions were measured in 50 mL of non-filtered acidified water (HNO₃, 2%) using an ionic chromatograph (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA). Total inorganic carbon (TIC) and total organic carbon (TOC) were assessed using a TOC analyzer (Schimadzu 5000A, Schimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA).

2.3.2 Bioaccumulation of metal in organisms

To validate polymetallic effects, it was necessary to evaluate the bioaccumulation of metals in fish organs. Livers, spleens and muscles were placed in pre-weighed cups in glass containers. In the laboratory, these samples were stored in an oven at 60 °C for 1 week. The dried samples were weighed before being mineralized. The mineralization process involved digestion of these organs by several cycles of nitric acid (HNO₃, 3mL, 65 %) and hydrogen

peroxide (H₂O₂, 2 mL, 30 %, Sigma) at 100 °C until complete solubilization occurred. After evaporation, 3 mL of acidified water (HNO₃, 2 %) were added and metal concentrations were measured using the ICP-MS.

2.4. Biological analyses

2.4.1. Biometric data

Fulton's K condition index (K) evaluates the general well-being of fish and is calculated by the formula: $K = (\text{Weight}/\text{Length}^3) \times 100$. The hepato-somatic index (HSI) is calculated by the formula: $\text{HSI} = (\text{liver weight}/\text{total body weight}) \times 100$.

2.4.2. Stomach contents

Digestive tracts were removed from fish bodies and stored in ethanol (70 %, VWR). In the laboratory, digestive tract contents were recovered and dried in an oven for 48 h at 50 °C. Dried contents were then weighed with a precision balance (Sartorius SE2, Bradford, United Kingdom). This analysis was used to determine if, without food supply and after 28 days of caging, sticklebacks could eat in all ponds.

2.4.3. Immune capacities

Concerning the immunomarkers, splenic leucocyte isolation was made following some protocols (Bado-Nilles et al. 2013; Gagnaire et al. 2015) with some modifications. Briefly, spleens were pressed through sterilized nylon mesh (40 µm, Becton Dickinson, NJ, USA) with Leibovitz 15 medium (L15, Sigma, St. Louis, MO, USA) modified with heparin lithium (10 U/mL, Sigma), penicillin (500 U/mL, Sigma), and streptomycin (500 µg/mL, Sigma). The leucocyte suspension obtained was stored at 4 °C for 18 hours prior to flow cytometry analysis (Guava®EasyCyte™ 8HT, Merck Millipore, Billerica, MA, USA). Afterwards, the leucocyte suspension was adjusted at 5×10^5 cells/mL with a Malassez haemocytometer (W. Schreck, Hofheim / TS, Germany). All flow cytometer analyses were performed using 96 well microplates containing 200 µL of leucocyte suspension in each well. Lymphocyte percentage among leucocytes (Ly) was recorded using size and complexity parameters (Bado-Nilles et al. 2011). Percentage of dead cells (Mo) was assessed using incubation with propidium iodide (PI, 1 µL, 1.5 mM, 5 min at 4 °C in the dark, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). PI permeates only through the membrane of dead cells and then stains nucleic acids. Dead cell fluorescence was measured using the FL3 parameter (red fluorescence) and the related

percentage of dead cells was recorded. Diluted solutions (5×10^4 cells/mL) were incubated with fluorescent latex microbeads in order to quantify phagocytosis activity (Fluospheres®, carboxylate-modified microspheres, 1 μm , yellow-green fluorescent (505/515), Life Technologies). Incubation lasted 1 h and was conducted in the dark at room temperature with a 40:1 beads:leucocyte ratio. The fluorescence of phagocytic cells was assessed using the FL1 parameter (green fluorescence). Phagocytic capacity (i.e. phagocytosis percentage) was calculated as cells ingesting at least 3 fluorescent microbeads/cells ingesting at least 1 fluorescent microbead $\times 100$ (Gust et al. 2013). Lysosomal membrane integrity (LMI) was evaluated using acridine orange (AO, Sigma) (Bado-Nilles et al. 2013). Leucocytes were incubated for 20 min in the dark, at room temperature, with 10 μM of AO and fluorescence was measured using the FL3 parameter (red fluorescence). Oxidation of the probe 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (H_2DCFDA , Sigma) was used to detect basal intracellular ROS formation (Chilmonczyk and Monge 1999). The leucocyte suspension was incubated for 30 min, at room temperature in the dark with 60 μM of H_2DCFDA . The resulting fluorescence was measured using the FL1 parameter (green fluorescence) and corresponds to the basal oxidative activity. Except for phagocytosis (5,000 events), leucocyte activities were evaluated by flow cytometry with 10,000 events counted for each suspension sample. Data were analysed using Guavasoft 2.6 software.

2.4.4. DNA damage

The comet assay protocol described by Santos et al. (2013), with minor modifications, was used to evaluate the genotoxicity of metal contamination on fish blood. Briefly, blood samples were kept at 4 °C in 800 μL of L15 buffer solution modified with heparin lithium (20 U/mL), penicillin (500 U/mL) and streptomycin (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) until analysis (48 h after blood collection). Microscope slides were covered with normal melting agarose (1 %, Sigma) and dried overnight at room temperature. Two slides were made for each sample. Viability of 100 erythrocytes from each sample was assessed using the Trypan blue (Sigma) exclusion test and the comet assay was performed when erythrocyte viability was > 90 %. The erythrocyte suspension was adjusted to 1.37×10^6 erythrocytes/mL. This suspension was equally mixed with low melting agarose (LMA, 1 %, Sigma), applied to the slides, and covered with a coverslip. After cooling on ice and removing the coverslip, a new layer of LMA (0.5 %) was added, frozen, and covered with a coverslip. All subsequent steps were performed in the dark or with a lamp emitting red light to prevent DNA damage. Slides were placed in a lysis

solution for 1 h at 9 °C (2.5 M NaCl (Merck), 100 mM EDTA (Sigma), 10 mM Tris-HCl (Sigma), 10 % DMSO (Sigma), and 1 % Triton-X100 (Sigma)). Slides were transposed for 20 min in an electrophoresis tank filled with electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, qsp 1.5 L of osmotic water, Sigma). Electrophoresis was run for 24 min (300 mA, 20 V, 5 W). After electrophoresis, slides were washed three times with a neutralization buffer (400 mM Tris-HCl, pH 7.5). Slides were kept in absolute ethanol until analysis under an epifluorescence microscope. For this analysis, 0.02% ethidium bromide solution was used to stain the DNA contained in the sample on the slide and several parameters of genotoxicity were assessed using Comet Assay 4 software. One hundred cells per slide were randomly selected for analysis.

2.4.5. Oxidative stress

The half of each liver (\approx 50 mg) was homogenized by grinding (6,000 rpm, 2 x 10 s, Precellys 24, Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France) in 800 μ L of potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) modified with glycerol (20 %, Sigma) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 2 μ M, Sigma) in order to inhibit proteolysis. Suspensions were centrifuged (10,000 g, 15 min, 4 °C), and the supernatant of each sample (post-mitochondrial fraction) was placed in a 1mL microtube for biochemical analysis. Protein concentration was assessed using the Bradford (1976) method with bovine serum albumin (Sigma for the two products). Hepatic biomarkers, such as total glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (Gr), CAT, SOD, and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), were measured, respectively, according to methods of Vandeputte et al. (1994), Paglia and Valentine (1967), Carlberg and Mannervik (1975), Babo and Vasseur (1992), Paoletti et al. (1986), and Ohkawa et al. (1979). All of these measurements were adapted to the stickleback by Sanchez et al. (2005, 2007). Except for TBARS and GSH (mol/g of total protein), all results are expressed as U/g of total protein.

2.4.6. Neurotoxicity

Suspensions of muscle samples (\approx 30 mg) were prepared in the same manner as liver suspensions except for a total volume of 800 μ L of modified potassium phosphate buffer (glycerol (20 %) and PMSF (2 μ M)). Neurotoxicity was assessed by measuring the AChE activity in muscle following the method of Ellman et al. (1961), adapted to the stickleback by Sanchez et al. (2008a). AChE activities are expressed as U/g of total protein.

Table 1: Physical and chemical characteristics of ponds from Cantal and Haute-Vienne departments. Data are means ± standard deviation ($n = 3$ for metals concentration; $n = 2$ for anions / cations; $n = 1$ for temperature, conductivity and pH). For each department and each sampling time, difference between ponds was indicated by different letters for $p < 0.05$ with $a > b > c$. **Bolded** means at D28 showed a significant difference with D14 values at the same conditions. DL: detection limit; PNEC: Predicted No-Effect Concentration; C inorg: total inorganic carbon; C org: total organic carbon. Cr, Pb, Zn, Cu, Ni and Co concentrations were under the detection limit and not mentioned in this table.

		Cantal									PNEC
		D14			D28						
		Contaminated pond	Reference ponds		Contaminated pond	Reference ponds					
		Saint-Pierre	Madic	Etang Noir	Saint-Pierre	Madic	Etang Noir				
Physical parameters	pH	7.62	7.52	7.77	7.12	7.30	8.32				
	T (°C)	7.40	7.30	7.50	12.60	10.90	11.70				
	C (µS/cm)	103.00	68.00	44.00	125.00	78.00	39.00				
Metal concentrations	U (ng/L)	5,951.40 ± 72.86 a	88.10 ± 102 b	164.50 ± 29.75 b	7,489.90 ± 132.30 a	27.50 ± 2.60 b	137.40 ± 36.32 b	300.00			
	Al (µg/L)	44.10 ± 100 b	137.00 ± 3.93 a	202.20 ± 147.89 ab	25.90 ± 0.90 a	18.40 ± 3.17 a	209.80 ± 170.83 a	0.06			
	Fe (µg/L)	165.70 ± 14.98 b	466.40 ± 26.01 a	295.00 ± 112.38 ab	46.10 ± 1.67 b	196.90 ± 20.58 a	283.40 ± 127.17 ab	16.00			
	Ba (µg/L)	16.50 ± 0.25 c	40.50 ± 100 a	21.20 ± 0.56 b	9.20 ± 0.15 c	12.60 ± 0.41 b	20.40 ± 1.09 a	60.00			
	Mn (µg/L)	218.10 ± 3.85 a	44.30 ± 158 b	28.70 ± 8.68 b	296.70 ± 0.97 a	32.00 ± 1.78 b	11.80 ± 8.22 b	15.00			
Anionic concentrations	Mg (mg/L)	3.63 ± 0.04	3.80 ± 0.03	112 ± 0.02	3.89 ± 0.02	3.96 ± 0.13	1.15 ± 0.04				
	Ca (mg/L)	12.52 ± 0.00	7.32 ± 0.00	3.61 ± 0.00	13.55 ± 0.00	6.96 ± 0.01	3.71 ± 0.00				
	Na (mg/L)	4.56 ± 0.13	5.22 ± 0.06	4.86 ± 0.03	4.76 ± 0.05	4.78 ± 0.25	5.06 ± 0.02				
	K (mg/L)	1.78 ± 0.00	3.35 ± 0.00	1.36 ± 0.00	2.03 ± 0.00	1.53 ± 0.01	1.36 ± 0.00				
	Cl (mg/L)	1.70 ± 0.29	6.08 ± 4.09	13.76 ± 1.17	5.53 ± 3.43	6.54 ± 3.04	0.67 ± 0.22				
	NO ₃ (mg/L)	0.83 ± 0.28	4.66 ± 3.83	10.86 ± 1.04	3.90 ± 3.11	4.25 ± 1.95	0.36 ± 0.10				
	SO ₄ (mg/L)	16.05 ± 0.53	5.40 ± 3.01	9.79 ± 0.69	23.07 ± 7.41	5.40 ± 2.21	1.24 ± 0.18				
	PO ₄ (mg/L)	0.14 ± 0.00	0.14 ± 0.01	0.22 ± 0.09	0.05 ± 0.00	<DL	<DL				
	C inorg (mg/L)	2.21 ± 0.36	4.77 ± 0.85	1.25 ± 0.43	2.63 ± 0.55	5.54 ± 0.30	1.86 ± 0.13				
	C org (mg/L)	4.01 ± 0.54	9.48 ± 1.91	3.61 ± 0.96	4.95 ± 0.69	1.97 ± 0.24	4.85 ± 0.22				
		Haute-Vienne									PNEC
		D14			D28						
		Contaminated pond	Reference ponds		Contaminated pond	Reference ponds					
		Pontabrier	Malessard	Jonchère-Saint-Maurice	Pontabrier	Malessard	Jonchère-Saint-Maurice				
Physical parameters	pH	7.09	6.65	8.08	7.31	7.68	7.80				
	T (°C)	14.20	14.00	17.30	11.30	11.10	12.60				
	C (µS/cm)	62.00	23.00	48.00	58.00	23.00	46.00				
Metal concentrations	U (ng/L)	23,534.30 ± 911.23 a	290.60 ± 6.65 b	56.30 ± 4.55 c	22,967.00 ± 894.43 a	205.60 ± 6.22 b	53.10 ± 1.83 c	300.00			
	Al (µg/L)	82.70 ± 4.66 a	44.90 ± 6.34 b	48.70 ± 8.18 b	73.30 ± 0.72 a	29.20 ± 0.43 c	35.10 ± 1.20 b	0.06			
	Fe (µg/L)	263.60 ± 8.39 b	82.00 ± 0.94 c	396.60 ± 11.74 a	314.50 ± 10.30 b	111.20 ± 0.92 c	422.40 ± 6.35 a	16.00			
	Ba (µg/L)	18.50 ± 0.41 b	6.40 ± 0.08 c	22.10 ± 0.15 a	16.60 ± 0.28 b	5.90 ± 0.14 c	22.00 ± 0.48 a	60.00			
	Mn (µg/L)	52.20 ± 0.90 a	16.10 ± 0.12 c	27.10 ± 1.27 b	42.50 ± 0.15 a	10.90 ± 0.27 c	25.30 ± 0.38 b	15.00			
Anionic concentrations	Mg (mg/L)	1.15 ± 0.00	0.47 ± 0.01	1.51 ± 0.01	1.12 ± 0.00	0.48 ± 0.00	1.64 ± 0.01				
	Ca (mg/L)	5.21 ± 0.00	2.18 ± 0.00	3.21 ± 0.00	4.89 ± 0.00	2.09 ± 0.00	3.46 ± 0.00				
	Na (mg/L)	6.04 ± 0.03	3.46 ± 0.02	4.41 ± 0.02	6.28 ± 0.01	3.52 ± 0.01	4.47 ± 0.02				
	K (mg/L)	1.42 ± 0.00	0.84 ± 0.00	2.17 ± 0.00	1.24 ± 0.00	0.70 ± 0.00	2.21 ± 0.00				
	Cl (mg/L)	19.94 ± 8.54	4.16 ± 2.48	3.66 ± 0.94	4.36 ± 3.03	2.99 ± 2.04	1.31 ± 0.16				
	NO ₃ (mg/L)	11.92 ± 0.00	3.25 ± 0.00	1.08 ± 0.25	2.18 ± 1.91	1.35 ± 1.19	0.29 ± 0.02				
	SO ₄ (mg/L)	19.24 ± 8.37	2.69 ± 1.20	2.39 ± 0.38	3.88 ± 1.85	1.78 ± 1.00	0.95 ± 0.08				
	PO ₄ (mg/L)	0.13 ± 0.02	0.09 ± 0.00	0.08 ± 0.01	<DL	<DL	<DL				
	C inorg (mg/L)	0.71 ± 0.34	0.62 ± 0.00	1.88 ± 0.06	0.96 ± 0.07	0.58 ± 0.25	2.42 ± 0.18				
	C org (mg/L)	2.28 ± 0.05	1.88 ± 0.00	2.81 ± 0.15	3.17 ± 0.45	1.62 ± 0.31	3.26 ± 0.11				

2.4.7. Metallothionein quantification

The other half of liver of each fish (≈ 50 mg) was homogenized (40 s, 30 Hz, MM400, Retsch, Düsseldorf, Germany) in a buffer composed of Tris-HCl (25 mM) and β -mercaptoethanol (5 mM, Sigma), pH 7.2, with a liver:buffer ratio of 100 mg:400 μ L. The suspensions were centrifuged (10,000 g, 10 min, 4 °C), the supernatant was recovered, and its volume was recorded. Samples were placed in a water bath (80 °C, 15 min) before being immersed in ice for 15 min. The samples were centrifuged again (10,000 g, 10 min, 4 °C), and the supernatant was used to measure MT concentrations by polarography. For this purpose, the electrolyte Bridka (250 times the supernatant volume; cobalt hexamine (0.16 g/L, Sigma), NH_4Cl (53.5 g/L, Sigma), NH_4OH (28 %, 68 mL/L, Sigma)) and triton X100 (0.25 mM) were added, followed by degassing for 2 min with nitrogen to remove oxygen. Samples were then subjected to a potential difference (-1.45 to -1.7 V) and the current created by the oxidation of the thiol-cobalt complex at the mercury electrode was measured. Results were compared with those obtained using the standard MT (50 μ g/mL, rabbit MT, Sigma). The results are expressed as mg MT/g fresh liver.

2.4.8. Macrophage aggregates in posterior kidney

The posterior half of each stickleback was stored in formalin (VWR) prior to histological analysis. Posterior kidneys were removed from fish bodies and embedded in paraffin. After being sectioned with a microtome (RM2245, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), kidney sections (5 μ m) were glued on slides and were stained with Perls (potassium ferrocyanide (2 %, Sigma), HCl (2 %), mix: 50/50) stain and Nuclear Fast Red (VWR) and examined under a Zeiss Axioimager z1 light microscope (Zeiss GmbH, Göttingen, Germany). Only macrophage aggregates were counted (Lukin et al. 2011). Nuclei were stained pink and macrophage aggregates were stained brown. Presence/absence of macrophage aggregates were recorded for 15 sections of the posterior kidney from each fish.

2.5. Statistical analyses

R software (3.0.1 version) was used for all statistical analyses. Data were obtained for each pond and each sampling time from $n = 15$ ($n = 10$ for metal bioaccumulation analyses). Prior to statistical analyses, normality and homogeneity of variances were tested using the Shapiro-Wilk and Fisher tests, respectively ($\alpha = 5$ %). If normality and homoscedasticity were respected, a two-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey test were

performed, otherwise, ANOVA was replaced by a Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney test ($\alpha = 5\%$). To evaluate the correlation between ponds, sampling times, bioaccumulation values and biomarkers, principal component analyses (PCA) were performed, and the significance of the correlation was tested by the Pearson test ($\alpha = 5\%$). PCA were produced with reduced-centered values (with the standard deviation) from all biomarkers analysed, except MT (lack of data in the Etang Noir pond) and stomach contents. The number of selected dimensions is 2.

3. Results

3.1. Physical and chemical analyses

3.1.1 Physical and chemical characterisation of water

Only metals mainly present in the water-dissolved fraction ($> 10\mu\text{g/L}$, except for uranium) and exceeding their predicted no-effect concentrations (PNEC), are listed in Table 1 (PNEC: iron (Fe) (GRNC 2002); aluminum (Al) (INERIS 2005); manganese (Mn) (UE 2007); barium (Ba) (INERIS 2008a); uranium (U) (INERIS 2008b)). Therefore, chromium, lead, zinc, copper, nickel and cobalt are not mentioned in the rest of the study.

Contaminated ponds (the Pontabrier and Saint-Pierre ponds) were defined as receiving mine tailings and characterized by high levels of uranium, manganese, and aluminum in the Haute-Vienne department compared to the reference ponds. Indeed, in the Cantal department, the Saint-Pierre pond presented high concentrations of dissolved uranium ($\approx 6\ \mu\text{g/L}$) and manganese ($\approx 250\ \mu\text{g/L}$) compared to reference ponds in this department (Table 1). The other metals were notably quantified in the reference ponds (aluminum, barium and iron, table 1). Differences of metal concentrations between ponds were more pronounced in the Haute-Vienne department. Polymetallic contamination was higher in the Pontabrier pond than in the reference ponds, with high concentrations of uranium ($\approx 23\ \mu\text{g}$), aluminum ($\approx 80\ \mu\text{g}$) and manganese ($\approx 45\ \mu\text{g}$) (Table 1). Barium and iron were, however, more concentrated in the Jonchère-Saint-Maurice pond.

Concerning physical parameters, values in the both departments were quite similar between contaminated and reference ponds, but water temperature had almost doubled from D14 to D28 ($\Delta \approx + 4.4\ ^\circ\text{C}$) in the Cantal department while it decreased in ponds from the Haute-Vienne department ($\Delta \approx - 3.5\ ^\circ\text{C}$) (Table 1). Nonetheless this parameter was always higher in the Jonchère-Saint-Maurice pond compared to the other two ponds, whereas conductivity was higher in the Pontabrier pond (Table 1).

Except for sodium and phosphate, anion and cation values were highly dependent to the station in the Cantal department. For example, magnesium concentrations were similar between the Saint-Pierre and Madic ponds whereas the concentration was lower in the Etang Noir pond. To the opposite, higher values of chloride and nitrate were shown in the Etang Noir pond compared to the Madic and Saint-Pierre ponds (Table 1). In the other department, the anions and cations, chloride (Cl^-), sulfate (SO_4^{2-}), sodium (Na^+), and calcium (Ca^{2+}) were present at higher concentrations in the Pontabrier pond than in the two other ponds. All cation and anion concentrations decreased between D14 and D28 in ponds from the Haute-Vienne department.

Despite these differences, the waters of different ponds belong to the same class (freshwater) and therefore remain comparable.

3.1.2. Bioaccumulation of metal in organisms

Uranium and manganese were significantly more accumulated in spleen, liver and muscle tissue from fish caged in the contaminated (the Pontabrier and Saint-Pierre ponds) compared to the ponds without mine tailings, except for the bioaccumulation of manganese in fish spleen from the Haute-Vienne department (Table 2). In the Haute-Vienne department, in addition to these metals, aluminum was significantly more accumulated in fish caged in the Pontabrier pond compared to the Malessard and Jonchère-Saint-Maurice ponds, except in liver (Table 2). Sticklebacks caged in the Malessard pond had significantly less iron in spleen, but this difference was not observed for the two other organs. No significant difference in barium bioaccumulation among ponds was observed. In the Cantal department, iron bioaccumulation was significantly higher in the Etang Noir pond than in the two other ponds, and aluminum bioaccumulation was significantly lower in the Madic pond compared to the Saint-Pierre and Etang Noir ponds. Correlation results evidenced high positive correlations between uranium concentrations in ponds and bioaccumulation in organs (Table 3). For others metals, only aluminum and iron bioaccumulation in spleens of fish caged in the Haute-Vienne department, as well manganese bioaccumulation in liver of sticklebacks caged in the Cantal department, were significantly correlated with metal concentrations in ponds (Table 3). For each metal analysed, bioaccumulation was greater in spleen than in the other organs (muscle or liver). For example, iron bioaccumulation was 16 times higher in spleen than liver and 12 times higher in spleen than muscle for the Saint-Pierre pond (Table 2).

Table 2: Metal bioaccumulation in fish tissues (spleen, liver and muscles) after 28 days of caging in ponds from the Cantal and Haute-Vienne departments ($n = 10$). Values are means \pm standard deviation. For each department, difference between ponds was indicated by different letters, with $a > b > c$ and $p \leq 0.05$.

		Cantal						Haute-Vienne					
		Contaminated pond		References ponds				Contaminated pond		Reference ponds			
		Saint-Pierre		Madic		Etang Noir		Pontabrier		Malesard		Jonchère-Saint-Maurice	
Spleen	Uranium (ng/g)	207.50 \pm 29.95	a	124.49 \pm 52.84	b	87.15 \pm 29.51	b	1638.07 \pm 588.32	a	55.09 \pm 13.33	b	78.99 \pm 52.00	b
	Aluminium (μ g/g)	1257.04 \pm 220.51	a	574.51 \pm 86.92	b	1293.32 \pm 411.87	ab	1234.61 \pm 472.46	ab	299.09 \pm 39.21	b	62147 \pm 11733	a
	Iron (μ g/g)	2,015.03 \pm 486.20	ab	1,583.13 \pm 343.42	b	6,726.55 \pm 3,718.48	a	3,998.05 \pm 485.09	ab	2,157.94 \pm 222.50	b	7,511.50 \pm 2,192.20	a
	Barium (μ g/g)	17.62 \pm 4.18	a	12.74 \pm 1.68	a	18.86 \pm 5.68	a	1195 \pm 7.15	a	167 \pm 0.67	a	4.67 \pm 1.51	a
	Magnanese (μ g/g)	14.28 \pm 5.01	a	11.38 \pm 2.90	a	24.29 \pm 11.27	a	8.14 \pm 2.63	a	2.77 \pm 0.76	a	64.67 \pm 29.34	a
Liver	Uranium (ng/g)	44.12 \pm 4.81	a	6.34 \pm 2.72	b	13.62 \pm 8.42	b	378.65 \pm 112.85	a	6.59 \pm 1.09	b	3.49 \pm 0.36	c
	Aluminium (μ g/g)	795.43 \pm 764.82	ab	33.45 \pm 11.96	b	43.06 \pm 7.00	a	27.89 \pm 5.57	a	33.63 \pm 3.85	a	96.02 \pm 63.03	a
	Iron (μ g/g)	120.89 \pm 16.58	a	167.97 \pm 37.43	a	138.69 \pm 18.94	a	480.38 \pm 319.80	a	158.02 \pm 10.18	a	193.63 \pm 22.89	a
	Barium (μ g/g)	0.02 \pm 0.02	b	0.44 \pm 0.26	a	0.26 \pm 0.10	a	0.27 \pm 0.13	a	0.13 \pm 0.06	a	0.09 \pm 0.07	a
	Magnanese (μ g/g)	12.81 \pm 1.72	a	5.28 \pm 1.29	b	5.63 \pm 0.70	b	5.07 \pm 1.62	a	5.53 \pm 0.78	a	1.77 \pm 0.23	b
Muscle	Uranium (ng/g)	103.45 \pm 54.81	a	12.82 \pm 2.59	b	20.97 \pm 4.94	b	710.60 \pm 328.98	a	26.12 \pm 5.67	b	36.94 \pm 22.61	b
	Aluminium (μ g/g)	129.66 \pm 114.5	a	156.76 \pm 41.75	a	161.38 \pm 34.88	a	374.49 \pm 47.05	a	230.21 \pm 36.02	b	386.93 \pm 65.09	ab
	Iron (μ g/g)	166.99 \pm 31.18	b	685.85 \pm 307.57	ab	325.41 \pm 52.28	a	603.41 \pm 74.20	a	1,075.51 \pm 468.19	a	857.34 \pm 148.66	a
	Barium (μ g/g)	189 \pm 0.48	a	3.60 \pm 0.69	a	2.24 \pm 0.47	a	148 \pm 0.60	a	5.30 \pm 3.09	a	2.68 \pm 0.97	a
	Magnanese (μ g/g)	8.41 \pm 3.22	a	7.11 \pm 1.41	a	7.04 \pm 1.18	a	5.84 \pm 0.99	ab	7.54 \pm 0.97	a	4.72 \pm 0.67	b

Table 3: Correlations between metal concentrations in ponds and bioaccumulation in stickleback organs. **Bolded** values correspond to significant correlations (Pearson test, $\alpha = 5\%$, $n = 10$).

		Cantal					Haute-Vienne				
		Uranium	Aluminum	Manganese	Iron	Barium	Uranium	Aluminum	Manganese	Iron	Barium
Uranium	Spleen	0.42					0.70				
	Liver	0.72					0.73				
	Muscle	0.45					0.65				
Aluminum	Spleen		0.18				0.40				
	Liver		-0.16				-0.13				
	Muscle		0.03				0.29				
Manganese	Spleen			-0.13				0.02			
	Liver			0.69				0.04			
	Muscle			0.16				-0.06			
Iron	Spleen				0.34				0.53		
	Liver				0.10				0.09		
	Muscle				0.16				-0.10		
Barium	Spleen					0.08					0.14
	Liver					0.17					-0.04
	Muscle					0.05					-0.28

3.2. Biological analyses

Only two of the 360 sticklebacks died in two different cages (in the Saint-Pierre and Jonchère-Saint-Maurice ponds) after 28 days of exposure.

3.2.1. Biometric data

In the Haute-Vienne department, K was significantly higher for sticklebacks maintained in the Malessard pond after 28 days compared to fish caged in the other ponds (Table 4). In the Cantal department, K was greater 28 days after exposure than 14 days in the Madic pond. HSI did not differ significantly among ponds at each sampling time in the Cantal department but in the Haute-Vienne department, it was significantly lower in the Jonchère-Saint-Maurice pond compared to the Pontabrier and Malessard ponds at D14 (Table 4). These two indices (K and HSI) varied according to sampling time. Indeed, in both departments, HSI values were lower for all studied ponds at D28 compared to D14, except for the Jonchère-Saint-Maurice pond (Table 4). This result was due to a decrease of liver weight between D14 and D28 (data not shown). K decreased between D14 and D28 for sticklebacks caged in the Pontabrier and Jonchère-Saint-Maurice ponds, whereas it increased in the Madic pond (Table 4).

Table 4: Biomarker responses in three-spined sticklebacks caged in ponds from Cantal and Haute-Vienne at D14 and D28. Values are means ± standard deviation (*n* = 15). For each department and each sampling time, difference between ponds was indicated by different letters for *p* < 0.05 with a > b > c. **Bolded** means at D28 showed a significant difference with D14 values at the same conditions. K: condition factor; HSI: hepatosomatic index; Mo: cell mortality; Ly: lymphocyte percentage; Pg: phagocytosis percentage; Oa: basal oxidative activity; LMI: lysosomal membrane integrity; DNA: DNA damages; MT: metallothioneins; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; AChE: acetylcholine esterase; ND: no data; FU: fluorescence unit.

		Cantal											
		D14						D28					
		Contaminated pond		Reference ponds				Contaminated pond		Reference ponds			
		Saint-Pierre		Madic		Etang Noir		Saint-Pierre		Madic		Etang Noir	
Biometric data	K	1.08 ± 0.03	a	0.92 ± 0.03	b	1.02 ± 0.02	a	1.03 ± 0.02	a	1.05 ± 0.03	a	0.96 ± 0.04	a
	HSI	6.11 ± 0.28	a	6.01 ± 0.33	a	6.14 ± 0.27	a	4.48 ± 0.25	a	4.84 ± 0.37	a	4.57 ± 0.46	a
	Sc (%)	0.23 ± 0.01	a	0.19 ± 0.02	a	0.20 ± 0.02	a	0.15 ± 0.01	b	0.22 ± 0.01	a	0.19 ± 0.02	a
Immune capacities	Mo (%)	4.89 ± 0.47	a	5.59 ± 0.50	a	6.59 ± 0.67	a	6.54 ± 0.45	a	6.11 ± 0.33	a	6.12 ± 0.39	a
	Ly (%)	78.17 ± 0.96	b	80.46 ± 0.90	ab	81.52 ± 1.26	a	83.74 ± 0.78	a	83.59 ± 1.43	a	83.48 ± 0.92	a
	Pg (%)	8.81 ± 0.87	ab	10.04 ± 3.31	a	8.09 ± 0.98	b	7.02 ± 0.67	a	7.94 ± 1.13	a	6.65 ± 1.06	a
	Oa (FU)	11.92 ± 0.55	a	9.25 ± 2.57	b	6.81 ± 1.15	b	16.34 ± 0.95	a	14.15 ± 1.26	a	11.47 ± 0.27	b
	LMI(FU)	240.64 ± 10.24	a	213.70 ± 14.10	a	242.94 ± 7.49	a	141.82 ± 8.59	a	140.10 ± 5.91	a	137.28 ± 7.76	a
DNA damage	DNA (%)	11.84 ± 2.39	a	16.86 ± 1.83	a	15.83 ± 2.05	a	12.60 ± 1.39	b	18.22 ± 1.84	a	14.75 ± 1.37	ab
MT	MT (mg/g)	0.39 ± 0.02	a	0.36 ± 0.03	a	ND ± ND		0.64 ± 0.07	a	0.54 ± 0.06	a	0.49 ± 0.04	a
Oxidative stress	Gr (U/g prot)	13.94 ± 1.11	a	10.81 ± 1.99	a	12.67 ± 1.68	a	9.88 ± 0.78	a	6.03 ± 0.77	b	11.03 ± 1.41	a
	GPx (U/g prot)	185.81 ± 29.77	a	140.22 ± 30.56	a	156.72 ± 30.40	a	89.54 ± 16.05	a	96.61 ± 22.64	a	154.48 ± 38.30	a
	GSH (µmol/g prot)	24.66 ± 2.21	a	26.53 ± 1.80	a	24.45 ± 2.25	a	13.44 ± 2.25	b	18.66 ± 1.93	a	12.85 ± 1.31	b
	CAT (U/g prot)	657,797.53 ± 79,133.73	a	715,897.51 ± 110,579.96	a	573,790.01 ± 54,263.96	a	215,601.16 ± 36,547.87	a	380,381.65 ± 72,300.24	a	216,107.50 ± 43,909.92	a
	SOD (U/g prot)	2,418.20 ± 186.52	ab	3,164.98 ± 383.18	a	2,043.81 ± 243.82	b	1,465.74 ± 141.31	b	2,625.92 ± 292.16	a	2,086.63 ± 206.13	a
	TBARS (nmol/g prot)	334.51 ± 27.88	a	390.65 ± 33.91	a	318.11 ± 33.58	a	58.80 ± 6.12	a	22.62 ± 3.76	b	26.51 ± 2.67	b
Neurotoxicity	AChE (U/g prot)	38.78 ± 6.25	a	47.31 ± 7.22	a	32.68 ± 5.21	a	58.34 ± 8.47	a	32.70 ± 5.72	b	45.01 ± 8.34	ab
		Haute-Vienne											
		D14						D28					
		Contaminated pond		Reference ponds				Contaminated pond		Reference ponds			
		Pontabrier		Malessard		Jonchère Saint-Maurice		Pontabrier		Malessard		Jonchère Saint-Maurice	
Biometric data	K	0.91 ± 0.02	a	0.96 ± 0.01	a	0.92 ± 0.02	a	0.93 ± 0.04	b	1.06 ± 0.04	a	0.91 ± 0.02	b
	HSI	5.67 ± 0.28	a	5.97 ± 0.29	a	4.87 ± 0.25	b	4.65 ± 0.51	a	4.90 ± 0.18	a	4.71 ± 0.48	a
	Sc (%)	0.14 ± 0.02	a	0.20 ± 0.02	a	0.15 ± 0.01	a	0.16 ± 0.02	a	0.13 ± 0.01	a	0.17 ± 0.02	a
Immune capacities	Mo (%)	5.48 ± 0.45	a	5.35 ± 0.32	a	4.86 ± 0.23	a	5.01 ± 0.33	a	4.99 ± 0.38	a	6.09 ± 0.51	a
	Ly (%)	80.28 ± 0.80	b	83.11 ± 0.71	a	82.98 ± 0.90	a	81.89 ± 0.66	b	83.93 ± 0.74	a	82.26 ± 0.86	ab
	Pg (%)	8.47 ± 1.02	a	9.00 ± 1.07	a	9.07 ± 0.88	a	8.47 ± 1.96	a	6.28 ± 1.12	b	5.67 ± 1.16	b
	Oa (FU)	4.06 ± 0.19	a	3.35 ± 0.15	b	3.40 ± 0.24	b	4.32 ± 0.24	a	2.72 ± 0.13	b	4.28 ± 0.63	a
	LMI(FU)	115.53 ± 4.14	b	135.57 ± 5.82	a	95.10 ± 5.15	c	63.45 ± 2.30	b	79.91 ± 3.54	a	69.25 ± 3.72	b
DNA damage	DNA (%)	29.80 ± 3.61	a	11.78 ± 1.26	b	13.08 ± 1.19	b	18.44 ± 2.07	a	18.23 ± 2.20	a	15.50 ± 1.70	a
MT	MT (mg/g)	0.54 ± 0.05	a	0.60 ± 0.08	a	0.53 ± 0.06	a	0.50 ± 0.06	a	0.54 ± 0.04	a	0.45 ± 0.05	a
Oxidative stress	Gr (U/g prot)	7.57 ± 0.81	b	10.61 ± 0.89	a	10.23 ± 1.12	ab	9.15 ± 1.14	a	11.35 ± 1.10	a	9.09 ± 0.90	a
	GPx (U/g prot)	115.57 ± 27.12	a	164.25 ± 27.98	a	135.39 ± 28.15	a	132.31 ± 19.45	a	185.18 ± 26.89	a	150.77 ± 30.53	a
	GSH (µmol/g prot)	17.81 ± 1.67	a	18.18 ± 1.96	a	20.26 ± 1.97	a	13.25 ± 0.81	b	16.57 ± 1.22	a	11.73 ± 0.87	b
	CAT (U/g prot)	585,911.34 ± 42,920.04	a	559,037.05 ± 45,770.79	a	461,806.85 ± 77,386.19	a	368,080.01 ± 56,337.67	ab	334,807.96 ± 48,434.77	b	623,396.90 ± 105,365.59	a
	SOD (U/g prot)	2,171.96 ± 317.35	a	1,990.80 ± 161.95	a	1,937.33 ± 206.09	a	2,741.98 ± 342.42	a	2,745.38 ± 198.82	a	2,831.24 ± 209.87	a
	TBARS (nmol/g prot)	188.92 ± 21.47	a	131.21 ± 14.54	b	195.73 ± 24.94	a	568.79 ± 52.22	ab	430.70 ± 46.04	b	619.74 ± 36.87	a
Neurotoxicity	AChE (U/g prot)	35.64 ± 6.60	a	25.51 ± 4.41	a	32.27 ± 4.82	a	55.22 ± 9.94	a	25.23 ± 3.35	b	31.16 ± 3.43	b

3.2.2. Stomach contents

Evaluations of stomach contents showed that, after 28 days of caging, sticklebacks did eat in the six ponds (data not shown). At the dissection time, the percentage of dried stomach contents weight relative to fish weight varied between 0.13% and 0.23%.

3.2.3. Immune capacities

Fish caged in uranium-contaminated ponds had a lower lymphocyte percentage than fish caged in reference ponds (Table 4). This parameter was significantly lower for sticklebacks caged in the Pontabrier pond than for those caged in the Malessard and Jonchère-Saint-Maurice ponds and for those in the Saint-Pierre pond compared to the Etang Noir pond after 14 days of exposure (Table 4). In the same way, basal oxidative activity was higher for fish exposed to higher metal concentrations, in the Haute-Vienne (Pontabrier pond) and Cantal (Saint-Pierre pond) departments, particularly at D14 (Table 4). Phagocytosis percentage varied according to ponds and to sampling times. In the Cantal department, fish caged in the Etang Noir pond had the lowest percentage of phagocytosis 14 days after caging (Table 4). Phagocytosis percentage decreased significantly between sampling times in each pond, except for sticklebacks caged in the Pontabrier pond. In this pond, phagocytosis percentages at D14 and D28 were identical (8.47%), whereas the value decreased by about 20% for Cantal ponds and by about 30% for the other Haute-Vienne ponds. The values were significantly higher for the Pontabrier pond than for all other ponds at D28. However, leucocyte mortality and LMI did not significantly differ among polymetallic contamination (Table 4). LMI did not differ significantly among the Cantal ponds, but was significantly higher in the Malessard pond compared to the other two Haute-Vienne ponds at both sampling times.

Some immunomarkers varied between sampling times. Indeed, basal oxidative activity increased significantly over time in the Cantal ponds, whereas it decreased significantly in the Malessard pond at D28, and LMI decreased over time for all ponds, whereas percentage of lymphocytes was not time-dependent.

3.3.4. DNA damage

In the Haute-Vienne department, sticklebacks caged in the contaminated (Pontabrier) pond had significantly higher levels of DNA damages compared to those caged in the reference ponds at D14, but this difference was no longer visible at D28 (Table 4). In the Cantal

department, fish caged in the Madic pond had more DNA single strand breaks than those caged in the Saint-Pierre and Etang Noir ponds, after 28 days of exposure.

3.2.5. Oxidative stress

In both departments, activities of most antioxidant enzymes and proteins did not differ significantly among ponds. However, in the Haute-Vienne department, Gr activity was significantly lower in the Pontabrier pond at D14 than in the reference ponds (Table 4). At D28, sticklebacks caged in the Malessard pond had higher CAT activity and GSH level compared to the other ponds in Haute-Vienne. In the Cantal department, at D28, fish caged in the Madic pond had higher GSH level and lower Gr activity compared to the sticklebacks caged in the Saint-Pierre and Etang Noir ponds, whereas SOD activity was significantly lower in the Saint-Pierre pond compared to the other two ponds. Antioxidant enzyme activities and protein levels varied between sampling times (Table 4). SOD activity increased in the Malessard and Jonchère-Saint-Maurice ponds between D14 and D28 whereas GSH level and CAT activity decreased significantly between D14 and D28 in the Pontabrier and Jonchère-Saint-Maurice ponds and in the Pontabrier and Malessard ponds respectively. In the Cantal department, all antioxidant activities and protein levels decreased during the experiment for fish caged in the contaminated (Saint-Pierre) pond, and this decrease also occurred in the Madic and Etang Noir ponds for GSH level and CAT activity (Table 4).

In the Haute-Vienne department, TBARS level was significantly lower in the Malessard pond compared to the other ponds at both sampling times. At D28, this parameter was higher in the Saint-Pierre pond compared to the other Cantal ponds (Table 4). The concentration of TBARS varied over time and differed depending on the site: values increased for the Haute-Vienne ponds and decreased for the Cantal ponds over time.

3.2.6. Neurotoxicity

AChE activity did not differ among ponds for both departments at D14, but was significantly higher for sticklebacks caged in uranium-contaminated ponds at D28 (Pontabrier and Saint-Pierre) compared to the other ponds (Table 4). Despite these variations, no significant difference existed between D14 and D28 for all ponds.

Table 5: Correlations between biomarkers and bioaccumulation in stickleback organs. **Bolded** values correspond to significant correlations (Pearson test, $\alpha = 5\%$, $n = 10$). Mo: cell mortality; Ly: lymphocyte percentage; Pg: phagocytosis percentage; Oa: basal oxidative activity; LMI: lysosomal membrane integrity; DNA: DNA damage; HSI: hepato-somatic index; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; AChE: acetylcholine esterase.

		Cantal														
		Mo	Ly	LMI	Oa	Pg	DNA	HSI	Gr	GPx	GSH	CAT	SOD	TBARS	AChE	
Uranium	Spleen	0.25	-0.36	0.08	0.17	0.26	-0.05									
	Liver							-0.21	0.18	-0.24	-0.28	-0.22	-0.58	0.50		
	Muscle														0.27	
Aluminium	Spleen	0.06	-0.10	-0.25	-0.14	-0.22	-0.38									
	Liver							-0.14	0.17	-0.25	-0.06	-0.12	-0.15	0.19		
	Muscle														-0.21	
Manganese	Spleen	0.20	-0.07	-0.13	-0.08	0.03	0.28									
	Liver							-0.14	0.20	-0.22	-0.26	-0.13	-0.52	0.45		
	Muscle														0.08	
Iron	Spleen	0.18	-0.18	0.00	-0.24	0.02	0.32									
	Liver							-0.05	-0.01	-0.08	-0.07	-0.20	0.05	0.00		
	Muscle														-0.17	
Barium	Spleen	0.13	0.06	-0.16	-0.14	-0.12	-0.18									
	Liver							0.08	-0.06	0.02	-0.06	0.09	0.12	-0.33		
	Muscle														-0.44	
		Haute-Vienne														
		Mo	Ly	LMI	Oa	Pg	DNA	HSI	Gr	GPx	GSH	CAT	SOD	TBARS	AChE	
Uranium	Spleen	-0.12	-0.10	-0.32	0.21	0.32	0.18									
	Liver							0.09	-0.02	-0.10	0.00	-0.17	0.07	0.30		
	Muscle														0.20	
Aluminium	Spleen	-0.12	-0.25	-0.21	0.24	0.26	0.36									
	Liver							-0.18	0.07	0.05	-0.15	0.00	-0.03	0.11		
	Muscle														0.15	
Manganese	Spleen	0.38	-0.07	0.05	0.19	-0.33	-0.20									
	Liver							0.00	0.23	0.06	0.35	-0.28	-0.01	-0.05		
	Muscle														0.04	
Iron	Spleen	0.45	-0.29	-0.07	0.30	-0.27	0.06									
	Liver							-0.15	0.05	-0.23	-0.04	-0.12	-0.32	-0.16		
	Muscle														-0.06	
Barium	Spleen	-0.03	-0.21	-0.13	0.14	0.03	0.42									
	Liver							-0.20	0.09	-0.13	0.27	0.00	0.12	0.25		
	Muscle														-0.21	

3.2.7. Metallothionein quantification

No difference in MT content was found among ponds in each department and between sampling time, with the exception of the Saint-Pierre pond, for which the value at D28 was significantly higher than at D14 (Table 4).

3.2.8. Macrophage aggregates in posterior kidney

Only two sticklebacks (one each from the Madic and Etang Noir ponds) contained one macrophage aggregate (data not shown).

3.3. Correlations

PCA performed on responses of fish caged in the Cantal department produced a two-dimensional pattern with 38% of total inertia. Strong contributions for axis 1 (> 10 %) are due to the HSI, LMI, GSH, CAT and TBARS, whereas for axis 2, strong contributions are due to Gr, GPx and SOD (Figure 2). In the Haute-Vienne department, PCA was also made with two dimensions, representing 31 % of the total inertia. Axis 1 is mainly explained (> 10 %) by the phagocytosis capacity, LMI and TBARS, while axis 2 is explained by the leucocyte mortality, the percentage of lymphocytes, DNA damage and GPx (Figure 3). For both the Cantal (Figure 2) and Haute-Vienne (Figures 3) departments, the centers of gravity for the various ponds were close to each other and the circles overlapped (Figures 2A and 3A), whereas the centers of gravity for sampling times were far from each other and the circles generally did not overlap (Figures 2B and 3B). Correlations between metal bioaccumulation and biomarkers are scored on Table 5. In the Haute-Vienne department, leucocyte mortality was significantly and positively correlated with manganese and iron bioaccumulation, while DNA damage was also significantly and positively correlated with aluminum and barium bioaccumulation (Table 5). Phagocytosis percentage significantly decreased when livers of sticklebacks bioaccumulated manganese. Concerning the antioxidant responses, GSH level increased significantly with manganese concentrations in liver (Table 5). In the Cantal department, no significant correlation between metal bioaccumulation in fish spleens and immune capacities was observed. Nevertheless, when uranium and manganese were bioaccumulated in stickleback livers, SOD activity decreased and TBARS increased significantly (Table 5). Finally, AChE activity and barium bioaccumulation in muscle were significantly and negatively correlated (Table 5).

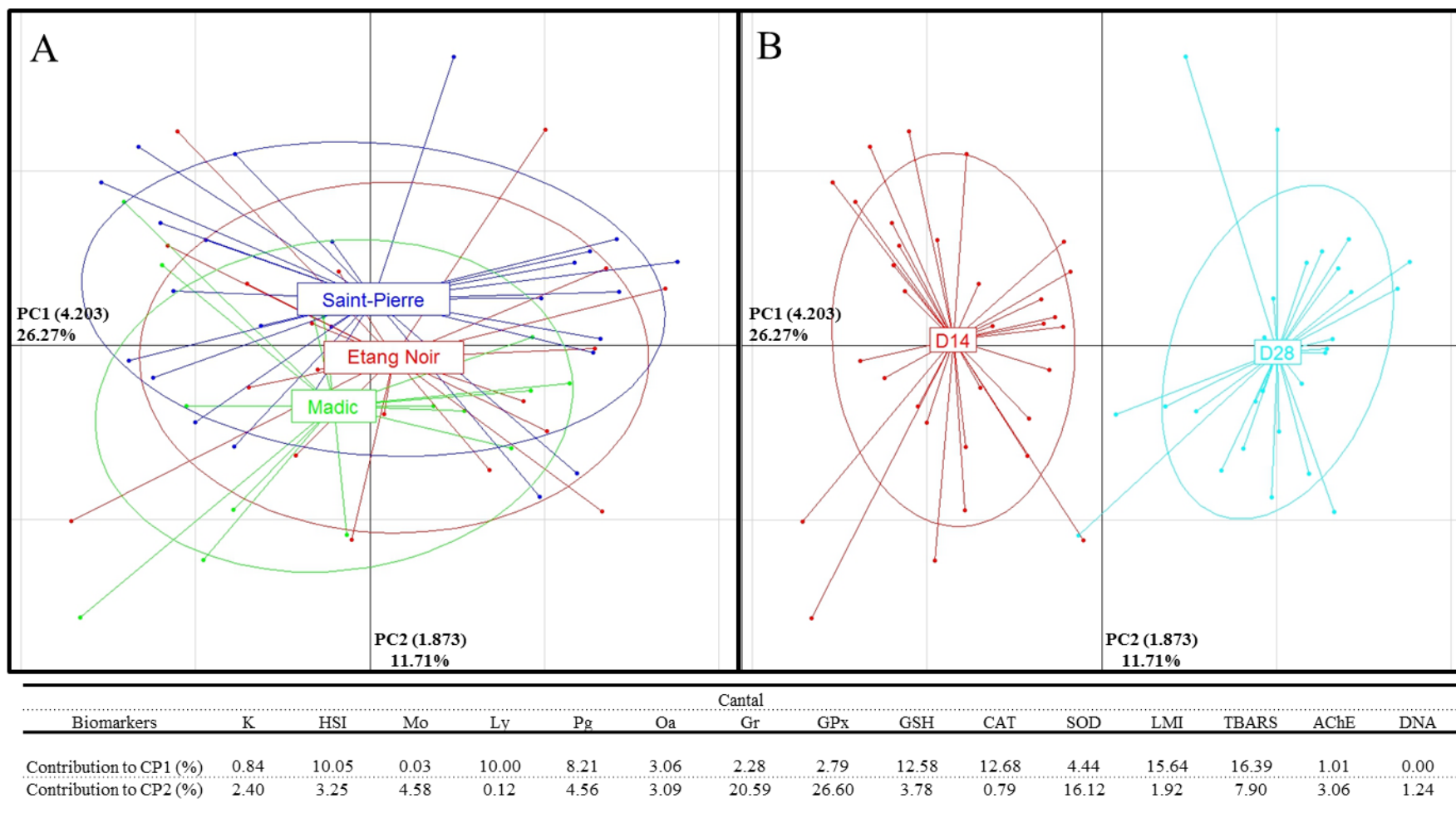


Fig. 2: PCA results obtained in the Cantal department (D14 and D28), representing individuals grouped according to pond or sampling time (illustrative variables). Principal components (CP 1 & CP 2) are constructed from all biomarkers analysed, except MT (lack of data in the Etang Noir pond) and stomach contents. The number of selected dimensions is 2. Values between parentheses are the eigenvalues for each axis, followed by the inertia values. The table below summarizes the contributions to the axes of each variable (percentage). A: results according to pond; B: results according to sampling time. K: condition factor; HSI: hepato-somatic index; Mo: cell mortality; Ly: lymphocyte percentage; Pg: phagocytosis percentage; Oa: basal oxidative activity; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; LMI: lysosomal membrane integrity; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; AChE: acetylcholine esterase; DNA: DNA damage.

4. Discussion

4.1. Polymetallic contamination

In both the Cantal and Haute-Vienne departments, ponds receiving mines tailings (the Pontabrier and Saint-Pierre ponds) had the highest uranium concentrations compared to the reference ponds. The same observation is made for uranium bioaccumulation in the three organs tested (liver, spleen and muscles). These organs have been chosen because of their roles in immunotoxicity, oxidative stress and neurotoxicity. These results illustrate the correlation between uranium concentrations in water and bioaccumulation in these organs. Indeed, these correlations were significant and high (from 0.42 to 0.73). These correlations were higher in the Haute-Vienne ponds than in the Cantal ponds, especially in spleen and muscle. In the Haute-Vienne department, the Pontabrier pond had the highest concentrations of manganese and aluminum, whereas the highest iron and barium concentrations were found in the Jonchère-Saint-Maurice pond. The Malessard pond was the least contaminated pond among those studied in the Haute-Vienne department and can therefore be considered as the best reference pond in the present study. This scenario was not present in the Cantal department because at least one trace metal was predominant in each of the three ponds. The high levels of uranium and manganese (and aluminum for the Pontabrier pond) found in the Pontabrier and Saint-Pierre ponds are characteristic of contamination from uranium mining and processing. These five metals (uranium, aluminum, manganese, iron and barium) were frequently found at significant concentrations in other ecotoxicological studies dealing with uranium mines (Cazala et al. 2008; Gagnaire et al. 2015; Herlory et al. 2013; Marques et al. 2013; Pereira et al. 2008).

Many studies have reported correlations between environmental levels of metals and bioaccumulation in the organs analysed in this study (Kelly and Janz 2009; Kerambrun et al. 2013; Maceda-Veiga et al. 2013; Vieira et al. 2012). In both departments, such correlations were observed for metals other than uranium, but were more organ-dependent. In the Haute-Vienne department, aluminum, which also is used to precipitate uranium and its radioactive daughter products, was more bioaccumulated in spleens and muscles of sticklebacks caged in the Pontabrier pond than in fish caged in the two other ponds in the Haute-Vienne department. These results were supported by correlations between pond contamination and bioaccumulation, especially in fish spleens. In the same way, iron was more accumulated in spleen of sticklebacks caged in the iron-contaminated pond (Jonchère-Saint-Maurice pond) than those exposed to the Pontabrier and Malessard waters. Few differences in manganese

bioaccumulation were observed in the Haute-Vienne ponds, which were corroborated with the little correlation between manganese uptake in organs and contamination in water. In the Cantal department, although aluminum concentrations did not differ between ponds after 28 days of exposure, bioaccumulation of this metal was more pronounced for fish caged in the Saint-Pierre pond, especially in the spleens and the livers. Iron concentrations were higher at D14 and D28 in the Madic pond while iron bioaccumulation were higher for fish caged in Etang Noir compared to bioaccumulation in fish caged in the Madic and Saint-Pierre ponds. Only manganese bioaccumulation in liver was in agreement with concentration in the Saint-Pierre pond, supported by correlation results. In both of the departments, although barium is used to precipitate uranium and its radioactive daughter products, three of the ponds, outside mining influence, had significantly higher concentrations of barium (Madic, Etang Noir and Jonchère-Saint-Maurice ponds). On the other hand, the correlation between barium bioaccumulation and concentrations in water were very small and organ-dependent, resulting in no bioaccumulation difference among ponds. Kerambrun et al. (2013) also observed differences of bioaccumulation according to organs in the European flounder, *Platichthys flesus*, exposed to a polymetallic pollution. This fish did not internalize the metals in the same manner in the liver and gonads. Liver and spleen are involved in the storage and elimination of trace metals (Liang et al. 1999). Our study highlighted a stronger metal bioaccumulation in spleen than in the two other tested organs (liver and muscle). Up to now, few studies have evaluated the metal bioaccumulation in this organ, and even less in fish. In the mouse, *Mus musculus alba*, levels of bioaccumulation in the spleen depend on the metal (Teodorova et al. 2003). Metal bioaccumulation and responses of organisms also depend on the nature of metals and their concentrations, alone or in mixture. Some metals are essential to organisms, such as iron and manganese, and therefore will be regulated by fish, differently according to organs. This may explain the differences in correlation between metal concentrations (iron and manganese) in ponds and bioaccumulation in stickleback organs. Although iron is an essential metal and highly regulated by organisms, it can be toxic at high concentrations, where it catalyzes the Fenton reaction and therefore induces ROS production. In other studies, the concentrations to which iron is toxic to fish are often greater than those found in our ponds (Dalzell and Macfarlane 1999; Javed and Abdullah 2006). However, Alam and Maughan (1992) evaluated a lethal concentration 50 (LC50 – 96h) between 0.56 and 2.25 mg/L (concentrations similar to those found in our ponds). Heier et al. (2013) showed that copper and aluminum accumulate more in mixture than alone, and Qu et al. (2014) reported the same

thing for a freshwater fish (*Carassius auratus*) when zinc was added to different metals (iron and copper). Finally, differences in the response to metal contamination observed in our study compared to others may be due to the choice of fish species. Each species reacts differently to its environment and to stressors (Eyckmans et al. 2011; Jolly et al. 2014; Ruas et al. 2008).

Dissolved uranium concentrations in ponds receiving mine tailings were higher than the PNEC (0.3 µg/L; Table 1). In the ponds without uranium mine tailings, uranium concentrations were lower than this PNEC. Comparison to the PNEC is a widely used method for assessing the environmental risk of contaminants. However, this method also has disadvantages. PNEC can be calculated based on toxicity tests and includes an extrapolation factor that is function of available data (European-Commission 2003). Furthermore, this method does not take into account the indirect effects of pollutants and multiple contaminants. Comparison between PNECs and field concentrations needs to be performed carefully. In our study, with the exception of barium and uranium in the ponds outside mine influence, concentrations of the predominant metals were higher than their respective PNECs (up to 3,500 times the aluminum PNEC: 0.06 µg/L). Aluminum, the most abundant metal on Earth, is harmful to fish (Poléo 1995). Many studies have reported negative effects of this metal on fish immunity (Elsasser et al. 1986; Garcia-Medina et al. 2011), or on the fish antioxidant system (Fernandez-Davila et al. 2012).

To conclude on the polymetallic contamination in the two departments studied, the Haute-Vienne department presented more interest than the Cantal department. Indeed, for the environmental risk assessment linked to tailings from former uranium mines, the Pontabrier pond was more contaminated by these tailings than the Saint-Pierre pond because of its higher concentrations of uranium, aluminum and barium. Moreover, the Malessard pond presented the lowest metal concentrations among the three ponds in the Haute-Vienne department, whereas it was not the case for one reference pond for the Cantal department. Bioaccumulation data confirmed higher uranium contamination in fish from the ponds receiving mine tailings. For the other metals, bioaccumulation differed according to tested organs, and cannot reflect the level of water contamination. The nature of organs studied and the fact that iron and manganese are essential metals could explain these differences between metallic concentrations in water and metallic bioaccumulation in organs.

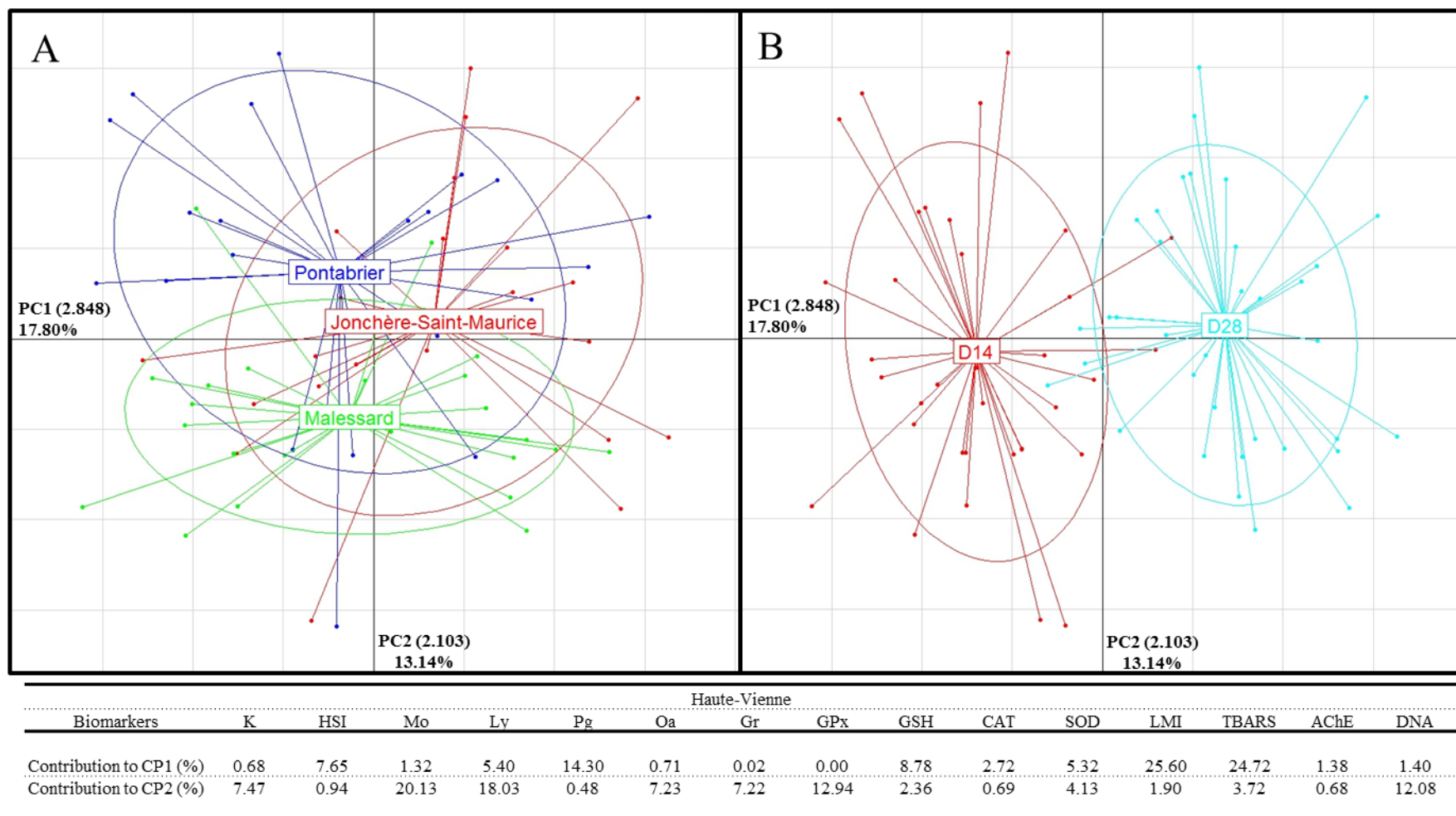


Fig. 3: PCA results obtained in the Haute-Vienne department (D14 and D28), representing individuals grouped according to pond or sampling time (illustrative variables). Principal components (PC 1 & PC 2) are constructed from all biomarkers analysed, except for MT (lack of data in the Etang Noir pond) and stomach contents. The number of selected dimensions is 2. Values between parentheses are the eigenvalues for each axis, followed by the inertia values. The table below summarizes the contributions to the axes of each variable (percentage). A: results according to pond; B: results according to sampling time. K: condition factor; HSI: hepato-somatic index; Mo: cell mortality; Lv: lymphocyte percentage; Pg: phagocytosis percentage; Oa: basal oxidative activity; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; LMI: lysosomal membrane integrity; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; AChE: acetylcholine esterase; DNA: DNA damage.

4.2. Effects on biologic parameters

Many correlations between metal bioaccumulation and biological responses were shown. Exposure to polymetallic contamination caused a decrease of fish condition index (K) in the Haute-Vienne department. For these ponds, K was greatest in the Malessard pond, where the polymetallic concentration was lowest. However, in the Cantal department, K was lowest in the Madic pond, where iron concentration was high, and only at D14. At D28, iron concentration in the Madic pond decreased whereas K increased. Although K seemed to vary with metals, this index can vary with fish nutrition and thus food availability. This point is discussed below (Cf. part 4.3.). Some studies have reported a negative effect of contaminated sites on the K condition index. For example, wastewater from the Seine, which contains mainly trace metals, decreased the K of turbot (Kerambrun et al. 2012). Contamination also negatively affected condition index of *P. flesus* (Kerambrun et al. 2013; Laroche et al. 2002), geophagus, *Geophagus brasiliensis* (Linde-Arias et al. 2008), and stickleback (Roussel et al. 2007; Sanchez et al. 2008a). However, effects of contaminants depend on fish species, as Bennett and Janz (2007) reported different impacts of metal contamination on K of burbot, *Lota lota*, and Northern pike, *Esox Lucius*. Except K, the polymetallic contamination did not impact other biometric parameters of sticklebacks, during 28 days of caging, because no difference was observed for HSI index for the two departments, with two exceptions. Metal presence in stickleback livers was little correlated with HSI variations at the end of experiment, but these correlations were negative. The HSI decreased with an increase of metal bioaccumulation in liver. Many studies have reported no effect of contamination on HSI (Maceda-Veiga et al. 2013; Roussel et al. 2007). However, Laroche et al. (2002) indicated that HSI of flounder decreased with contamination, whereas HSI increased with contamination for three-spined stickleback (Sanchez et al. 2008a) and tilapia, *Tilapia mossambica* (Al-Ghais 2013).

Polymetallic contamination caused an oxidative stress for sticklebacks. Indeed, basal ROS production was higher in the contaminated ponds than in the reference ponds. This result was confirmed by correlations in the Haute-Vienne department. Indeed, all correlations between metals uptake in fish spleens and oxidative activity were positive. Other studies reported ROS production after metal exposure (Fernandez-Davila et al. 2012; Jolly et al. 2014; Lushchak 2011), which can disturb oxidant balance and caused antioxidant responses from fish (Qu et al. 2014). In our study, differences in antioxidant parameters were related mainly to sampling times and less to the ponds. Few differences in Gr, CAT and SOD activities and GSH level

were found among ponds throughout the experiment. Nevertheless, correlation results suggested alterations of the antioxidant system by metals. In Cantal department, presence of uranium and manganese in fish livers was significantly correlated with the decrease of SOD activity. In addition, uptakes of uranium, manganese, aluminum and iron in stickleback livers were negatively correlated with GSH levels, CAT, and GPx activities. These correlations did not appear in the Haute-Vienne department. On the contrary, manganese and barium bioaccumulation in fish livers were positively correlated with GSH levels. Thus, in our study, we conclude that metal contamination can impact the antioxidant system, especially in the Cantal department, but these responses were metal-dependent. Several other studies reported no induction by trace metals of the antioxidant system (Eyckmans et al. 2011; Heier et al. 2013; Kelly and Janz 2009; Marques et al. 2013). However, many other reports mentioned antioxidant system alterations caused by exposure to trace metals (Barillet et al. 2011; Fernandez-Davila et al. 2012; Heier et al. 2013; Maria et al. 2009; Oliva et al. 2012a; Qu et al. 2014; Sanchez et al. 2007) or stimulations of some of these proteins and enzymes (Andersen et al. 1998; Eyckmans et al. 2011; Fernandez-Davila et al. 2012; Kelly and Janz 2009; Vieira et al. 2012). Effects of metals on fish antioxidant responses depended on the dose, the route of exposure and the lag time between the start of exposure and antioxidant system analyses. Indeed, at the beginning of the experiment, the antioxidant system may be affected by metallic contamination, and then may be relieved by other detoxification mechanisms (Sanchez et al. 2005). Jolly et al. (2014) have reported significant effects of aluminum on roach (*Rutilus rutilus*) antioxidant system after 2 days exposure, but not after 1 week. Many researchers have reported that exposure to metals, through oxidative stress, leads to an increase of lipid peroxidation (Lushchak 2011; Marques et al. 2013; Oliva et al. 2012a; Ruas et al. 2008; Sanchez et al. 2007; Sanchez et al. 2008a). Of the Haute-Vienne ponds, fish in the Malessard pond exhibited the lowest lipid peroxidation, which supports this premise. In the Cantal department, lipid peroxidation was higher in the Saint-Pierre pond than in the other two ponds at D28, corresponding to the higher levels of uranium and manganese bioaccumulation in fish livers. These results indicate that lipid peroxidation was enhanced by polymetallic contamination, especially by uranium and manganese contamination. Lipid peroxidation was strongly and negatively correlated with LMI (data not shown), but LMI was not sensitive to the metal pollution tested in this study. This biomarker was not affected by metal contamination in any of the Cantal ponds. In the Haute-Vienne department, the LMI value of sticklebacks caged in the Pontabrier was halfway between that of sticklebacks caged

in the Malessard and Jonchère-Saint-Maurice ponds. However, through correlation results, LMI decreased with an increase of almost all metals in fish spleens.

Leucocyte mortality did not vary among ponds, which means that variations in immune biomarkers between ponds were not due to lower or higher leucocyte mortality. However, results in the Cantal department showed strong and positive correlations between all metal bioaccumulation in spleens and leucocyte mortality, whereas in the Haute-Vienne department, these correlations were evidenced with only manganese and iron bioaccumulation. Thus, metals had an effect on leucocyte mortality, but the nature of these metals depended on the department. Metal contamination also had an effect on lymphocyte percentage in the stickleback spleen. Lymphocyte percentage was lower in ponds affected by uranium tailings (Saint-Pierre and Pontabrier ponds) than in other ponds, except in the Cantal department at D28. This result was reinforced by positive correlations between metal bioaccumulation in fish spleens (except barium in the Cantal department) and the decrease of lymphocyte percentage. Maceda-Veiga et al. (2013) have reported that Catalan chub, *Squalius laietanus*, exposed to high metallic contamination had more monocytes (granulocytic cells) compared to controls. The lower lymphocyte percentage observed in the Pontabrier and Saint-Pierre ponds may have been due to the presence of manganese, which is a potential inhibitor of lymphocyte proliferation (Dunier 1996), or to lymphocyte DNA damages, which may have induced lymphocyte apoptosis. Garcia-Medina et al. (2011) and Jolly et al. (2012) observed this lower lymphocyte percentage after aluminum exposures (0.05 µg/L and 100 µg/L, respectively). In our study, leucocyte necrosis was recorded but not apoptosis. Apoptosis should be measured in future experiments.

In the Haute-Vienne department, the phagocytosis percentage decreased after 28 days in the Malessard and Jonchère-Saint-Maurice ponds, likely due to acclimatisation to caging. However, this pattern was not observed for sticklebacks caged in the Pontabrier pond, which had the highest metal concentrations. Strong correlations between metal bioaccumulation in fish spleens and phagocytosis percentage were evidenced. Increase of uranium and aluminum, as well as decrease of manganese and iron bioaccumulation resulted in high phagocytosis percentage. As bioaccumulation was assessed only at D28, it is difficult to conclude that changes in this immunomarker were due to bioaccumulation variations of these metals in stickleback spleens. Previous studies of phagocytosis showed contradictory effects of metals on this biomarker. In some studies, metals increased (Cossarini-Dunier et al. 1988), decreased (Elsasser et al. 1986), or had no effect (Andersen et al. 1998) on this activity.

As described above, exposure to metals can impact lymphocyte proliferation and DNA integrity (Barillet et al. 2005; Dunier 1996; Garcia-Medina et al. 2011; Lourenco et al. 2013). In our study, DNA damage was detected after 14 days of caging in the Pontabrier pond. However, by D28, this damage had decreased and was at the same level that observed in the Malessard and Jonchère-Saint-Maurice ponds. We hypothesize that the DNA repair system was at work between the two sampling times. DNA damage were assessed on circulating erythrocytes. Despite the few erythrocytes in stickleback spleen, this organ seemed to be the best organ to compare DNA damage and metal bioaccumulation. Even if the DNA damage differences were no longer significant at D28 in the Haute-Vienne department, bioaccumulation of all metals (except manganese) in the spleens induced higher DNA damage. In the Cantal ponds, DNA damage were most prevalent in the Madic pond after 28 days of exposure. In summary, polymetallic contamination seemed to have an effect on DNA integrity, at least in the Haute-Vienne department. Overall, results of this study show that exposure to uranium mine tailings altered the immune system (i.e. decreased lymphocyte percentage and increased leucocyte mortality) and enhanced immune responses (i.e. increased ROS production and phagocytosis percentage) of sticklebacks. LMI varied greatly among ponds in the Haute-Vienne department and between sampling times for both of departments, but it seemed not to be impacted by polymetallic pollution.

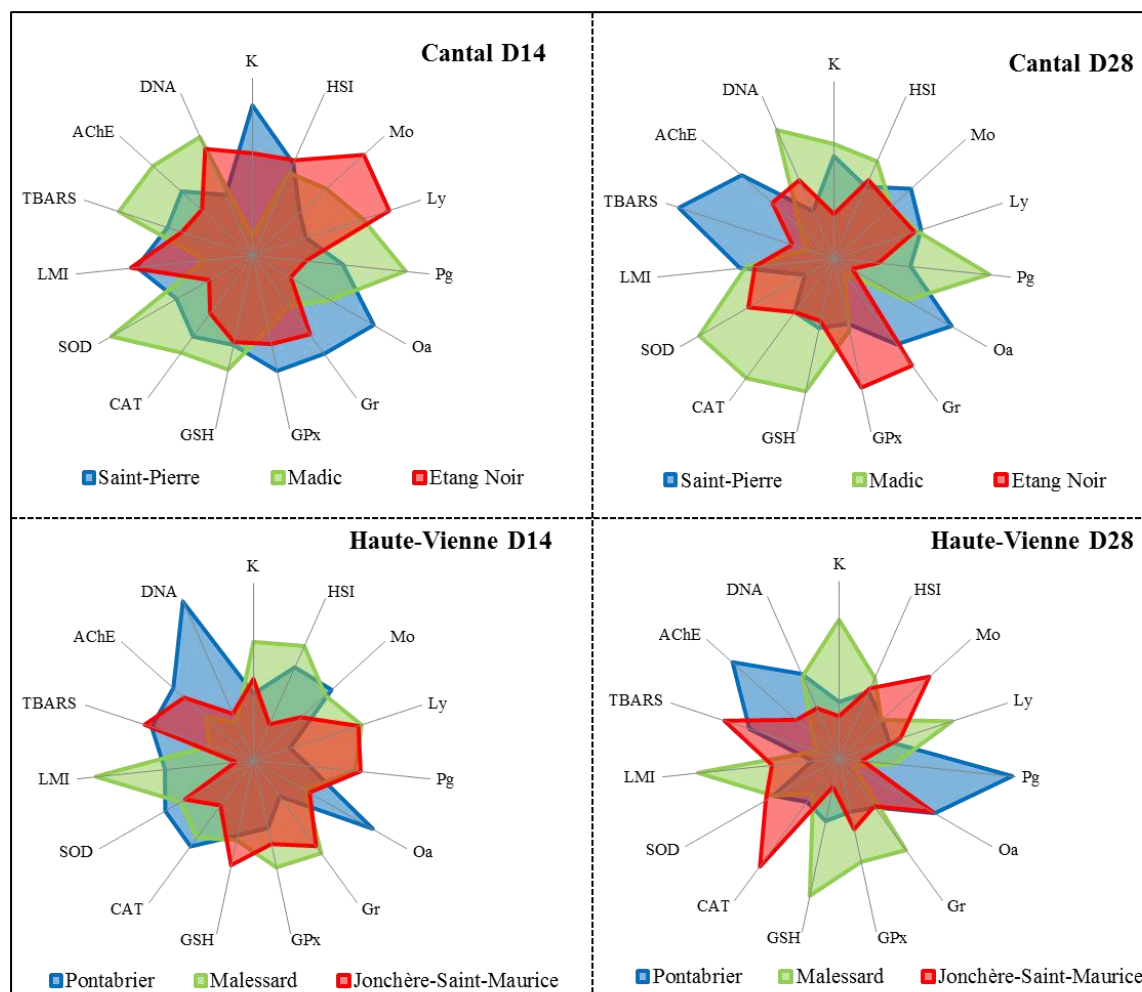
AChE activity increased after 28 days of exposure when fish were maintained in contaminated ponds (Pontabrier and Saint-Pierre ponds). This result is supported by correlation analysis, in which high bioaccumulation of uranium in fish muscles and AChE activity were positively correlated. Otherwise, this activity was negatively correlated to the presence of barium in muscles of caged fish, especially in the Cantal department. Gagnaire et al. (2015) observed the same correlation between barium bioaccumulation in roach muscle and AChE activity (-0.37 compared to -0.44 in our study). In a study of zebrafish, *Danio rerio*, Barillet et al. (2011) reported an increase of AChE activity after 5 days of uranium exposure, with a return to normal values after 10 days. The Orange River mudfish, *Labeo capensis*, also showed increased of AChE activity after a polymetallic exposure (Wepener et al. 2011).

The polymetallic contamination did not have any effect on MT levels or on kidney histology. No difference in MT level was observed in any of the six ponds over the course of our experiment. It is well known that exposure to metals can induce synthesis of MT to help with the detoxification process. Many studies showed a greater level of MT when fish were

exposed to metals (Linde-Arias et al. 2008; Maria et al. 2009). Roesijadi (1996) reported that MT has a special affinity for some metals (i.e. cadmium, silver, mercury, copper, and zinc). Metals found at high concentrations in our study had a lower ability to bind to the –SH group of proteins, such as MT compared to other metals (Roesijadi 1996). Moreover, pollutants, such as uranium, can also affect kidney histology parameters, such as macrophage aggregate proliferation (Cooley et al. 2000; Lukin et al. 2011), but, in this study, few changes in the histology of the posterior kidney were observed, after 28 days of exposure.

To conclude, in both departments, uranium was more concentrated and bioaccumulated in ponds receiving mine tailings (Pontabrier and Saint-Pierre). The other major metals in uranium-contaminated ponds were not necessarily accumulated in stickleback organs, and depended on organ and department tested. For each sampling time, presence of these metals impacted some biomarkers, but the nature of the effects depended of the site studied. In the Haute-Vienne department, uranium-contaminated pond impacted fish physiology and immune capacities. In the Cantal department, the Madic pond seemed to be a detrimental environment for sticklebacks. Indeed, phagocytosis percentage, GSH level, SOD activity and DNA damage were higher in the Madic pond than in the two other ponds, whereas K and Gr activity were lower. Distribution indices, illustrated on figure 4, evidenced general effects of polymetallic contamination from former uranium mines on stickleback responses. Sticklebacks caged in uranium-contaminated ponds had higher oxidative activity, with alteration of their antioxidant system, higher lipid peroxidation, AChE activity and DNA damage, and lower lymphocyte percentage (Figure 4).

Fig. 4: Distributions of centered-reduced responses of sticklebacks according to ponds and sampling times. K: condition factor; HSI: hepatosomatic index; Mo: cell mortality; Ly: lymphocyte percentage; Pg: phagocytosis percentage; Oa: basal oxidative activity; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; LMI: lysosomal membrane integrity; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; AChE: acetylcholine esterase; DNA: DNA damage.



4.3. Confounding factors cannot be ignored

Several environmental variables are considered to be confounding factors and can impact biological responses. Confounding factors can be biotic (e.g. breeding season and cycle development) or abiotic (e.g. temperature, pH and conductivity). Temperature has been shown to change hematologic composition, resulting in a variable lymphocyte percentage (Bowden 2008). Increased temperature also can enhance fish metabolism, thereby enhancing O₂ consumption (Lushchak 2011), disturbing the antioxidant system (Bowden 2008; Vinagre et al. 2012), increasing lipid peroxidation (Vinagre et al. 2012) and causing immunosuppression (Bonga 1997). pH can alter the antioxidant system by increasing CAT activity and decreasing SOD and GPx activities and GSH level (Qu et al. 2014). A low pH

can also affect the immune system by inducing an increased phagocytosis (Bowden 2008). Global variations of environment, such as seasons can play an important role for the biological responses to a toxic. Seasonal variations of environmental parameters can impact the antioxidant system (Oliva et al. 2012a; Ruas et al. 2008; Sanchez et al. 2008b), immune system (Roussel et al. 2007; Sanchez et al. 2008b), DNA conformation (Wirzinger et al. 2007), and metal bioaccumulation (Roussel et al. 2007).

In our study, many differences in physical and chemical parameters of ponds (temperature, conductivity, metal, anion and cation concentrations) between D14 and D28 were observed, as well for biomarkers, especially for the antioxidant system. In the PCA results, sampling time was more discriminant than ponds. This result is supported by the contribution of variables to the construction of PCA axes. Indeed, for the both departments, axis 1, which showed a clear distinction between sampling time, is mostly built from variables varying between the D14 and D28. The distinction between the ponds can be somewhat explained by axis 2, although the explanatory variables did not necessarily vary according to ponds. The low values (38 and 31% for the Cantal and Haute-Vienne department, respectively) of the total inertia explained by the first two axes of each PCA, are due to the high number of variables used for their construction. The clear distinction between sampling time observed by PCA may be explained by the fact that we measured all environmental parameters and metal concentrations at each sampling time rather than continuously. Thus, values of these parameters used in the analysis were fixed, even though they continued to vary over time. In future experiments, continuous measurements of environmental parameters should be conducted, which would make the variable “sampling time” less important and be more consistent with what is happening in ponds.

Caging allows direct exposure of fish to toxins, under semi-controlled field conditions, but this experimental system can be harmful to fish. Caging involves many sources of stress, such as lack of food, manipulation, transportation, and high fish density (Oikari 2006). Stress caused by these factors is indicated by enhancement of plasmatic cortisol levels (Blom et al. 2000; Vazzana et al. 2002). Some stressors can alter the antioxidant system (Blom et al. 2000), decrease ROS production or modify the leucocyte distribution (Espelid et al. 1996; Vazzana et al. 2002). More serious effects, such as immunosuppression effects, resulting in decreased pathogenic resistance, also are possible (Bonga 1997; Espelid et al. 1996). In our study, before caging, the K condition index was 1.2. Subsequently, K decreased after 14 days of caging in each pond, particularly in the Haute-Vienne ponds, while fish weight did not vary

during the experiment. The sticklebacks were not fed during the experiment, which could explain the decline. Kerambrun et al. (2012) showed that K for juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, decreased after 10 days of fasting. Although HSI did not differ among ponds in the Cantal and Haute-Vienne departments, this index decreased between D14 and D28. Caging can be a reason to these decreases. Stomach content was analysed quantitatively but not qualitatively, so this analysis only provided information about what sticklebacks ate at the end of experiment. So the value of this index depends on the time at which the stomach content is sampled (Lin et al. 2007). This index informs us, that our caging conditions (without food supply for twenty eight days) did not prevent sticklebacks to eat, and can be reused in future experiments. However, except stomach content, our caging system impacted negatively fish condition indices. Experiments should be conducted to determine if some constraints due to caging affect biological responses to polymetallic contamination.

5. Conclusion

The aim of this study was to evaluate the effects of polymetallic contamination from former uranium mining sites using a multi-biomarker approach on *G. aculeatus*. These mine wastes still contain high uranium concentrations, and aluminum and barium uses had repercussions at the nearby ponds.

The multi-biomarker approach is useful in this polymetallic context, because some common specific biomarkers of metal exposure, including MT or some antioxidant enzymes were not impacted or induced by these metals, contrary to generalist biomarkers, such as ROS production by splenic leucocytes, or specific biomarker of another type of pollutant, such as AChE activity. Thanks to this multi-biomarker approach, our work can contribute to the environmental risk assessment of metals from former uranium mine tailings, by demonstrating that these metals induced an oxidative stress, visible on some parts of the immune system, on the antioxidant system, and on the DNA integrity of the three-spined stickleback. Thus, these biomarkers can be relevant in *in situ* experiments. A consequence of these effects is that this metallic contamination may leave these fish ill-equipped to deal with other stressors such as infection or parasitism.

However, metal concentrations and bioaccumulation cannot explain all of the responses recorded and confounding factors also had an impact on the biomarkers analysed. In order to eliminate some confounding factors, next experiments will be focused on the possible effects of caging and environmental factors.

6. Acknowledgments

The authors are deeply grateful to the owners of the different ponds for having allowed this environmental study. R Amara, E Kerambrun, K Gombeau, S Pierrisnard, D Orjollet, V Camilleri, S Frelon, N Piasecki, M Blachon and A Bertrand are acknowledged for their help with field experiments and laboratory analyses. This work was partly supported by IRSN and the financial support of the 181 DRC 46 program of the French Ministry for Ecology and Sustainable Development. The authors are grateful to International Science Editing for their help in correcting the English form of this paper.

Ethical approval

This experiment was conducted in accordance with the European Commission's recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. The registration number for ethics of INERIS laboratory is the B60-769-02. For sampling, to avoid bias in the immune responses, no anesthetic overdose can be used for euthanasia of sticklebacks. Indeed, in the 2010/63 / EU Directive of the European Parliament and the 22 September 2010 Council about the protection of animals used for scientific purposes, this option is envisaged "if anesthesia is incompatible with the purpose of the procedure". Therefore, sticklebacks were rapidly sacrificed by cervical dislocation followed by destruction of the brain. This method has been approved by the Committee No. 96-CREMEAP (Regional Ethics Committee in Animal Experimentation of Picardy).

References

- Al-Ghais SM (2013) Acetylcholinesterase, glutathione and hepatosomatic index as potential biomarkers of sewage pollution and depuration in fish. *Marine pollution bulletin* 74:183-186 doi:10.1016/j.marpolbul.2013.07.005
- Alam M, Maughan O (1992) The effect of malathion, diazinon, and various concentrations of zinc, copper, nickel, lead, iron, and mercury on fish. *Biological trace element research* 34:225-236
- Amiard J-C, Amiard Triquet C (2008) Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. *Lavoisier*

- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS (2006) Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76: 160-202
- Andersen F, Lygren B, Maage A, Waagbø R (1998) Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* 161: 437-451
- Andersson C, Katsiadaki I, Lundstedt-Enkel K, Örberg J (2007) Effects of 17 α -ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic toxicology* 83: 33-42
- Babo S, Vasseur P (1992) *In vitro* effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology* 22: 61-68
- Bado-Nilles A, Betoulle S, Geffard A, Porcher JM, Gagnaire B, Sanchez W (2013) Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology. *Environmental science and pollution research international* 20: 2692-2704
- Bado-Nilles A, Quentel C, Mazurais D, Zambonino-Infante JL, Auffret M, Thomas-Guyon H, Le Floch S (2011) *In vivo* effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne). *Ecotoxicology and environmental safety* 74: 1896-1904
- Barillet S, Adam-Guillermin C, Palluel O, Porcher JM, Devaux A (2011) Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environ Pollut* 159: 495-502
- Barillet S, Buet A, Adam C, Devaux A, Devaux A (2005) Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection* 40: S175-S181
- Bennett PM, Janz DM (2007) Bioenergetics and growth of young-of the-year northern pike (*Esox lucius*) and burbot (*Lota lota*) exposed to metal mining effluent. *Ecotoxicology and environmental safety* 68: 1-12
- Blom S, Andersson TB, Förlin L (2000) Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 α -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the

- activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquatic toxicology* 48: 265-274
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE (2001) Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 853-873
- Bonga SW (1997) The stress response in fish. *Physiological reviews* 77: 591-625
- Bowden TJ (2008) Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & shellfish immunology* 25: 373-383
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254
- Carlberg I, Mannervik B (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250:5475-5480
- Cazala C, Andrès C, Decossas J-L, Cathelineau M, Peiffert C (2008) Impact of uranium mines water treatment on uranium and radium behaviour. In: Merkel B, Hasche-Berger A (eds) Uranium, Mining and Hydrogeology. *Springer Berlin Heidelberg*, pp 829-838.
- Chilmonczyk S, Monge D (1999) Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & shellfish immunology* 9: 319-333
- Clevenger T (1990) Use of sequential extraction to evaluate the heavy metals in mining wastes. *Water, Air, and Soil Pollution* 50: 241-254
- Cooley HM, Evans RE, Klaverkamp JF (2000) Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic toxicology* 48: 495-515
- Cossarini-Dunier M, Demael A, Lepot D, Guerin V (1988) Effect of manganese ions on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*) against *Yersinia ruckeri*. *Developmental & Comparative Immunology* 12: 573-579
- Dalzell DJB, Macfarlane NAA (1999) The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: a comparison of two grades of iron sulphate. *Journal of Fish Biology* 55: 301-315
- Dunier M (1996) Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Italian Journal of Zoology* 63: 303-309
- Ellman GL, Courtney KD, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7: 88-95
- Elsasser M, Roberson B, Hetrick F (1986) Effects of metals on the chemiluminescent response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) phagocytes. *Veterinary immunology and immunopathology* 12: 243-250

- Espelid S, Løkken GB, Steiro K, Bøgwald J (1996) Effects of cortisol and stress on the immune system in Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & shellfish immunology* 6: 95-110
- European-Commission (2003) Technical guidance document on risk assessment, part II. *European Communities*: 1-337
- Eyckmans M, Celis N, Horemans N, Blust R, De Boeck G (2011) Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquat Toxicol* 103: 112-120
- Favier A (2003) Le stress oxydant. *L'actualité chimique*: 108-115
- Fernandez-Davila ML, Razo-Estrada AC, Garcia-Medina S, Gomez-Olivan LM, Pinon-Lopez MJ, Ibarra RG, Galar-Martinez M (2012) Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae, *Ctenopharingodon idella*). *Ecotoxicology and environmental safety* 76: 87-92
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM (2003) Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 317: 207-233
- Gagnaire B et al. (2015) Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of *in situ* metal toxicity. *Ecotoxicology* 24: 215-231
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH (2004) Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Marine environmental research* 58: 233-237
- Garcia-Medina S, Razo-Estrada C, Galar-Martinez M, Cortez-Barberena E, Gomez-Olivan LM, Alvarez-Gonzalez I, Madrigal-Bujaidar E (2011) Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology*: CBP 153: 113-118
- GRNC (2002) Risques pour l'environnement. *Evaluation des risques associés aux rejets chimiques des installations nucléaires du Nord-Cotentin* 3: 49 and annexes
- Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagne F (2013) Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat Toxicol* 126: 393-403

- Hart P, Gill A (1994) Evolution of foraging behaviour in the threespine stickleback. *The evolutionary biology of the threespine stickleback*: 207-239
- Heier LS et al. (2013) Sublethal effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to mixtures of copper, aluminium and gamma radiation. *Journal of environmental radioactivity* 121: 33-42
- Herlory O, Bonzom JM, Gilbin R, Frelon S, Fayolle S, Delmas F, Coste M (2013) Use of diatom assemblages as biomonitor of the impact of treated uranium mining effluent discharge on a stream: case study of the Ritord watershed (Center-West France). *Ecotoxicology* 22: 1186-1199
- Hudcova H, Badurova J, Rozkosny M, Sova J, Funkova R, Svobodova J (2013) Quality and mutagenicity of water and sediment of the streams impacted by the former uranium mine area Olsi-Drahonin (Czech Republic). *Journal of environmental radioactivity* 116: 159-165
- INERIS (2005) Aluminum & derivatives. *Toxicological and environmental data sheets of chemicals* <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/cas/7429-90-5/2>
- INERIS (2008a) Barium. *Toxicological and environmental data sheets of chemicals* <http://www.ineris.fr/substances/fr/glossaire/view/letter/B>
- INERIS (2008b) Uranium. *Toxicological and environmental data sheets of chemicals* <http://www.ineris.fr/substances/fr/substance/cas/7440-61-1>
- IRSN (2007) Inventaire national des sites miniers d'uranium.
- Javed M, Abdullah S (2006) Studies on acute and lethal toxicities of iron and nickel to the fish Pakistan. *Journal of Biological Sciences* 9: 330-335
- Jolly S et al. (2014) Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 13103-13117
- Katsiadaki I (2006) The use of the stickleback as a sentinel and model species in ecotoxicology biology of the three-spined stickleback: 319
- Kelly JM, Janz DM (2009) Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. *Aquat Toxicol* 92: 240-249
- 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

- Kerambrun E, Henry F, Perrichon P, Courcot L, Meziane T, Spilmont N, Amara R (2012) Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquat Toxicol* 108: 130-140
- 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* 21: 2705-2712
- Lee RF, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544: 43-64
- Liang Y, Cheung RYH, Wong MH (1999) Reclamation of wastewater for polyculture of freshwater fish: bioaccumulation of trace metals in fish. *Water research* 33: 2690-2700
- Lin H-J, Kao W-Y, Wang Y-T (2007) Analyses of stomach contents and stable isotopes reveal food sources of estuarine detritivorous fish in tropical/subtropical Taiwan Estuarine. *Coastal and Shelf Science* 73: 527-537
- Linde-Arias AR, Inacio AF, Novo LA, de Albuquerque C, Moreira JC (2008) Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environ Pollut* 156: 974-979
- Lourenco J, Pereira R, Goncalves F, Mendo S (2013) Metal bioaccumulation, genotoxicity and gene expression in the European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) inhabiting an abandoned uranium mining area. *The Science of the total environment* 443: 673-680
- Lozano J, Vera Tomé F, Gómez Escobar V, Blanco Rodriguez P (2000) Radiological characterization of a uranium mine with no mining activity. *Applied Radiation and Isotopes* 53: 337-343
- Lukin A, Sharova J, Belicheva L, Camus L (2011) Assessment of fish health status in the Pechora River: Effects of contamination. *Ecotoxicology and environmental safety* 74: 355-365
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 101: 13-30
- Maceda-Veiga A, Monroy M, Navarro E, Viscor G, de Sostoa A (2013) Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean river. *The Science of the total environment* 449: 9-19

- Maria V, Ahmad I, Oliveira M, Serafim A, Bebianno M, Pacheco M, Santos M (2009) Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. *Ecotoxicology and environmental safety* 72: 1861-1870
- Marques SM, Chaves S, Goncalves F, Pereira R (2013) Evaluation of growth, biochemical and bioaccumulation parameters in *Pelophylax perezi* tadpoles, following an *in-situ* acute exposure to three different effluent ponds from a uranium mine. *The Science of the total environment* 445-446: 321-328
- Mathews T, Beaugelin-Seiller K, Garnier-Laplace J, Gilbin R, Adam C, Della-Vedova C (2009) A probabilistic assessment of the chemical and radiological risks of chronic exposure to uranium in freshwater ecosystems. *Environmental Science & Technology* 43: 6684-6690
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J (1994) Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 17: 235-248
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95: 351-358
- Oikari A (2006) Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic toxicology* 78: 370-381
- Oliva M, Jose Vicente J, Gravato C, Guilhermino L, Dolores Galindo-Riano M (2012a) Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial variation. *Ecotoxicology and environmental safety* 75: 151-162
- Oliva M, Perales JA, Gravato C, Guilhermino L, Galindo-Riano MD (2012b) Biomarkers responses in muscle of Senegal sole (*Solea senegalensis*) from a heavy metals and PAHs polluted estuary. *Marine pollution bulletin* 64: 2097-2108
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 70: 158-169
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical biochemistry* 154: 536-541

- Pereira R, Antunes SC, Marques SM, Goncalves F (2008) Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I soil chemical characterization. *The Science of the total environment* 390: 377-386
- Pereira R, Pereira ML, Ribeiro R, Goncalves F (2006) Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environ Pollut* 139: 561-575
- Poléo A (1995) Aluminium polymerization - a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic toxicology* 31: 347-356
- Pottinger T, Carrick T, Yeomans W (2002) The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish Biology* 61: 207-229
- Qu R, Feng M, Wang X, Qin L, Wang C, Wang Z, Wang L (2014) Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat Toxicol* 150: 9-16
- Roesijadi G (1996) Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 113: 117-123
- Roussel H, Joachim S, Lamothe S, Palluel O, Gauthier L, Bonzom JM (2007) A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: individual and population responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat Toxicol* 82: 272-280
- Ruas CB, Carvalho Cdos S, de Araujo HS, Espindola EL, Fernandes MN (2008) Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and environmental safety* 71: 86-93
- Sanchez W, Ait-Aissa S, Palluel O, Ditche JM, Porcher JM (2007) Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16: 279-287
- Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, Ditche JM, Porcher JM (2008a) Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environment international* 34: 490-498
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Ait-Aissa S (2005) Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental toxicology and pharmacology* 19: 177-183

- Sanchez W, Piccini B, Ditché JM, Porcher JM (2008b) 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: 791-798
- Santos R, Palos-Ladeiro M, Besnard A, Porcher JM, Bony S, Sanchez W, Devaux A (2013) Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. *Reprod Toxicol* 36: 6-11
- Teodorova S, Metcheva R, Topashka-Ancheva M (2003) Bioaccumulation and damaging action of polymetal industrial dust on laboratory mice *Mus musculus alba*: I. Analysis of Zn, Cu, Pb, and Cd disposition and mathematical model for Zn and Cd bioaccumulations. *Environmental Research* 91: 85-94
- UE (2007) Proposed EQS for Water Framework Directive Annex VIII substances. <http://www.wfduk.org/sites/default/files/Media/Iron%20-%20UKTAG.pdf>
- Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G (1994) A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell biology and toxicology* 10: 415-421
- Vazzana M, Cammarata M, Cooper E, Parrinello N (2002) Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210: 231-243
- Vieira MC, Torronteras R, Cordoba F, Canalejo A (2012) Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicology and environmental safety* 78: 212-217
- Vinagre C, Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Diniz M (2012) Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators* 23: 274-279
- Wepener V, Van Dyk C, Bervoets L, O'Brien G, Covaci A, Cloete Y (2011) An assessment of the influence of multiple stressors on the Vaal River, South Africa. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 36: 949-962
- Wirzinger G, Weltje L, Gercken J, Sordyl H (2007) Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool? *Mutation research* 628: 19-30

CHAPITRE 5 : IMPACTS DE LA CONTAMINATION POLYMETALLIQUE LIEE AUX REJETS MINIERES SUR LES REPONSES DE L'EPINOUCHE A UN STRESS BIOLOGIQUE



1. Manipulation préliminaire

Afin de caractériser la susceptibilité des poissons envers un stress biologique (injection de lipopolysaccharides) après une exposition à un stress chimique (pollution polymétallique dans les étangs de la Haute-Vienne), il était nécessaire de déterminer les paramètres permettant d'induire un stress biologique chez l'épinoche. Pour cela, une expérience de laboratoire a été conduite afin de connaître la concentration de LPS à injecter pour induire un stress biologique visible sur les biomarqueurs d'intérêt et pour déterminer le temps de latence entre injection et analyses à respecter pour limiter le stress de manipulation.

1.1. Application du stress biologique

Cent quatre-vingt épinoches âgées d'un an ($2,03 \pm 0,64$ g; $5,38 \pm 0,72$ cm) ont été réparties dans 5 aquariums de 40 L, remplis avec 35 L d'eau pour une densité finale de $2,32 \text{ kg/m}^3$, très proche de celle utilisée lors de l'encagement. Une période d'acclimatation de deux semaines suivant le transport de l'élevage de l'INERIS à l'IRSN a été respectée. Pendant cette acclimatation, les épinoches ont été nourries quotidiennement avec des larves de chironomes (3 % du poids total des épinoches, Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgique, d'après Allen et Wootton (1982)) et l'eau a été renouvelée au tiers tous les deux jours (température : $13,42 \pm 0,30$ °C ; conductivité : 353 ± 47 $\mu\text{S/cm}$; pH : $7,14 \pm 0,21$). Deux de ces aquariums étaient destinés aux épinoches témoins (témoins de stress de l'anesthésie et de l'injection) et aux poissons subissant une injection de tampon phosphate salin, le solvant des LPS (PBS, Sigma, St. Louis, MO, USA). Les trois autres aquariums contenaient les épinoches qui ont été exposées au stress biologique via trois différentes concentrations de LPS : 3, 6 et 9 mg de LPS par kg de poisson, pour un volume maximal injecté de 10 μL (LPS d'*Escherichia coli* souche 0127: B8, Sigma). Ces injections ont été réalisées grâce à des seringues Hamilton (25 μL , Reno, NV, USA) et ont été précédées de l'anesthésie des épinoches par balnéation au tricaine méthanesulfonate (0,1 g/L, MS222, Molekula, Irvine, CA, USA). Une fois les épinoches anesthésiées dans un bac approprié, les LPS ou le PBS ont été injectés par voie intrapéritonéale. Après un passage dans un bac de réveil, les épinoches ont été replacées

dans leur aquarium respectif. Aucune nourriture n'a été donnée aux épinoches le jour suivant les injections et la nourriture n'a été donnée les jours suivants qu'après avoir retiré les épinoches à euthanasier. Ces euthanasies, par dislocation cervicale, se sont déroulées 1, 2, 4 et 8 jours après les injections (D) ($n = 10$). Les épinoches témoin (anesthésie et injection) n'ont été prélevées que le jour suivant les injections (D+1). Un récapitulatif de l'expérimentation est présenté sur la Figure 16.

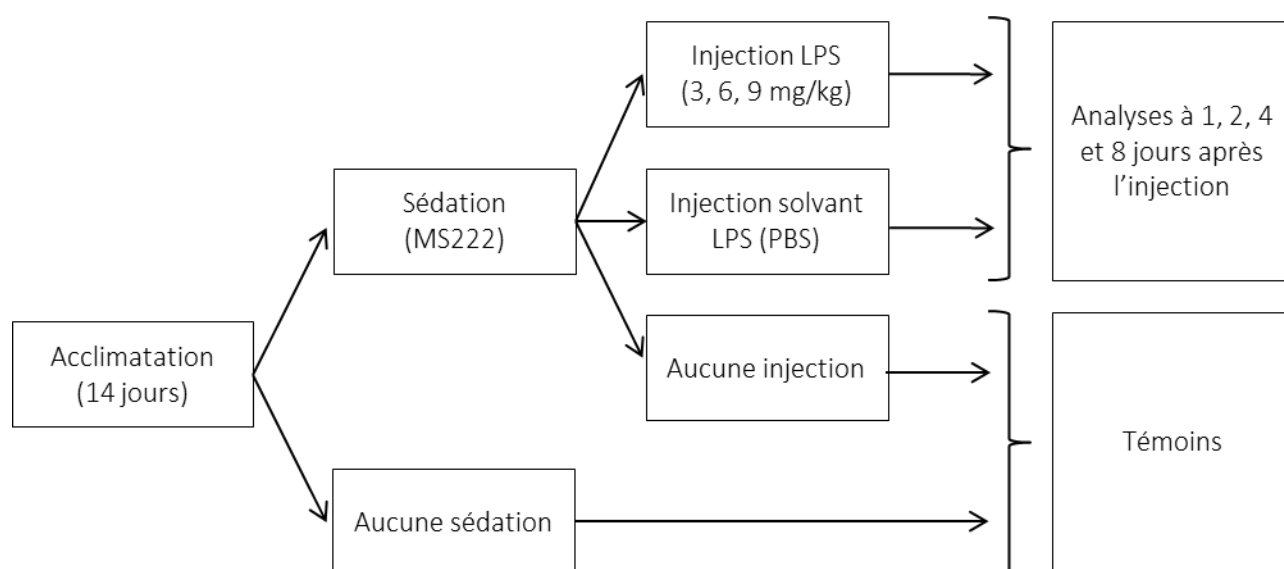


Figure 16 : Mise en place d'un stress biologique via les lipopolysaccharides au laboratoire. Les épinoches n'ayant subi aucune sédation constituent les témoins sédation, tandis que les épinoches n'ayant subi qu'une sédation constituent les témoins injection. Pour chaque condition d'injection et chaque temps de prélèvement, 10 épinoches ont été sacrifiées. Les épinoches témoin ne sont prélevées qu'à 1 jour après les injections (D+1).

1.2. Mesures des effets du stress biologique

Afin d'observer les effets des LPS sur l'épinoche à trois épines et de déterminer une concentration de LPS ainsi qu'un temps de latence entre injection et dissection, plusieurs biomarqueurs ont été analysés (Cf. Tableau 8). Les protocoles de chaque analyse sont détaillés dans l'article scientifique qui suit (Cf. Ch. 5, partie 3). Les indices de conditions (HSI et K) n'ont pas été évalués du fait de la rapidité de l'expérience (8 jours après la phase d'acclimatation).

Tableau 8 : Nature des biomarqueurs analysés, méthodes de mesure et organes associés lors de l’expérience de laboratoire de septembre 2013.

Type	Biomarqueur	Abréviations	Mesure	Organe utilisé
Système immunitaire	Nécrose leucocytaire	Nec.		
	Apoptose leucocytaire	Apop.		
	Pourcentage de lymphocytes	Ly		
	Intégrité de la membrane lysosomale	IML	Cytométrie en flux	Rate
	Activité oxydative basale	ROS b.		
	Activité oxydative stimulée	ROS s.		
	Index de stimulation de la flambée oxydative	SI		
	Capacité de phagocytose	Phago.		
Système Antioxydant	Catalase	CAT		
	Superoxyde dismutase	SOD		
	Glutathion total	GSH	Dosages biochimiques	Foie
	Glutathion reductase	Gr		
	Glutathion-S-transférase	GST		
	Glutathion peroxydase	GPx		
Peroxydation lipidique	TBARS	TBARS	Dosage biochimique	Foie

1.3. Observations des effets du stress biologique

Le but de l’expérimentation au laboratoire était de créer un stress biologique via une inflammation causée par des LPS, tout en évitant un stress dû à l’anesthésie ou à l’injection.

Des effets significatifs de la sédation et de l’injection ont été observés à 1 et 2 jours après l’injection sur la nécrose leucocytaire (Cf. Figure 17), l’intégrité de la membrane lysosomale (IML), la production d’ERO basale et stimulée ainsi que sur l’index de stimulation des ERO (SI), la phagocytose et le glutathion total (Cf. Tableau 9).

Tableau 9 : Différences observées sur quatre immunomarqueurs entre des épinoches qui n’ont pas subi d’anesthésie ou d’injection (Témoins anesthésie), n’ayant subi que l’anesthésie (Témoins injection) et des épinoches sacrifiées un jour après l’injection de PBS. a et b désignent des différences significatives entre les différentes conditions ($p \leq 0,05$). IML : intégrité de la membrane lysosomale ; ROS b. : production basale d’ERO ; ROS s. : production stimulée d’ERO ; SI : index de stimulation de la flambée oxydative.

		IML		ROS b.		ROS s.		SI	
		UF		UF		UF		UF	
Témoins anesthésie	moyenne	177,26	ab	3,73	ab	2,41	b	0,69	b
	écart-type	42,43		1,41		0,74		0,17	
Témoins injection	moyenne	155,04	b	4,44	a	4,14	b	0,88	b
	écart-type	32,17		1,14		1,23		0,32	
PBS D+1	moyenne	198,59	a	3,15	b	8,53	a	2,14	a
	écart-type	45,64		1,02		4,44		0,60	

L'effet de l'injection était plus visible à D+1 sur la nécrose leucocytaire, l'IML, et les trois mesures de la flambée oxydative, tandis que le stress de l'anesthésie, ou sédation, était surtout visible deux jours après les anesthésies et injections. En effet, l'anesthésie a induit une augmentation de la production stimulée d'ERO à D+1, D+2, et D+4 et des diminutions de la capacité de phagocytose et du GSH.

Ces deux temps (D+1 et D+2) n'ont donc pas été retenus pour les prochaines expériences afin de ne pas induire d'effets confondants liés aux stress d'anesthésie et d'injection.

Concernant les effets significatifs des LPS sur les immunomarqueurs, un schéma commun d'effets et réponses a été rapporté pour l'activité oxydative stimulée et la capacité de phagocytose. En effet, ces activités ont augmenté avec les concentrations croissantes en LPS deux jours après les injections, ainsi qu'après quatre jours pour l'activité oxydative stimulée (Cf. Figure 18). Ces activités revenaient à la normale (niveau des activités observées chez les épinoches qui ont subi une injection de PBS) au bout de huit jours. Concernant la production basale d'ERO, cette activité a significativement augmenté au bout de 1 et 2 jours suivant l'injection de LPS à la plus forte concentration par rapport à l'injection de PBS (D+1 : de $3,94 \pm 2,67$ pour la condition PBS à $8,68 \pm 4,52$ pour la condition 9 mg/kg), et a significativement diminué à partir du D+4 (Cf. annexe 1 de l'article scientifique, page 213). Le SI a significativement augmenté au D+1 et au D+2, augmentation impactée par les stress d'injection et de sédation, et a diminué jusqu'à D+8, excepté pour la plus forte concentration de LPS (Cf. annexe 1 de l'article scientifique, page 213). Enfin, l'apoptose leucocytaire la plus forte a été observée à D+8 (Cf. annexe 1 de l'article scientifique, page 213).

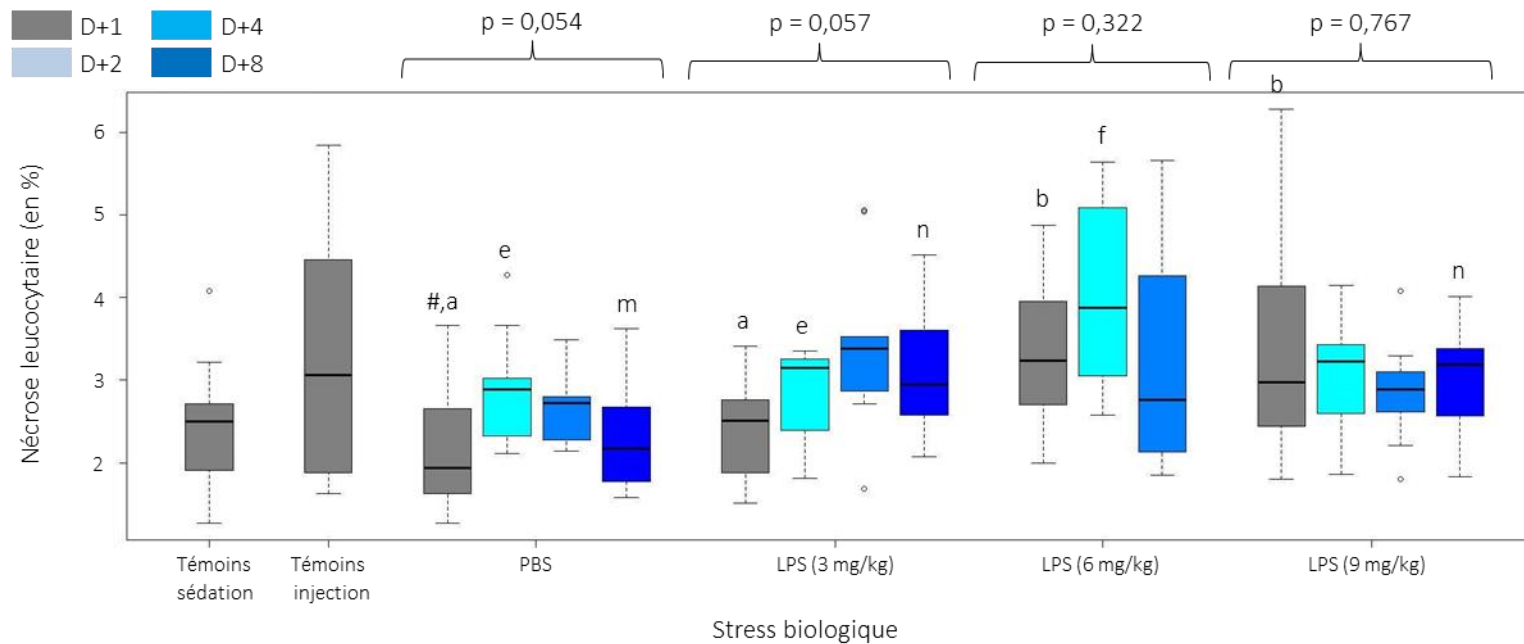


Figure 17 : Nécrose leucocytaire en fonction de la condition d'exposition au stress biologique (LPS) et du temps de latence entre injection (D) et dissection. Les boxplots représentent la médiane, les quartiles et valeurs extrêmes. Les p-valeurs écrites en haut du graphique correspondent à la comparaison de moyennes ou de rangs entre les différents temps de prélèvement pour une même condition d'injection. a, b, c, d : groupes significativement différents 1 jour après les injections (D+1). e, f, g, h : groupes significativement différents 2 jours après les injections (D+2). i, j, k, l : groupes significativement différents 4 jours après les injections (D+4). m, n, o, p : groupes significativement différents 8 jours après les injections (D+8). * : différence significative entre l'injection de PBS et les témoins sédation. # : différence significative entre l'injection de PBS et les témoins injection. Pour chaque test statistique, $\alpha = 5\%$.

Les LPS n'ont pas induit d'effet sur une partie du système antioxydant (GPx, Gr), ainsi que sur la peroxydation lipidique, bien qu'ils aient augmenté la production d'ERO. Cependant, les teneurs du GSH ont été significativement réduites en fonction du temps mais aussi en fonction de la concentration de LPS injectés (Cf. annexe 1 de l'article scientifique, page 213). Les activités de la CAT et de la GST ont aussi diminué significativement, 4 jours après l'injection de la plus forte concentration en LPS (Cf. annexe 1 de l'article scientifique, page 213).

1.4. Conclusion : choix du stress biologique

Au laboratoire, la concentration de 9 mg de LPS / kg de poisson a induit le plus important stress biologique chez l'épinoche, en considérant les réponses immunitaires et antioxydantes analysées. Pour induire ce stress biologique sans prendre en compte le stress de manipulation (sédation et injection), l'expérience préliminaire a permis de montrer que le temps de latence à respecter entre injection et dissection est au minimum de 4 jours. Comme les effets du stress biologique s'estompaient 8 jours après les injections, nous avons donc sélectionné, pour la suite des études, les deux conditions d'injection suivantes : **9 mg de LPS / kg de poisson et 4 jours de latence entre injection /sédation et dissection.**

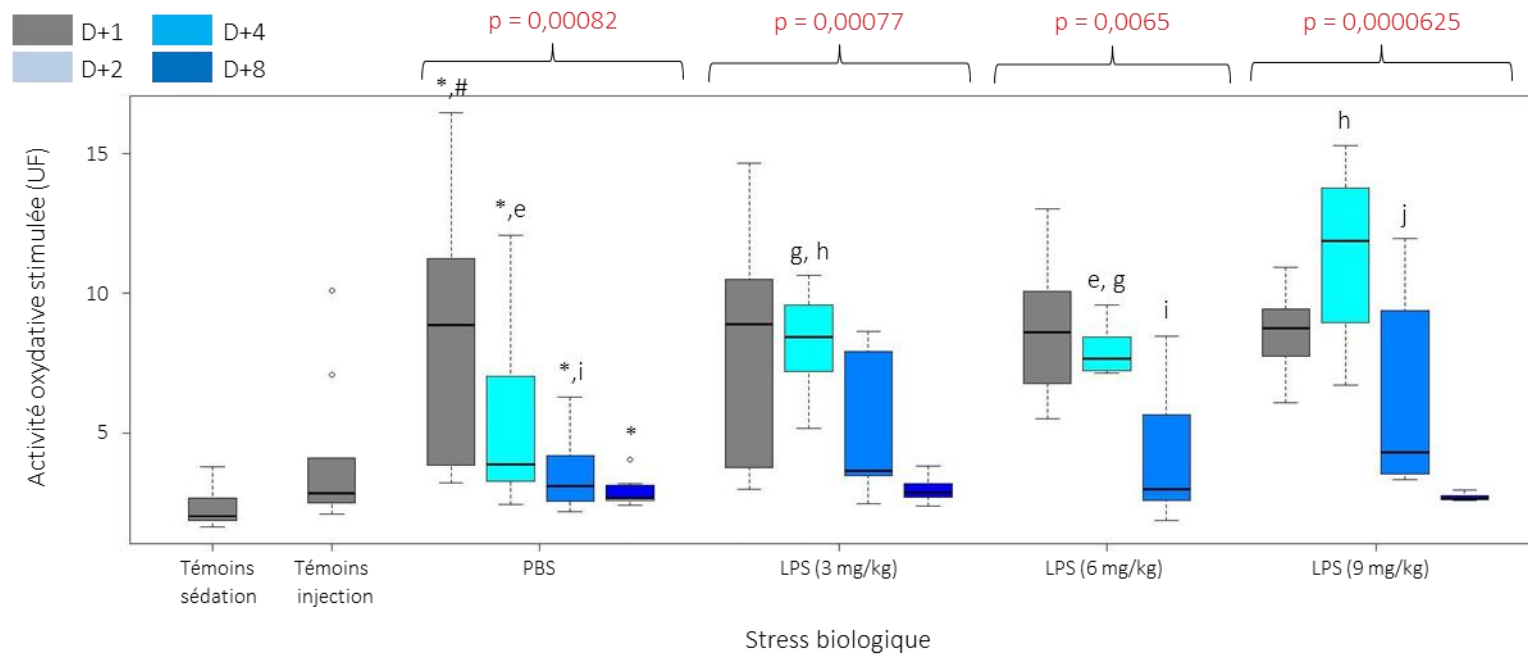


Figure 18 : Activité oxydative stimulée en fonction de la condition d'exposition au stress biologique (LPS) et du temps de latence entre injection (D) et dissection. Les boxplots représentent la médiane, les quartiles et valeurs extrêmes. Les p-valeurs écrites en haut du graphique correspondent à la comparaison de moyennes ou de rangs entre les différents temps de prélèvement pour une même condition d'injection. a, b, c, d : groupes significativement différents 1 jour après les injections (D+1). e, f, g, h : groupes significativement différents 2 jours après les injections (D+2). i, j, k, l : groupes significativement différents 4 jours après les injections (D+4). m, n, o, p : groupes significativement différents 8 jours après les injections (D+8). * : différence significative entre l'injection de PBS et les témoins sédation. # : différence significative entre l'injection de PBS et les témoins injection. Pour chaque test statistique, $\alpha = 5\%$.

2. Résumé de l'article scientifique

2.1. Objectif

Le but de cette deuxième étude *in situ* était de savoir si un stress chimique (contamination polymétallique des étangs soumis aux rejets miniers uranifères) pouvait impacter la susceptibilité et les réponses d'un poisson à un stress biologique soudain (injection de LPS).

2.2. Matériels et méthodes

Quatre-vingt-dix épinoches à trois épines ont été engagées dans les trois étangs de la Haute-Vienne présentés dans le Ch. 3, partie 1 (Pontabrier, Malessard et la Jonchère Saint-Maurice) après deux semaines d'acclimatation aux conditions physico-chimiques des étangs. Les épinoches ont été engagées dans des cages dont le volume a été diminué de moitié par ajout d'une cloison, ceci afin de réduire le nombre d'individus sacrifiés (15 poissons par ½ cage, 2 cages par étang, pour une densité de 2,31 kg/m³). Durant toute la phase d'exposition aux métaux, les épinoches n'ont pas reçu d'apport extérieur de nourriture. Quatorze jours après leur mise en eau, les épinoches d'une des deux cages ont subi une injection de LPS (9 mg de LPS / kg de poisson), tandis que les épinoches de l'autre cage ont reçu une injection du solvant des LPS, le PBS. Les conditions d'anesthésie et d'injection ont été choisies en accord avec les résultats de l'expérience de laboratoire préliminaire (Cf. Ch. 5, partie 1.4). A la suite de leur réveil, les poissons ont été replacés dans leurs cages et étangs respectifs pendant quatre jours, au bout desquels ils ont été euthanasiés pour l'analyse de biomarqueurs. Du fait des résultats obtenus lors de l'étude *in situ* précédente, seuls les indices de condition, les biomarqueurs d'immunité, du stress oxydant et de génotoxicité ont été évalués (Cf. Tableau 10).

Tableau 10 : Nature des biomarqueurs analysés, méthodes de mesure et organes associés lors de l'expérience *in situ* d'avril 2014.

Type	Biomarqueur	Abréviations	Mesure	Organe utilisé
Indices de condition	Indice de condition de Fulton	K	Mesures et pesées	Poisson entier
	Indice hépatosomatique	HSI		
Système immunitaire	Nécrose leucocytaire	Nec.	Cytométrie en flux	Rate
	Apoptose leucocytaire	Apop.		
	Pourcentage de lymphocytes	Ly		
	Intégrité de la membrane lysosomale	IML		
	Activité oxydative basale	ROS b.		
	Activité oxydative stimulée	ROS s.		
	Index de stimulation de la flambée oxydative	SI		
Capacité de phagocytose	Phago.			
Système Antioxydant	Catalase	CAT	Dosages biochimiques	Foie
	Superoxyde dismutase	SOD		
	Glutathion total	GSH		
	Glutathion reductase	Gr		
	Glutathion-S-transférase	GST		
	Glutathion peroxydase	GPx		
Peroxydation lipidique	TBARS	TBARS	Dosage biochimique	Foie
Intégrité de l'ADN	Dommages à l'ADN	DNA	Test des comètes	Sang

Les paramètres physico-chimiques (concentrations en métaux, pH et conductivité) ont été analysés au D0 (lors de la mise en cage), au D14 ainsi qu'au D18, tandis que la température a été enregistrée continuellement (toutes les heures) grâce à une sonde immergible. La présence dans les étangs d'autres types de contaminants, dont certains hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), certains polychlorobiphényles (PCB), quelques composés organo-volatiles (COV), les cyanobactéries et six pesticides utilisés dans la région (glyphosate, AMPA, 2,4D, DCMU, atrazine and triclopyr, (GrapLimousin, 2007)) a été évaluée par le laboratoire d'analyse de l'eau de la ville de Limoges.

2.3. Principaux résultats et discussion

Les différences de concentration des cinq métaux majoritaires entre les étangs sont plus marquées que lors de la précédente expérimentation. En effet, les concentrations étaient plus élevées dans l'étang soumis aux rejets miniers que dans les deux étangs de référence (Cf. Tableau 11). Contrairement aux résultats obtenus au chapitre 4, l'étang qui a présenté les plus faibles concentrations en métaux, excepté pour le fer, est la Jonchère Saint-Maurice (Cf. Tableau 11). Aucun autre type de contaminant évalué n'était présent dans ces trois étangs (Cf. Annexe 2).

Tableau 11 : Moyenne des concentrations des cinq métaux majoritaires (en µg/L) dans les étangs de Haute-Vienne lors de l'expérimentation d'avril 2014. Les écart-types ou les autres paramètres physico-chimiques analysés peuvent être observés dans le tableau 1 de l'article scientifique. C : étang contaminé. R : étang de référence, LD : limite de détection.

Etang	U	Al	Fe µg/L	Mn	Ba	HAP, PCB, COV, cyanobactéries et pesticides
Pontabrier (C)	38,1	83,7	316,4	46,4	35,1	
Malessard (R)	0,2	57,9	200,0	28,5	22,8	< LD
Jonchère Saint-Maurice (R)	0,0	19,7	249,8	21,2	22,7	

Concernant les épinoches qui ont reçu l'injection de PBS, un stress oxydant a été mis en évidence, lié à la présence de la contamination polymétallique, comme dans l'expérience précédente (Cf. Ch 4, partie 1). En effet, les épinoches encagées dans l'étang contaminé ont présenté une activité oxydative basale et une peroxydation lipidique plus importantes, tandis que leurs activités antioxydantes (GST, CAT et SOD) étaient plus faibles en comparaison à celles des poissons encagés dans les étangs de référence. Cependant, les dommages à l'ADN étaient plus faibles pour les épinoches encagées dans l'étang de Pontabrier, ce qui indiquerait la présence d'un autre stress non quantifié dans les étangs de référence. Les poissons encagés dans l'étang de Pontabrier ont présenté un indice de condition K plus faible que les poissons encagés dans les étangs de référence, résultat déjà observé lors de la dernière expérimentation *in situ* (Cf. Ch. 4, partie 1).

Des différences entre les réponses enregistrées chez des épinoches encagées dans un même étang, mais ayant subi une injection de PBS ou de LPS, ont été notées. De nombreuses similitudes d'effet du stress biologique entre les résultats obtenus au laboratoire et sur le terrain ont pu être observées :

- augmentation de la nécrose leucocytaire,
- augmentation de l'apoptose leucocytaire (à Pontabrier et Malessard),
- augmentation de la production d'ERO stimulée par le phorbol myristate acétate (PMA),
- augmentation de l'index de stimulation de la flambée oxydative,
- augmentation de la capacité de phagocytose (à Pontabrier et Malessard),
- diminution de l'activité de la GST (à Malessard et la Jonchère Saint-Maurice).

Cependant, les seules différences significatives observées sur le terrain étaient l'augmentation de la capacité de phagocytose et de l'apoptose leucocytaire à la Jonchère Saint-Maurice, ainsi qu'une baisse de l'activité de la GST à Pontabrier après l'injection de LPS.

Suite à l'injection de LPS, des réponses à ce stress différenciées selon l'étang ont été enregistrées. En plus de la GST, de la capacité de phagocytose (Cf. Figure 19 – 1) et de l'apoptose leucocytaire, la peroxydation lipidique avait tendance à diminuer suite à l'injection de LPS chez les poissons exposés à la plus forte contamination polymétallique (Cf. Figure 19 – 2), tandis que l'activité de la CAT semblait augmenter dans ce même étang. Une diminution de cette activité après l'injection de LPS chez les épinoches encagées dans l'étang présentant les plus faibles concentrations métalliques (Jonchère Saint-Maurice) a été observée. Les épinoches encagées dans cet étang présentaient une teneur en GSH identique après l'injection de LPS, contrairement aux résultats obtenus sur les deux autres étangs. De même une tendance à l'augmentation des dommages à l'ADN au niveau des deux étangs de référence après l'injection de LPS a été observée.

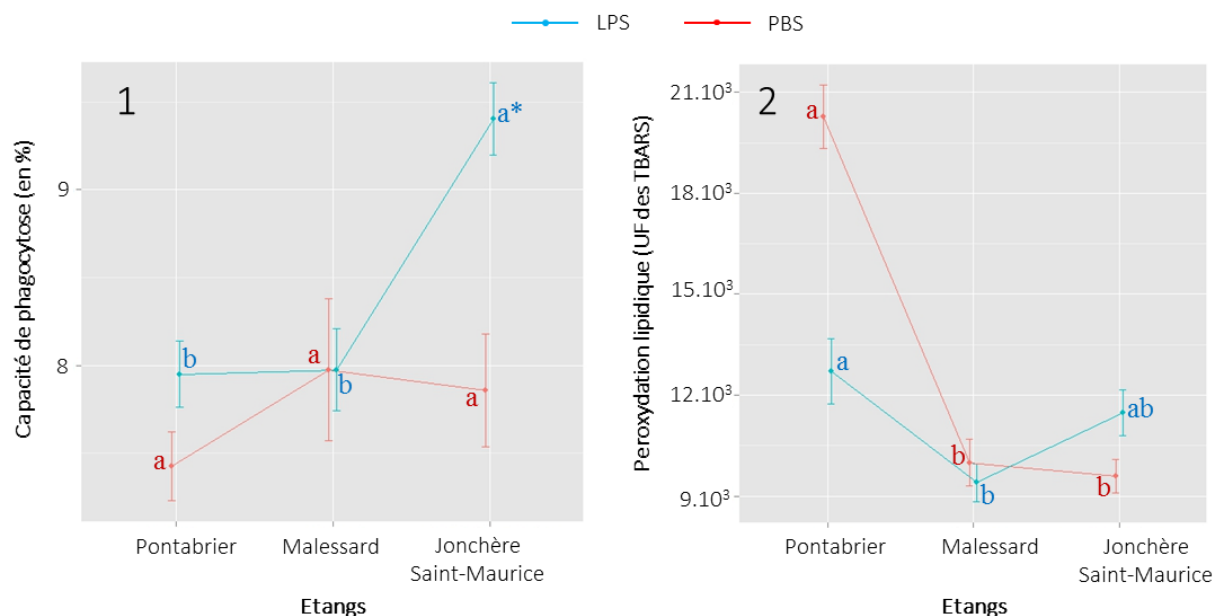


Figure 19 : Capacité de phagocytose des leucocytes (1) et peroxydation lipidique au niveau du foie des épinoches (2) en fonction des étangs et du stress biologique. Les lignes bleues représentent les résultats obtenus sur les épinoches ayant subi un stress biologique (injection de LPS), tandis que les lignes rouges représentent les résultats obtenus sur les épinoches n'ayant pas subi ce stress (injection de PBS). Les différences significatives pour ces biomarqueurs entre les étangs pour une condition d'injection sont représentées par différentes lettres minuscules ($\alpha = 5\%$). La différence significative entre les conditions d'injection (LSP et PBS) pour les épinoches engagées dans le même étang est représentée par une astérisque ($\alpha = 5\%$).

En prenant un risque α de 10 % pour les analyses statistiques, quatre biomarqueurs étaient impactés par l'interaction étang – condition d'injection : la phagocytose, la peroxydation lipidique, la CAT ainsi que le GSH.

Une explication découpée en deux parties peut être formulée sur les effets d'une exposition polymétallique sur les réponses des épinoches à un stress biologique.

- 1 - L'exposition préalable aux plus fortes concentrations métalliques a augmenté la susceptibilité des épinoches aux LPS, en ne permettant pas leur réponse phagocytaire envers les LPS ainsi qu'en empêchant le maintien des niveaux de GSH, qui a entraîné une diminution de l'activité de la GST. En effet, les épinoches engagées dans l'étang contenant les plus faibles concentrations métalliques ont présenté une stimulation de la phagocytose suite à l'injection de LPS, comme observé préalablement au laboratoire. Inversement, les pourcentages de ce biomarqueur pour les épinoches engagées dans les deux autres étangs étaient restés à un niveau plus faible que ceux retrouvés lors des études au laboratoire sans stress biologique.

En outre, les épinoches encagées dans les deux étangs avec les plus fortes concentrations métalliques n'ont pas pu maintenir leur niveau de GSH après l'injection de LPS, contrairement aux poissons de la Jonchère Saint-Maurice. Le GSH étant un substrat pour l'activité de la GST (Regoli et Principato, 1995), celle-ci a diminué significativement avec le GSH dans l'étang de Pontabrier, mais non significativement dans l'étang de Malessard.

- 2 – Les variations de la peroxydation lipidique et de la CAT ne seraient pas dues à l'interaction étang/condition d'injection. Dans les deux étangs de référence, les niveaux de TBARS correspondaient à un niveau basal de peroxydation lipidique, évalué au laboratoire, sans stress. Les variations de la peroxydation lipidique coïncidaient avec l'augmentation de l'activité de la CAT dans l'étang de Pontabrier, ce qui expliquerait donc la diminution des TBARS.

Une exposition à une combinaison métallique a entraîné une augmentation de la susceptibilité des épinoches au stress biologique soudain, en perturbant deux, voire trois réponses importantes : la capacité de phagocytose, le GSH et indirectement la GST.

3. Article scientifique

Susceptibility of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure.

Authors

Antoine Le Guernic^{1,2,3*}, Wilfried Sanchez¹, Olivier Palluel¹, Anne Bado-Nilles¹, Magali Floriani², Cyril Turies¹, Edith Chadili¹, Claire Della Vedova², Isabelle Cavalié², Christelle Adam-Guillermi², Jean-Marc Porcher¹, Alain Geffard³, Stéphane Betoulle³, Béatrice Gagnaire².

¹Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), UMR-I 02 SEBIO (Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques), BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France.

²Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Centre de Cadarache, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, France.

³Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), UMR-I 02 SEBIO, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de la Housse, B.P. 1039, 51687 Reims, France.

*Corresponding author: antoineleguernic@gmail.com, phone: +33 6 50 09 16 50.

Abstract

To get closer to the environmental reality, ecotoxicological studies should no longer consider the evaluation of a single pollutant, but rather combination of stress and their interaction. The aim of this study was to determine if responses of a fish to a sudden biological stress could be modified by a prior exposure to a chemical stress (a polymetallic contamination). For this purpose, *in situ* experiment was conducted in three ponds in the Haute-Vienne department (France). One pond was chosen for its high uranium concentration due to uranium mine tailings, and the two other ponds, which were not submitted to these tailings. Three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) were caged in these ponds for 14 days. After this period, fish were submitted to a biological stress, exerted by lipopolysaccharides injection after anesthesia, and were sacrificed four days after these injections for multi-biomarkers

analyses (leucocyte viability, phagocytic capacity and reactive oxygen species production, antioxidant peptide and enzymes, lipid peroxidation and DNA damage). The pond which received uranium mine tailings had higher metallic concentrations. Without biological stress, sticklebacks caged in this pond presented an oxidative stress, with increasing of reactive oxygen species levels, modification of some parts of the antioxidant system, and lipid peroxidation. Caging in the two most metal-contaminated ponds resulted in an increase of susceptibility of sticklebacks to the biological stress, preventing their phagocytic responses to lipopolysaccharides and modifying their glutathione contents and glutathione-S-transferase activity.

Keywords

Acclimation capacity; polymetallic contamination; lipopolysaccharides; chemical stress; biological stress; caging; three-spined stickleback.

1. Introduction

Metals, or trace metals, are certainly the most studied class of pollutants during the last century by toxicologists. All metals, including essential trace metals, are potentially hazardous at high concentrations for organisms, including fish (Förstner and Wittmann 2012; Sindayigaya et al. 1994). Metals induce an oxidative stress, by influencing reactive oxygen species (ROS) production (Ferreira et al. 2008; Sanchez et al. 2005; Sevcikova et al. 2011). For the protection against ROS, organisms can set up their antioxidant system. This system includes several enzymes, proteins and peptides produced by the liver, and their aim is to neutralize ROS (Eyckmans et al. 2011; Heier et al. 2013; Kelly and Janz 2009; Sanchez et al. 2005). The antioxidant system may also be altered by pollutants and in particular metals (Fernandez-Davila et al. 2012; Oliva et al. 2012; Qu et al. 2014). ROS can cause damage in fish, such as DNA damage, lipid peroxidation, tissue injuries (Almroth et al. 2008; Stadtman and Oliver 1991). Metals can also suppress or stimulate the immune system (Bols et al. 2001; Dunier 1996; Jolly et al. 2014; Zelikoff 1993). Almost all metals are found naturally in the Earth's crust, and a part of their toxicity for living organisms is due to their uses for human industries (Kelly and Janz 2009; Maceda-Veiga et al. 2013). Indeed, they were extracted, modifying their proportion in the different biosphere compartments and their chemical properties, making them soluble or able to cross biological membranes (Playle 1998; Spry and Wiener 1991). This is the case of uranium, essential actinide for the nuclear industry, which has been extracted in large quantities from the Earth's crust. In France, its extraction lasted over than half a century and focused in the Limousin region (IRSN 2007). Even after the end of uranium extraction, this metal is still found in former uranium mining sites with non-negligible quantities, accompanied by metals naturally present or introduced during site rehabilitation (Gagnaire et al. 2015; Herlory et al. 2013).

Even if consequences on organisms of a metal exposure are well known by ecotoxicologists, it is now important to take in consideration that these organisms are exposed to a multi-pollution rather than a mono-pollution. Indeed, the multi-stress context is indicative of the environmental reality because the aquatic animals, including fish, are rarely exposed to a single source of stress (Lorin-Nebel et al. 2013; Maceda-Veiga et al. 2013). Although ecotoxicological studies of a single stress are necessary, the effects on aquatic fauna may vary if this pressure is in combination with one or more other stress (Chou et al. 1999; Ingram 1980; Lorin-Nebel et al. 2013). Responses and process established by an organism

(acclimation capacities) against a stress, thus its susceptibility to this stress, could be modified by an exposure to another stress (Chou et al. 1999; Knittel 1981; Robohm 1986).

Immune capacities are essential defenses against biological stress, such as bacteria, viruses or parasites, preventing the development of diseases (Bols et al. 2001; Ingram 1980). A pollutant affecting this defense system can be harmful, especially when organisms are exposed to a biological stress, can increase their susceptibility to this stress, and can even result in the death of the organism (Bols et al. 2001; Brousseau et al. 1997; Dunier 1996).

The aim of this study was to determine if a prior exposure to a metallic pollution due to a former uranium mining site (chemical stress) can modify acclimation capacities, and thus susceptibility of a fish to a sudden biological stress.

This *in situ* experiment was performed using the three-spined sticklebacks. These fish are present in French aquatic ecosystems (Münzing 1963) and the temperature range at which the stickleback can live corresponds to the temperature found in the Haute-Vienne ponds (Allen and Wootton 1982). Finally, its small size facilitates its handling and caging, and its robustness has led to its frequent use in environmental and ecotoxicological studies (Pottinger et al. 2002; Sanchez et al. 2008a; Sanchez et al. 2008b). These advantages were the reasons for which we decided to work with this species for this study.

The biological stress was created through a preliminary experiment in the laboratory, using lipopolysaccharides (LPS), mimicking the impact of pathogenic contamination, and inducing an inflammatory reaction (Hang et al. 2013; Swain et al. 2008; Xiang et al. 2008). LPS were then injected in fish previously caged for 14 days in one high metal-contaminated pond, including uranium, or in two other ponds with lower metallic concentrations and without uranium. Four days after these injections, some biomarkers were analysed, including immunomarkers, markers often used for assess effects of a biological stress, and the antioxidant system, commonly used for metallic stress (Amiard and Amiard Triquet 2008).

2. Materials and methods

2.1. Determination of a biological stress and effects of anesthesia and injections.

In order to create a biological stress visible on selected biomarkers, a preliminary study in the laboratory was conducted. This experiment aimed to determine the *Escherichia coli* LPS (0127: B8, Sigma, St. Louis, MO, USA) concentration necessary to induce a biological stress and to determine the latency time between LPS injection and fish dissection to limit anesthesia and/or injection stress. The experimental design is schematized on the figure 1.

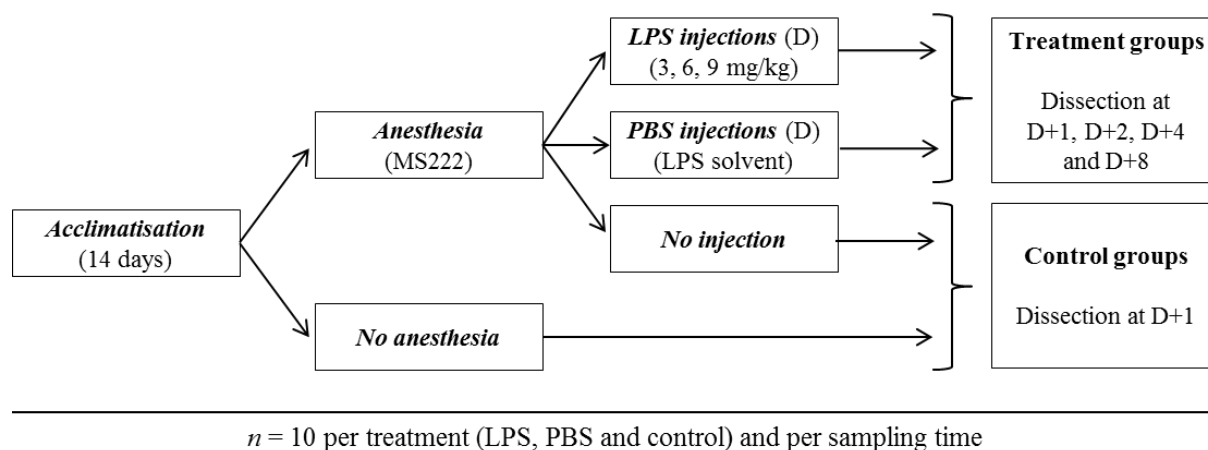


Fig. 1: Experimental design for the preliminary experiment realised in the laboratory. D: day when injection were made; MS222: tricaine methanesulfonate at 0.1 g/L; LPS: lipopolysaccharides; PBS: phosphate buffer saline.

Prior to this experiment, 180 sticklebacks (2.03 ± 0.64 g; 5.38 ± 0.72 cm) were acclimatised for two weeks in the laboratory (5 tanks with 35 liters of water; fish density: 2.32 kg/m^3 ; the third of the water volume is changed every two days.), with two tanks corresponded to control organisms, and the other three corresponded to fish submitted to the three different LPS concentrations (one tank per treatment; 3, 6 and 9 mg of LPS per kg of fish). Sticklebacks were fed every day, before their manipulation (dissection of injection), with bloodworms (ratio of food/fish of 3% w/w, Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgium).

In order to determine the biological stress, after acclimatisation step, sticklebacks were anesthetised by balneation, using tricaine methanesulfonate (MS222, 0.1 g/L, Molekula, Irvine, CA, USA), to undergo an injection of LPS or their solvent (phosphate buffer saline, PBS, Sigma) performed using Hamilton syringes (25 μL , Hamilton, Reno, NV, USA). Volumes for intraperitoneal injections were adjusted according to fish weight and never overpassed 10 μL per fish (ratio liquid/fish weight: 3.33 $\mu\text{L/g}$). After sticklebacks were awakened in an aquarium intended for this purpose, they were returned to their respective aquarium. One, two, four and eight days after these injections, ten fish per condition (PBS and the three LPS concentrations) were sacrificed by cervical dislocation.

In order to limit anesthesia and injection potential stress, a first group of ten sticklebacks was not submitted to anesthesia or injection before being sacrificed by cervical dislocation, while fish from the second control group ($n = 10$) were only anesthetised, but not submitted to injection. For these groups, dissections and analyses were made only at D+1.

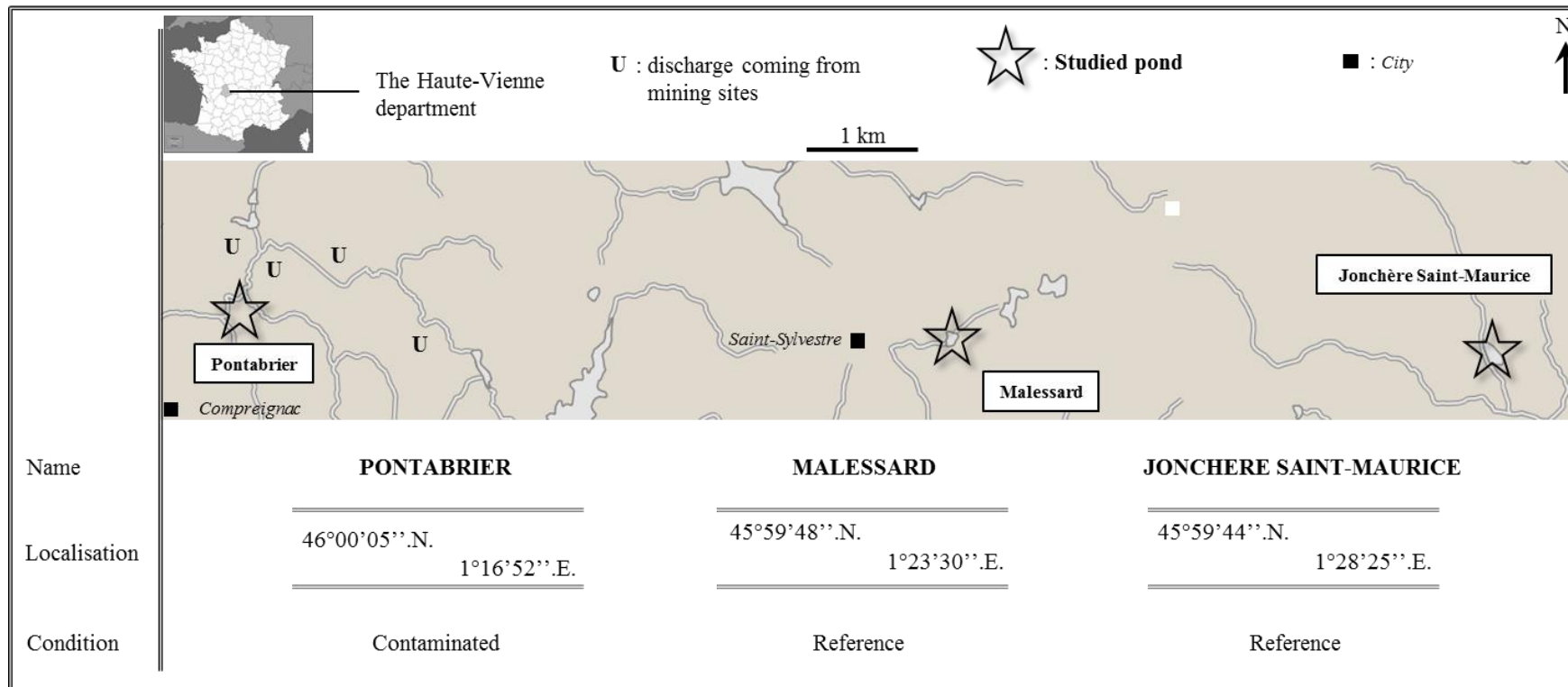


Fig. 2: Localisation of studied ponds in the Haute-Vienne department. Stars indicate the ponds and “U” indicates the discharges coming from mining sites in the Pontabrier pond. The figure also shows close-ups of the three ponds used in this study.

Total size and weight were recorded to calculate Fulton's K condition index (K), the spleen was recovered for immune capacity analyses, and the liver for antioxidant system and lipid peroxidation analyses. Detailed protocols of these analyses are described below (Part 2.3.). According to results (Appendix 1), a concentration of 9 mg of LPS/kg of fish and 4 days of latency time (D+4) were chosen compared to the other treatment and sampling time conditions.

2.2. Fish exposure to the chemical stress

2.2.1. Localisation and physical and chemical parameters of selected ponds

Three ponds were chosen according to their level of metal contamination and their proximity to uranium mining site in the Haute-Vienne department (France, Figure 2). One of these ponds received uranium tailings from former mines (the Pontabrier pond) and two other ponds without these tailings (the Malessard and Jonchère Saint-Maurice ponds) (Figure 2).

Oxygen level, pH and conductivity were measured at the beginning of the experiment and at the injection day, while temperature was continuously (each hour) recorded with a probe inside cages (HOBO Pendant Temperature Data Logger, Onset, Bourne, MA, USA). Trace metal concentrations in water (50 mL of acidified water (HNO₃, 2%, VWR, Radnor, PA, USA), non-filtered and filtered with 0.45 µm syringe filter, three replicates) were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, Agilent Model 7500 Cs, Santa Clara, CA, USA; detection limit: 10 ng/L for all metals) and major cation concentrations by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES Optima 4300DV, PerkinElmer, Wellesley, MA, USA). Major anions were measured in 50 mL of non-filtered acidified water (HNO₃, 2 %) using an ionic chromatograph (Dionex DX-120, Sunnyvale, CA, USA). Total inorganic carbon (TIC) and total organic carbon (TOC) were assessed using a TOC analyser (Schimadzu 5000A, Schimadzu Scientific Instruments, Columbia, MD, USA). Water samples from Haute-Vienne ponds were collected to analyse the presence or absence of polychlorinated biphenyls (PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), volatile organic compounds (VOCs), cyanobacteria, as well as six major pesticides used in the region (glyphosate, AMPA, 2.4D, DCMU, atrazine and triclopyr) (GrapLimousin 2007). These analyses were carried out by the regional laboratory of water control (city of Limoges, France).

2.2.2. Experimental design of the *in situ* experiment

The figure 3 summarizes the protocol used. This experiment was conducted in March and April 2014 with 90 three-spined sticklebacks coming from INERIS husbandry. To limit individual variations, fish came from the same initial fish group, were one year old and were standardized in length and weight (1.44 ± 0.18 g; 5.44 ± 0.19 cm). Before being caged, sticklebacks were acclimatised in the laboratory to the physical and chemical properties of ponds (temperature: 12°C; pH: 7; conductivity: 50 μ S/cm) for two weeks. On the field, fish were maintained in cylindrical cages (height: 460 mm; radius: 125 mm; volume: 22.58 L). These cages were divided in two parts in order to reduce the fish number used for scientific purposes. Cages were placed directly on the sediment at a water depth of 500 mm. The meshes of these cages (3.5 x 3.5 mm) prevented fish from escaping and allowed the pass of some small organisms, such as worm, larvae or plankton, being part of the diet of sticklebacks (Allen and Wootton 1984; Hynes 1950). Sticklebacks received no supplementary food intake throughout the experiment.

At each pond, 30 sticklebacks were distributed in two half-cages, one cage for the LPS condition and the other for the PBS condition (Figure 3), with a density of 2.31 kg/m³. This density was chosen between the OECD recommendations for rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and medaka (*Oryzias latipes*) densities (OECD 2000). Fourteen days after caging, sticklebacks were anesthetised by balneation with MS222 (0.1 g/L of water from ponds, Molekula) and submitted to *E.coli* LPS (9 mg of LPS/kg of fish, Sigma) or PBS (Sigma) injections. Prior to be caged once again, fish were placed in a tank filled with water from each pond until their awakening. Four days after these injections, sticklebacks were sacrificed by cervical dislocation. Total size and weight, as well as liver weight were recorded to calculate biometric indices. Blood and spleen from each fish were removed and kept at 4 °C until DNA damage and immune capacity analyses, respectively. Finally, liver used for antioxidant system and lipid peroxidation assessment was frozen in liquid nitrogen with a buffer (400 μ L of potassium phosphate buffer (100 mM, pH: 7.4, Sigma) modified with glycerol (20%, Sigma) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 2 μ M, Sigma) before being stored at -80 °C.

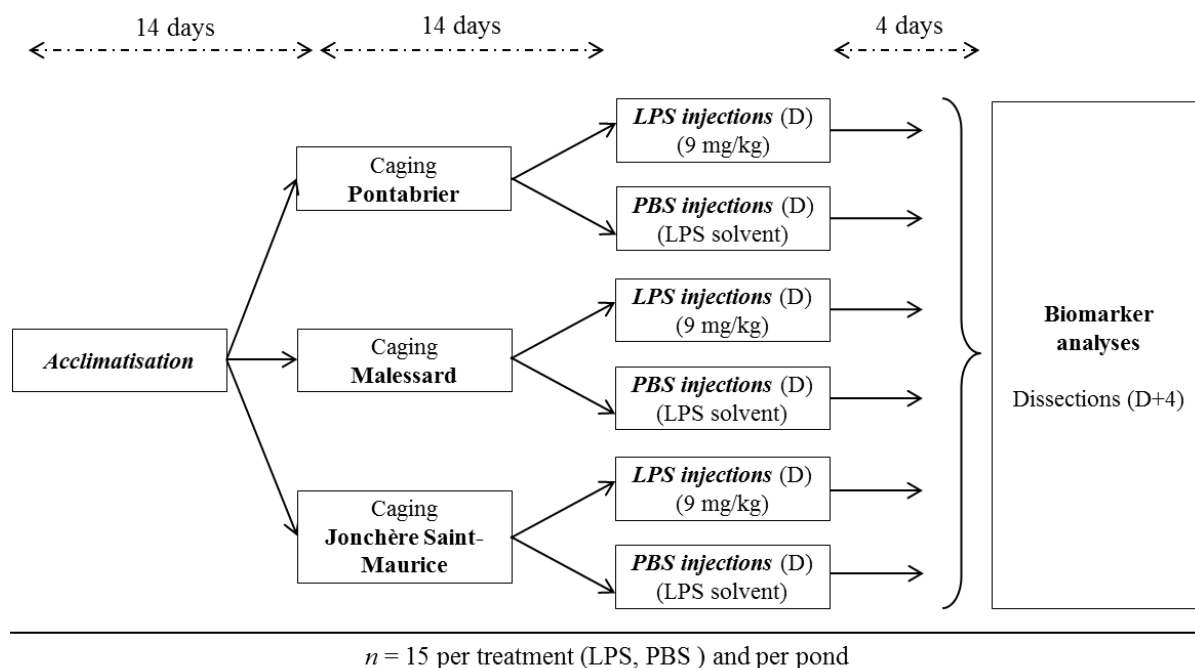


Fig. 3: Experimental design for the *in situ* experiment. D: day when injection were made; MS222: tricaine methanesulfonate at 0.1 g/L; LPS: lipopolysaccharides; PBS: phosphate buffer saline.

2.3. Biological parameters

2.3.1. Biometric indices

Fulton's K condition index evaluates the general well-being of fish and is calculated by the formula: $K = (\text{weight}/\text{length}^3) \times 100$. The hepato-somatic index (HSI) is calculated by the formula: $\text{HSI} = (\text{liver weight}/\text{total body weight}) \times 100$.

2.3.2. Immune capacities

The splenic leucocyte isolation was performed following previous described method (Bado-Nilles et al. 2014b). In the same way, the leucocyte necrosis and apoptosis, the percentage of lymphocyte among leucocytes, the lysosomal membrane integrity (LMI), the respiratory burst, and the phagocytic capacity were made and analysed following protocols previously described (Bado-Nilles et al. 2013; Bado-Nilles et al. 2014a; Chilmonczyk and Monge 1999; Gagnaire et al. 2015; Gust et al. 2013).

Phagocytic capacity was calculated as cells ingesting at least 3 fluorescent microbeads/cells ingesting at least 1 fluorescent microbead $\times 100$ (Gust et al. 2013). A visualisation of phagocytosis with transmission electron microscopy (TEM) was realised to confirm this

phagocytosis. The protocol was the same as previously described with some modifications for TEM observations. In order to have a fairly large pellet, the samples were grouped by four. The diameters of the microbeads used were 1 and 2 μm , and these beads were removed from the sample after incubation, with gentle agitation, using a bovine serum albumin gradient (3 %, 1 mL, Sigma). Centrifugation (100 g, 10 min, 4 °C) was necessary to pellet leucocytes. These pellets were fixed using glutaraldehyde (2.5 % in 0.1M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA) for 2 days at 4 °C. Samples were washed three times and were then postosmicated for 1 h in osmium tetroxide (1 % in cacodylate buffer, Electron Microscopy Sciences). They were dehydrated through a graded ethanol series and finally embedded in monomeric resin Epon 812 (Electron Microscopy Sciences). Ultrathin sections (80 and 110 nm) were obtained using an ultra-microtome (UCT, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany). For ultrastructural analysis, ultrathin sections were mounted on copper grids and examined with a Tecnai G2 Biotwin Electron Microscope (100 kV, FEI Company, Eindhoven, the Netherlands) equipped with a CCD camera Megaview III (Olympus Soft imaging Solutions GmbH, Münster, Germany).

Respiratory burst is described by three parameters: ROS basal level, which corresponds to ROS production by unstimulated cells observed with the 2'-7'-dichlorofluorescein diacetate probe (H₂DCFDA, 60 μM , Sigma); ROS activated level, which corresponds to ROS production by stimulated cells by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 15 μM , Sigma) and the stimulation index of respiratory burst, which is calculated by the formula: fluorescence of ROS activated/fluorescence of ROS basal (Chilmonczyk and Monge 1999). Leucocyte activities were evaluated by flow cytometry with 10,000 events counted for each suspension sample. Data were recovered using a Guava®EasyCyte™ 8HT flow cytometer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) and analysed using Guavasoft 2.7 software.

2.3.3. Oxidative stress

Protein concentration was assessed using Bradford (1976) method with bovine serum albumin (Sigma for both products). Among hepatic biomarkers, glutathione (GSH) (Vandeputte et al. 1994), glutathione-S-transferase (GST) (Habig et al. 1974), glutathione peroxidase (GPx) (Paglia and Valentine 1967), glutathione reductase (Gr) (Carlberg and Mannervik 1975), catalase (CAT) (Babo and Vasseur 1992), superoxide dismutase (SOD) (Paoletti et al. 1986), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) for lipid peroxidation assessment (Ohkawa et al. 1979), were analysed. All these measurements were adapted on stickleback by

Sanchez et al. (2005, 2007). Except for TBARS and GSH (fluorescence units and $\mu\text{mol/g}$ of total protein, respectively), all results were calculated in U/g of total protein.

2.3.4. DNA damage

DNA damage were assessed using comet assay described by Santos et al. (2013), with minor modifications, described below. Blood samples were kept at 4 °C in 800 μL of L15 medium Leibovitz (L15, Sigma) modified with heparin lithium (20 U/mL, Sigma), penicillin (500 U/mL, Sigma) and streptomycin (500 $\mu\text{g/mL}$, Sigma) until analysis (48 h after blood collection). Slides were transposed for 20 min instead of 40 min in an electrophoresis tank filled with electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, qsp 1.5L of osmotic water, Sigma for both products). Several genotoxicity parameters were recorded using Comet Assay 4 software. One hundred cells per slide (two slides per sample) were randomly selected for analysis.

2.4. Statistical analyses

R software (3.1.1 version) was used for all statistical analyses. The number of replicates depended to the nature of the physical and chemical studied ($n = 17$ for temperature; $n = 3$ for metals concentration; $n = 2$ for anions / cations; $n = 1$ for conductivity and pH). Differences of chemical and physical parameters between ponds were assessed using one-way ANOVA. Normality and homogeneity assumptions were assessed by the Shapiro-Wilk and Levene tests on residuals, respectively. If normality and homoscedasticity were respected, ANOVA was kept and was followed by a Tukey test, otherwise, ANOVA was replaced by a Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney test with Holm correction.

Concerning biomarkers, the number of replicates was 15 sticklebacks per injection condition and per pond. Normality and homogeneity assumptions were assessed applying respectively Shapiro Wilk and Levene tests on residuals. If at least one of these assumptions were not satisfied, a log transformation of the dependent variable was first applied and assumptions checked again. For some biomarkers the log transformation failed to reach homogeneity. In this case, a variance function was used to model the variance structure. The significance of the interaction between the variables "pond" and "injection" was assessed with the type-3 squares, and were followed, if these values were significant, by multiple comparisons (Tukey test) to observe the differences within the conditions. For all the analyses, significance level fixed at

5%. Principal component analyses (PCA) were performed with two components with all of stickleback responses, and through two dimensions.

3. Results

3.1. Determination of LPS concentrations and the latency time between injection and dissection

During the preliminary experiment performed in the laboratory, an effect of anesthesia and/or injection was observed at D+1 and/or at D+2 on several biomarkers (leucocyte necrosis, LMI, phagocytic capacity, ROS basal and activated levels, GSH, CAT, SOD and TBARS; Appendix 1). These two sampling time were therefore not retained for the *in situ* experiment.

The concentration of 9 mg of LPS per kg and a latency time of four days (D+4) were chosen because the most important effects were recorded for these conditions. Indeed, compared to other LPS concentrations, 9 mg/kg injections has resulted in significant higher ROS activated level, stimulation index of respiratory burst, and lower GSH contents, CAT and GST activities (Appendix 1). A latency time of eight days was not selected because of some biomarker levels came back to a basal level, such as ROS activated level, stimulation index of respiratory burst and phagocytic capacity compared to D+2 (Appendix 1).

Thus a concentration of 9 mg of LPS/kg of fish and 4 days of latency time (D+4) were chosen and applied in the field.

3.2. Physical and chemical properties of ponds

Although a temperature slightly higher in the Jonchère Saint-Maurice pond compared to the other two ponds (Table 1), temperature kinetic inside ponds were the same (Appendix 2). Concerning the other physical parameters, pH was higher in the Jonchère Saint-Maurice pond, while conductivity and dissolved oxygen level were higher in the Pontabrier pond (Table 1).

The Pontabrier pond, which receives mine tailings, presented the higher metallic concentrations than the other two ponds, and three of these differences were significant (Table 1). This contaminated pond presented at least twice the concentration of aluminum and manganese, and 200 times more uranium than reference ponds (Table 1). Except for iron, the Jonchère Saint-Maurice presented the lowest metallic concentrations among the three ponds (Table 1). The Pontabrier pond also presented higher concentrations of calcium, sodium, chloride, sulphate, and inorganic carbon, while all of these anions and cations were found at lower concentrations in the Malessard pond than in the other two ponds (Table 1). No other

contamination source was found in the three ponds (levels of PAHs, PCBs, VOCs, pesticides and cyanobacteria were under the detection limit).

3.3. Individual mortality

No sticklebacks died during this experiment. Moreover, no sign of stress (skin coloration, injuries, parasites), as well as no behavioural alteration, were observed after injection or after caging (abnormal reaction when out of water, no swimming).

Table 1: Physical and chemical characteristics of ponds. Data are means ± standard deviation ($n = 17$ for temperature; $n = 3$ for metals concentrations; $n = 2$ for anions / cations; $n = 1$ for conductivity and pH). Difference between ponds is indicated by different letters for $p \leq 0.05$ with $a > b > c$. DL: detection limit; T min: mean minimal temperature; T max: mean maximal temperature; Δ d/n: day/night temperature delta; C: conductivity; DO: dissolved oxygen; C inorg: total inorganic carbon; C org: total organic carbon; PCBs: polychlorinated biphenyls; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; VOCs: volatile organic compounds; 2.4D: 2.4-Dichlorophenoxyacetic acid.

		Pontabrier			Malessard			Jonchère Saint-Maurice		
Physical parameters	T min (°C)	10.48	± 1.53	b	10.77	± 1.38	b	12.22	± 1.78	a
	T max (°C)	12.22	± 1.97	b	12.68	± 2.14	b	14.31	± 2.20	a
	Δ d/n (°C)	1.75	± 0.90	a	1.91	± 1.23	a	2.04	± 1.02	a
	pH	6.84	± 0.80		7.05	± 0.22		7.34	± 0.16	
	C (µS/cm)	18.00	± 1.41		8.00	± 1.41		13.50	± 0.71	
	DO (mg/L)	13.14			12.95			11.79		
Metal concentrations	U (µg/L)	38.14	± 4.10	a	0.20	± 0.02	b	0.00	± 0.00	b
	Al (µg/L)	83.72	± 10.07	a	57.86	± 5.53	b	19.65	± 3.88	c
	Fe (µg/L)	316.38	± 56.50	a	199.96	± 36.79	a	249.76	± 64.05	a
	Ba (µg/L)	35.06	± 22.50	a	22.83	± 19.09	a	22.77	± 7.16	a
	Mn (µg/L)	46.37	± 2.60	a	28.52	± 0.39	b	21.20	± 5.20	c
Anion/cation concentrations	Mg (mg/L)	0.92	± 0.08		0.40	± 0.02		1.01	± 0.04	
	Ca (mg/L)	4.45	± 0.47		1.87	± 0.21		2.84	± 0.04	
	Na (mg/L)	5.42	± 0.18		3.21	± 0.12		4.02	± 0.09	
	K (mg/L)	1.18	± 0.06		0.70	± 0.08		1.54	± 0.01	
	Cl (mg/L)	7.06	± 0.02		4.40	± 0.10		5.97	± 0.22	
	NO ₃ (mg/L)	1.82	± 0.12		1.33	± 0.16		3.00	± 0.22	
	SO ₄ (mg/L)	7.30	± 0.47		2.13	± 0.18		2.31	± 0.08	
	C inorg (mg/L)	2.13	± 0.26		1.13	± 0.03		2.24	± 0.35	
C org (mg/L)	3.39	± 0.20		1.83	± 0.12		2.12	± 0.08		
Other analyses	Bromides, nitrites, phosphates, cyanobacteria, VOCs, PCBs, PAHs, and 6 pesticides (Triazine, AMPA, 2.4D, Diuron, Triclopyr and Glyphosate)			<			DL			

3.4. Biological effects of the chemical stress, the biological stress and both combined

3.4.1. Effects due to the chemical stress (polymetallic contamination)

For this section, only results from sticklebacks caged in the three different ponds and submitted to PBS injections are presented. Fish caged in the Pontabrier pond presented a lower condition index than fish caged in the other two ponds, and significantly with the

Malessard pond (0.83 compared to 0.97; Table 2). K was the only biometric index impacted by caging ponds.

Few components of the immune system were impacted by the polymetallic contamination. Indeed, leucocyte apoptosis, lymphocyte percentage and phagocytic capacity were similar for fish caged in the three ponds. Nevertheless, fish caged in the highest metal-contaminated pond presented the lower leucocyte necrosis (4.86 % for the Pontabrier pond significantly different to 7.98 % for the Jonchère Saint-Maurice pond; Table 2). LMI varied greatly according to ponds. This biomarker was significant higher in the Malessard pond (238 fluorescence units, FU), while it was lower in the Jonchère Saint-Maurice pond (152 FU) (Table 2).

The polymetallic contamination induced a significant increase of basal ROS production in fish caged in the Pontabrier pond (Table 2). As ROS activated level did not differ between ponds, the stimulation index (SI) of respiratory burst was twice and significant reduced by exposure to the Pontabrier pond compared to the reference ponds (Table 2).

Concerning the antioxidant system, some activities were significantly stimulated in the most metal-contaminated pond than in the reference ponds, such as SOD and GST (Table 2). Gr was significantly higher in the Malessard pond than in the Jonchère Saint-Maurice pond while GSH amount were significantly lower in this pond (Table 2). Finally, GPx and CAT were not impacted by exposure to the different ponds when sticklebacks were submitted to a PBS injection (Table 2).

Lipid peroxidation was twice higher in fish liver from the uranium-contaminated pond compared to the other ponds (from about 10,000 FU to about 20,000 FU; Table 2). Interestingly, DNA damage were significantly higher in the lowest metal-contaminated pond compared to in the highest metal-contaminated pond (Table 2).

3.4.2. Effects due to the biological stress (LPS injection)

Only three effects due to LPS observed in the laboratory were also reported on the field, depending on the pond (Table 2 and Table 3). In fact, almost all effects were also observed, but were only trends, and were not significant. These similarities are reported in the table 4. In addition to these similarities, leucocyte necrosis and apoptosis tended to increase in each pond after LPS injection compared to PBS injection, with a significant increase of apoptosis in the Jonchère-Saint-Maurice pond (Table 2). These effects were also noted during the preliminary experiment, but eight days after LPS injections (Appendix 1). Nonetheless, the leucocyte

apoptosis, as well as the phagocytic capacity were significantly higher after LPS injection compared to the solvent injection for fish caged in the Jonchère Saint-Maurice (Table 2). Concerning antioxidant system, only a significant decrease of GST activity due to LPS injection was reported for fish caged in the contaminated pond (Table 2).

3.4.3. Impacts of the chemical stress on fish responses to the biological stress

PCA were performed using two dimensions, representing 35% of the total inertia. Axis 1 is mainly explained (> 10 %) by five biomarkers (leucocyte necrosis, respiratory burst stimulation index, GSH, GST and TBARS) while axis 2 is mainly explained by four biomarkers (leucocyte apoptosis, LMI, ROS activated and Gr) (Figure 4). The circles of ponds (explicative variable) did not overlap (Figure 4A), whereas those of injection conditions overlapped (Figure 4B). However, ponds, like the injection conditions, were not distributed according to axes (PC1 or PC2), hence the need to assess the interactions between stress on biomarkers measured.

Exposure to the polymetallic contamination impacted some responses to LPS injection. These significant interactions between pond and injection of LPS were scored in the table 3. Phagocytic capacity and TBARS were impacted by both stress ($p = 2.33 \times 10^{-2}$ and $p = 2.89 \times 10^{-8}$, respectively), as well as for GSH and CAT if we considered a higher p -value ($p = 5.44 \times 10^{-2}$ and $p = 7.20 \times 10^{-2}$, respectively) (Table 3).

Lipid peroxidation tended to decrease in liver from fish caged in the uranium-contaminated pond after LPS injections (from 20,000 to 12,700 FU), while not in the other two ponds (Tables 2 and 3). In addition to this difference, some other differences were observed in the lowest metal-contaminated pond (the Jonchère Saint-Maurice pond). The phagocytic capacity was significantly enhanced by LPS injection when fish were caged in this pond (from 7.9 to 9.4 %; Table 2). A less pronounced difference (not significant) was the decrease of GSH levels after LPS injections in the Pontabrier and the Malessard ponds, but not in the lowest contaminated pond (a loss of about 3 U/g of total protein; Table 2). The catalase activity decreased after LPS injections in the Jonchère Saint-Maurice pond (- 209,000 U/g of total protein; Table 2), whereas an increase in the Pontabrier pond was reported (+ 137,000 U/g of total protein; Table 2).

Table 2: Biomarker responses in three-spined sticklebacks caged in the Haute-Vienne ponds from according to LPS or PBS injections. Values are means \pm standard error of the mean ($n = 15$). Inside each injection condition, difference between ponds is indicated by different letters for $p \leq 0.05$ with $a > b > c$. Bolded means show a significant difference between LPS and PBS condition for the same pond. K: condition factor; HSI: hepato-somatic index; Necrosis: leucocyte necrosis; Apoptosis: leucocyte apoptosis; Lympho: lymphocyte percentage; LMI: lysosomal membrane integrity; Pg: phagocytic capacity; ROS b.: ROS basal level; ROS a.: ROS activated; SI: stimulation index of respiratory burst; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; GST: Glutathione-S-transferase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; DNA: DNA damage; FU: fluorescence unit.

Biomarkers	K	PBS						LPS					
		Pontabrier		Malessard		Jonchère Saint-Maurice		Pontabrier		Malessard		Jonchère Saint-Maurice	
Biometric data		0.83 \pm 0.02	b	0.97 \pm 0.03	a	0.89 \pm 0.02	ab	0.83 \pm 0.02	b	0.92 \pm 0.01	a	0.91 \pm 0.03	a
	HSI	4.25 \pm 0.19	a	4.14 \pm 0.25	a	3.96 \pm 0.23	a	4.48 \pm 0.25	a	4.51 \pm 0.16	a	3.99 \pm 0.28	a
	Necrosis (%)	4.86 \pm 0.60	b	6.64 \pm 0.58	a	7.98 \pm 0.84	a	5.99 \pm 0.49	b	7.16 \pm 0.43	b	9.58 \pm 0.75	a
	Apoptosis (%)	9.89 \pm 0.84	a	13.02 \pm 1.22	a	8.20 \pm 0.96	a	13.08 \pm 0.76	a	15.13 \pm 1.28	a	12.62 \pm 0.74	a
	Lympho (%)	86.21 \pm 1.36	a	86.37 \pm 1.09	a	85.10 \pm 1.07	a	85.39 \pm 0.91	a	83.74 \pm 0.85	a	82.69 \pm 0.80	a
Immune capacities	LMI (FU)	176.40 \pm 5.51	b	238.80 \pm 7.77	a	150.75 \pm 5.31	c	179.07 \pm 4.50	b	247.44 \pm 5.71	a	148.29 \pm 6.65	c
	Pg (%)	7.43 \pm 0.20	a	7.97 \pm 0.40	a	7.86 \pm 0.30	a	7.95 \pm 0.17	b	7.97 \pm 0.23	b	9.40 \pm 0.19	a
	ROS b. (FU)	4.83 \pm 0.28	a	3.33 \pm 0.15	b	2.67 \pm 0.26	b	4.28 \pm 0.47	a	3.34 \pm 0.47	ab	2.86 \pm 0.32	b
	ROS a. (FU)	3.46 \pm 0.20	a	4.34 \pm 0.40	a	3.74 \pm 0.42	a	3.88 \pm 0.38	a	5.60 \pm 1.44	a	4.00 \pm 0.43	a
	SI	0.73 \pm 0.04	b	1.29 \pm 0.06	a	1.39 \pm 0.08	a	0.98 \pm 0.08	b	1.53 \pm 0.10	a	1.41 \pm 0.05	a
	Gr (U/g prot)	2.25 \pm 0.51	ab	2.88 \pm 0.21	a	1.86 \pm 0.23	b	2.16 \pm 0.45	a	2.39 \pm 0.20	a	1.45 \pm 0.34	a
	GPx (U/g prot)	63.33 \pm 14.36	a	62.55 \pm 13.82	a	32.06 \pm 11.86	a	57.60 \pm 11.00	a	85.94 \pm 17.13	a	23.73 \pm 6.03	a
	GSH (μ mol/g prot)	16.71 \pm 0.99	a	15.26 \pm 0.88	a	10.75 \pm 0.76	b	14.05 \pm 0.71	a	11.29 \pm 0.80	b	10.79 \pm 0.83	b
Oxidative stress	GST (U/g prot)	2,384.95 \pm 131.77	a	2,073.16 \pm 90.21	ab	1,840.88 \pm 99.22	b	1,909.69 \pm 91.43	a	1,785.13 \pm 82.39	a	1,510.43 \pm 72.40	b
	CAT (U/g prot)	553,340.63 \pm 19,3783.60	a	276,864.24 \pm 64,217.19	a	431,742.28 \pm 78,553.05	a	691,091.49 \pm 120714.39	a	315,094.70 \pm 98235.02	b	222,348.64 \pm 59622.70	b
	SOD (U/g prot)	1,168.35 \pm 83.02	a	1,041.26 \pm 70.54	ab	845.49 \pm 123.74	b	1,104.94 \pm 68.45	a	1,016.54 \pm 81.71	a	723.22 \pm 48.87	b
	TBARS (FU)	20,269.97 \pm 939.24	a	9,994.83 \pm 696.19	b	9,589.20 \pm 505.26	b	12,708.63 \pm 966.25	a	9,399.23 \pm 571.78	b	11,481.77 \pm 684.64	ab
DNA damage	DNA (%)	10.09 \pm 1.61	b	10.98 \pm 1.99	ab	15.76 \pm 1.83	a	11.82 \pm 1.21	b	21.04 \pm 4.73	ab	25.96 \pm 5.23	a

Table 3: Interaction of effects between the chemical stress (ponds) and the biological stress (injection). Only results with a significant effect of one stress or their interaction on biomarker are noted (●: $0.05 > p \geq 0.10$; *: $0.01 > p \geq 0.05$; **: $0.001 > p \geq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$). K: condition factor; HSI: hepato-somatic index; Necrosis: leucocyte necrosis; Apoptosis: leucocyte apoptosis; Lympho: lymphocyte percentage; LMI: lysosomal membrane integrity; Pg: phagocytic capacity; ROS b.: ROS basal level; ROS a.: ROS activated; SI: stimulation index of respiratory burst; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; GST: Glutathione-S-transferase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; DNA: DNA damages.

Biomarkers	Two-way ANOVA (<i>p</i> -value)			
	Pond	Injection	Pond × Injection	
Biometric data	K	*		
	HSI			
Immune capacities	Necrosis	***	●	
	Apoptosis		**	
	Lympho			
	LMI	***		
	Pg	***	**	*
	ROS b.	***		
	ROS a.			
	SI	***		
	Gr	*	●	
	GPx			
Oxidative stress	GSH	*		●
	GST	*	*	
	CAT	**		●
	SOD	**		
	TBARS	**	●	***
DNA damage	DNA	*		

4. Discussion

4.1. Polymetallic contamination linked to former uranium mines

As previously described, the Pontabrier pond presented the highest metallic concentrations, especially for uranium, due to tailings from several former uranium mines, result corroborated by some studies (Gagnaire et al. 2015; Herlory et al. 2013; Marques et al. 2013; Pereira et al. 2008). This higher metallic contamination was accompanied by calcium and sulphate contents, more important in this pond. Iron concentrations were important for the three studied ponds (≥ 0.2 mg/L), and generally found at high concentrations closed to former uranium mining site in this department. This metal, with the manganese, constitute the chemical signature of water in these abandoned mines (GEP 2010).

Compared to the metallic concentrations in the same ponds and the same period but the previous year (Le Guernic et al. submitted), the metallic contamination found in the Pontabrier pond did not differ, except for a slight increase of uranium concentration for the

second year. Nonetheless, compared to the first year (April 2013), metal concentrations measured in the Malessard pond in the present study were higher, while iron and aluminum concentrations in the Jonchère Saint-Maurice decreased, inducing that the lower metal concentrations were found in this study for the Jonchère Saint-Maurice pond.

Concerning potential confounding factors, daily variations of temperature (Appendix 2) were identical between the ponds. Nonetheless, the Jonchère Saint-Maurice pond had warmer water than the other two ponds (+ 1.50 °C compared to the Malessard pond and + 2 °C compared to the Pontabrier pond). No study have assessed the effect of a temperature difference of 2 °C, and the lowest temperature difference having led to an effect on the fish (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* and Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*) was + or - 4 °C (Hardie et al. 1994; Ndong et al. 2007). Regarding conductivity levels, this parameter was quite low (from 8 to 18 µS/cm). These values were nevertheless common in this department as reported by Gagnaire et al. (2015) and Le Guernic et al. (submitted). Finally, dissolved oxygen levels were high (from 11.79 to 13.14 mg/L), resulting in a hyperoxic context (Caldwell and Hinshaw 1994; Cuenco et al. 1985). Recorded temperature and pH, closed to neutrality, were in the range of stickleback's well-being (Sanchez 2007; Wootton 1984). Moreover, the small difference of these four parameters between ponds, lack of data on small temperature differences and the acclimatisation step before caging allowed to consider these environmental parameters as negligible and not affecting the biological responses of the stickleback.

4.2. Polymetallic contamination effects on stickleback health (without LPS)

The polymetallic contamination found in the Pontabrier pond seemed to have an effect on fish condition. Indeed, Fulton condition index was lower in this pond compared to the other two ponds. Other studies have shown this same effect on condition index due to metals (Kerambrun et al. 2012; Laroche et al. 2002; Roussel et al. 2007). Two weeks of metallic exposure appeared to be a short period to decrease the condition index of an adult fish. This lower K in the Pontabrier pond could be due to a potential difference of food intake by fish between ponds. Pottinger et al. (2002) have reported a decrease of stickleback condition index after two weeks of complete starvation. HSI was not impacted by the polymetallic contamination for 14 days. This result was corroborated with other studies (Maceda-Veiga et al. 2013; Roussel et al. 2007).

Table 4: Comparison of LPS effects on biomarkers between the laboratory and the *in situ* experiments. Each effect (increase: ↗ or decrease: ↘) is followed by its significance (S: significant effect; NS: non-significant effect). For some caging conditions, no effect was observed (∅). Pg: phagocytic capacity; ROS a.: ROS activated; SI: stimulation index of respiratory burst; GSH: total glutathione; GST: Glutathione-S-transferase; CAT: catalase.

Effects of LPS on biomarker	Significant effect (S) or not (NS)							
	Laboratory		Pontabrier		Malessard		Jonchère Saint-Maurice	
Pg	↗	S	∅	∅	↗	NS	↗	S
ROS a.	↗	S	↗	NS	↗	NS	↗	NS
SI	↗	S	↗	NS	↗	NS	∅	∅
GSH	↘	S	↘	NS	↘	NS	∅	∅
GST	↘	S	↘	S	↘	NS	↘	NS
CAT	↘	S	↗	NS	∅	∅	↘	NS

Metals are known to induce oxidative stress on fish (Andersen et al. 1998; Fernandez-Davila et al. 2012; Lushchak 2011; Qu et al. 2014; Sanchez et al. 2007). In our study, polymetallic exposure for 14 days also induced oxidative stress on sticklebacks. Indeed, this stress was visible by the increase of ROS basal level by splenic leucocytes. This increase in ROS basal level after metal exposure has already been observed in several studies (Farina et al. 2013; Gagnaire et al. 2014; Jolly et al. 2014; Sevcikova et al. 2011). Nonetheless, some studies highlighted a decrease of ROS basal level after metallic exposure (Gagnaire et al. 2015; Sanchez-Dardon et al. 1999). Sanchez-Dardon et al. (1999) have also observed higher decrease of respiratory burst of rainbow trout after exposure to a combination of metals. The leucocytes contained in the spleen of fish maintained in the Pontabrier pond produced a higher ROS basal level than fish caged in the other two ponds, but the polymetallic contamination did not induce an overproduction of ROS after PMA-stimulation. Thus, the respiratory burst stimulation index was lower in the Pontabrier pond. As previously described by Gagnaire et al. (2014), it is possible that the ROS production initial level at the Pontabrier pond was too high to be further stimulated by the PMA. Thus, exposure to the highest metallic concentrations induced pro-oxidant effects on three-spined sticklebacks.

The activation of the antioxidant system was shown in the uranium-contaminated pond, with higher activities of GST and CAT in fish caged in the Pontabrier pond, compared to the other two ponds.

This overproduction of basal ROS can lead to oxidative damage, such as the alteration of biological membranes, by destabilizing the lipid bilayer. This effect was observed in liver from sticklebacks caged in the Pontabrier pond, with a higher lipid peroxidation than in the other two ponds. In these reference ponds, the lipid peroxidation level was equal to that previously assessed in the laboratory, without metallic exposure (from 9,240 to 15,463 FU; Appendix 1). Several studies also reported this lipid peroxidation due to metals (Ferreira et al. 2008; Pandey et al. 2008; Ruas et al. 2008; Vieira et al. 2012). A negative correlation between LMI and TBARS should be expected, especially as some studies have shown highlighted a destabilization of lysosomal membrane after metal contamination (Moore et al. 2004; Regoli et al. 1998). However, LMI was not modified by the polymetallic contamination. This biomarker was low in the lowest contaminated pond, describing a destabilization of the biological membrane, and could be linked to the higher leucocyte necrosis for sticklebacks caged in this pond, normally impaired by a metallic exposure (Dunier 1996; Garcia-Medina et al. 2011). Nevertheless, Gagnaire et al. (2015) showed higher leucocyte mortality in roach, *Rutilus rutilus*, in a non-uranium contaminated pond.

Another known oxidative damage can be measured at the DNA levels (Barillet et al. 2005; Garcia-Medina et al. 2011; Yadav and Trivedi 2009). Nonetheless, in our study, sticklebacks caged in the lowest metal-contaminated pond presented the higher level of DNA damage. Metals are not the main factor to induce genotoxicity in fish (Wirzinger et al. 2007). Other factors can lead to DNA damage, such as temperature (Bony et al. 2008; Mitchelmore and Chipman 1998), or pH (De Andrade et al. 2004).

This low LMI and high DNA damage and leucocyte necrosis indicated that fish caged in the Jonchère Saint-Maurice pond may have been submitted to another stress than metals, not assessed in our study, such as environmental factors or food availability.

Some biomarkers did not vary among metallic contamination, such as phagocytic capacity and some antioxidant enzymes (CAT, GPx). It is important to note that the phagocytic percentage found in each pond (from 7.43 to 7.97 %) was lower than the basal level measured in the laboratory (from 8.67 to 16.20 %), or even in another *in situ* experiment (from 8.47 to 9.06 %; Le Guernic et al. (submitted)). Although this phagocytic capacity assessed by flow cytometry was low compared to with that of the literature, we affirmed these phagocytic

phenomena by TEM analyses. Indeed, the microscopic visualizations of the microbeads ingested by leucocytes confirmed that we have evaluated phagocytosis, not adhesion to the immune cell (Appendix 3).

In conclusion, fish exposed to the highest polymetallic contamination found in the Pontabrier pond were submitted to an oxidative stress, through the increase of ROS production, causing increases of GST and CAT activities and inducing a lipid peroxidation.

4.3. LPS effects on stickleback health

In the laboratory, the most important effects due to LPS were observed for immune capacities (increases of phagocytic capacity and ROS production). This is in accordance with the LPS nature. Indeed, they are known to impact the immune system of fish, by inducing an inflammatory response (Swain et al. 2008). They have many immunostimulating effects, such as the leucocytosis, increase of ROS production, phagocytosis, activating macrophage and complement system, and can also alter the antioxidant systems or the lipid and carbohydrate metabolisms (Hang et al. 2013; Jolly et al. 2014; Swain et al. 2008; Waagbø 1994; Xiang et al. 2008). Nevertheless, almost all significant effects observed in the laboratory became trends in the field (Table 4). A hypothesis to explain these differences between laboratory and *in situ* results can be linked to the difference of exposure conditions. In the laboratory, physical and chemical conditions were fixed and controlled compared to the *in situ* experiment, however fish caged in ponds were exposed to metals. The effects of LPS may be mitigated by exposure to metals in each pond.

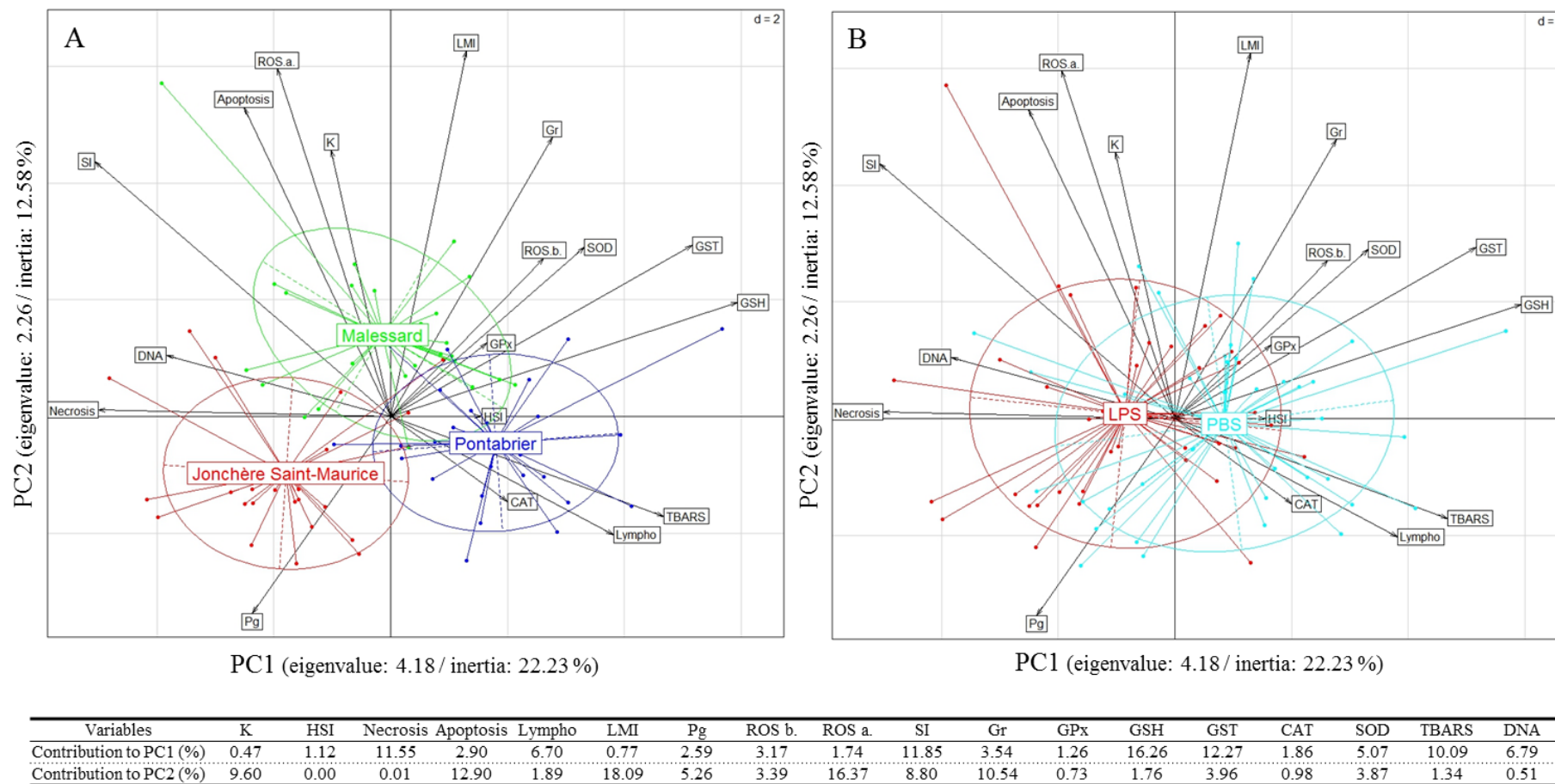


Fig. 4: PCA results representing individuals grouped according to pond (A) or to biological stress (B) (illustrative variables). Principal components (CP 1 & CP 2) are constructed from all biomarkers analysed. The number of selected dimensions is 2. Values between parentheses are the eigenvalues for each axis, followed by the inertia values. The table below summarizes the contributions to the axes of each variable (percentage). K: condition factor; HSI: hepato-somatic index; Necrosis: leucocyte necrosis; Apoptosis: leucocyte apoptosis; Lympho: lymphocyte percentage among leucocyte; Pg: phagocytic capacity; ROS b.: ROS basal; ROS a.: ROS activated; SI: stimulation index of respiratory burst; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; GST: Glutathione-S-transferase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; DNA: DNA damage.

4.4. Polymetallic contamination effects on stickleback responses to LPS injection

The literature on effects of metals on fish susceptibility to a pathogen shows two important results:

- The most recurring result is an increase of susceptibility against a biological stress. Indeed, it is well known that metals can alter defense system of fish, via destabilization of immune system, antioxidant system, etc. (Qu et al. 2014; Sanchez-Dardon et al. 1999; Sanchez et al. 2007), and these defenses are essentials for the protection against pathogens and diseases (Dunier 1996; Stolen and Fletcher 1994). Thus, immunosuppressive effects of metals can lead to a decrease of fish resistance to pathogens. Knittel (1981) hypothesized that copper caused a decreased of leucocyte number in the steelhead trout (*Salmo gairdneri*), required for the immune defense against the *Yersinia ruckeri* infection. Prior exposure to metals can also reduce the phagocytosis activity, the ROS production, deteriorate immune cells or even alter the organic tissues (El-Boshy and Taha 2011; Sheir and Handy 2010; Stolen and Fletcher 1994). All these effects can then lead to increased susceptibility to pathogens. Metals can impair the acquired immunity by reducing the number of produced antibodies. This was the case for the cat fish (*Heteropneustis fossilis*) after cadmium and *Aeromonas hydrophila* exposures (Saxena et al. 1992). These effects were also observed with a metallic combination: a copper and methylmercury exposure induced alterations of the immune system of the blue gourami (*Trichopodus trichopterus*) (Roales and Perlmutter 1977). Susceptibility to pathogen does not vary only due to variations of immune system, and metals can also impact the physical condition of fish (Esteve et al. 2012).
- The second effect of a prior exposure to metals on pathogenicity, often observed in the literature, is that metals can create an immunostimulation, and thereby increase resistance against pathogens (Anderson 1996). This result has been observed by several studies. Cossarini-Dunier (1987) showed an increase of macrophage phagocytosis of *Yersinia ruckeri* after manganese exposure of the carp. Rougier et al. (1996) highlighted the fact that zinc can decrease the number of viruses found in the zebrafish (*Brachidanio rerio*). Even five metals (As, Cu, Cd, Pb et Se) can improve protection of striped bass (*Morone saxatilis*) against *Flexibacter columnaris* (MacFarlane et al. 1986). This improvement of protection against pathogen can be

very high, as reported by Ling et al. (1993) on the goldfish, where exposure to copper enhanced 15 times the resistance to *Ichthyophthirius multifiliis*.

Anderson (1992) listed some metals that could create an immunostimulation in fish, but concluded that these border between immunosuppressive and immunostimulatory effects of metals are often difficult to assess. Depending on the concentration of cadmium, metal can be beneficial or harmful to the creation of antibodies against *Bacillus cereus* in the striped bass (Robohm 1986).

In our study, two-way analysis showed some effects of the interaction of contamination and injection on fish biomarkers. The lipid peroxidation and the phagocytic capacity were impacted by both stress, as well as for CAT and GSH if the statistical significance level increased from 0.05 to 0.1.

The preliminary experiment allowed to show that LPS has stimulated immune responses, via increases of ROS activated level and phagocytic capacity. However, in the *in situ* experiment, only sticklebacks caged in the pond with the lowest metallic concentrations (the Jonchère Saint-Maurice pond) presented this phagocytic reaction to LPS. This result suggested that the caged fish in the least contaminated pond could be better able to activate their phagocytic capacity to respond to the LPS injection, contrary to fish caged in the other two ponds.

In addition to the phagocytic capacity, sticklebacks caged in this low contaminated pond maintained their GSH content after LPS injection, which was not the case of sticklebacks caged in the other two ponds. Although GSH contents were lower in the Jonchère Saint-Maurice pond than in the other two ponds, values observed in the laboratory covered all values collected in the field (from 4 to 30 $\mu\text{mol/g}$ of total proteins, in the laboratory). GST activity, which varied among ponds and injection conditions but not among their interaction, significantly decreased for fish caged in the Pontabrier pond after LPS injection. Glutathione being an essential substrate to the GST activity, its decrease has resulted in to a decline in activity of this enzyme. Studies focusing on the acclimation capacity of the antioxidant system with exposure to metals and pathogen are rare. However, it was observed a protective effect of parasite (*Ptychobothrium* sp.) on the decrease of antioxidant system of the carp (*Cyprinus carpio*) caused by a copper exposure (Dautremepuits et al. 2002).

A prior exposure to stronger metal concentrations seemed therefore increase susceptibility sticklebacks to a biological stress, preventing their phagocytic response and destabilizing their GSH level and GST activity.

Differences of LPS susceptibility were thus observed between the Pontabrier-Malessard ponds and the Jonchère Saint-Maurice pond. We can therefore hypothesise that these differences cannot be explained by the uranium concentration in the different ponds, but more by lower aluminum and manganese concentrations in the Jonchère Saint-Maurice pond compared to the other two ponds. Unfortunately, studies working on modifications of acclimation capacities to a biological stress by metals were not focused on these two metals. Several studies have reported increases of lipid peroxidation after LPS injection (Jolly et al. 2014; Sewerynek et al. 1995; Sugino et al. 1987). Despite of Requintina and Oxenkrug (2003) have observed decreases of lipid peroxidation after LPS injections at low concentrations in mammals, the tendency to decrease of TBARS after LPS injection observed in fish caged in the Pontabrier pond was probably not due to these injections. Simultaneously with this tendency to decrease of TBARS was observed a not significant increase of CAT activity. CAT can limit lipid peroxidation protecting the lipids of hydrogen peroxide. This role is shared with another enzyme, the glutathione peroxidase. Béguel (2012) has reported that CAT is preferably chosen than GPx during large quantities of H₂O₂, and can be implemented when GSH contents decrease (Kumar and Rajagopal 2003).

It should be noted that few biomarkers reacted to both stress, and the exposure to the different ponds had more effects on stickleback biomarkers than injection conditions. This result can be observed by the difference of number of biomarker impacted by the pond variable (13) and those impacted by injection variable (3), after the two-way ANOVA (Table 2). This result was confirmed by PCA, where individuals were more distributed among ponds than among injection conditions (Figure 4). Nonetheless, except for modifications of TBARS, which were more due to the CAT activity than to interaction between ponds and LPS injections, sticklebacks previously exposed to a chemical stress presented a lower resistance to the biological stress.

5. Conclusion

The aim of this study was to determine if a preliminary exposure to a polymetallic contamination could modify fish responses to a sudden biological stress. Both of these stress

had effects on fish, such as oxidative stress after the metal exposure and leucocyte apoptosis and phagocytosis after lipopolysaccharides injections. Sticklebacks previously caged in the two most metal-contaminated ponds had increased susceptibility to the biological stress exerted by lipopolysaccharides injections. This decrease of LPS resistance by metal exposure was defined by an inability of sticklebacks to activate their phagocytic response and to maintain their GSH level and GST activity after a sudden biological stress. This study showed the importance of immunomarkers within a multi-biomarkers approach to assess multi-pollution effects on three-spined sticklebacks.

As sometimes reported (Dick and Dixon 1985; Gill et al. 1992; Hetrick et al. 1979; Knittel 1981), fish can become acclimated to the presence of metals during a longer exposure. This acclimation can therefore change the effects of metals on the fish susceptibility to a biological stress. It would be interesting to increase the period of exposure to the polymetallic contamination found in the Haute-Vienne ponds preceding the biological stress (for example two months instead of two weeks) to reassess effects of this exposure on susceptibility to lipopolysaccharides.

6. Acknowledgements

The authors are deeply grateful to the owners of the different ponds for having allowed this experiment. This work was partly supported by IRSN, the financial support of the 181 DRC 46 program of the French Ministry for Ecology and Sustainable Development, and the ECCOREV research federation.

7. Ethical statement

These experiments were conducted in accordance with the European Commission's recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. The registration number for ethics of INERIS laboratory is the B60-769-02. For sampling, to avoid bias in the immune responses, no anaesthetic overdose can be used for euthanasia of sticklebacks. Indeed, in the 2010/63 / EU Directive of the European Parliament and the 22 September 2010 Council about the protection of animals used for scientific purposes, this option is envisaged "if anesthesia is incompatible with the purpose of the procedure". Therefore, sticklebacks were rapidly sacrificed by cervical dislocation followed by destruction of the brain. This method has been

approved by the Committee No. 96-CREMEAP (Regional Ethics Committee in Animal Experimentation of Picardy).

8. References

- Allen J, Wootton R (1982) The effect of ration and temperature on the growth of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of Fish Biology* 20: 409-422
- Allen JRM, Wootton RJ (1984) Temporal patterns in diet and rate of food consumption of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in Llyn Frongoch, an upland Welsh lake. *Freshwater Biology* 14: 335-346
- Almroth BC, Sturve J, Stephensen E, Holth TF, Förlin L (2008) Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Marine environmental research* 66: 271-277
- Amiard J-C, Amiard Triquet C (2008) Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. *Lavoisier*.
- Andersen F, Lygren B, Maage A, Waagbø R (1998) Interaction between two dietary levels of iron and two forms of ascorbic acid and the effect on growth, antioxidant status and some non-specific immune parameters in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts. *Aquaculture* 161: 437-451
- Anderson DP (1992) Immunostimulants, adjuvants, and vaccine carriers in fish: applications to aquaculture. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 281-307
- Anderson DP (1996) Environmental factors in fish health: immunological aspects. *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*: 289-310
- Babo S, Vasseur P (1992) *In vitro* effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology* 22: 61-68
- Bado-Nilles A, Betoulle S, Geffard A, Porcher JM, Gagnaire B, Sanchez W (2013) Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology. *Environmental science and pollution research international* 20: 2692-2704
- Bado-Nilles A et al. (2014a) Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus* sp. *Environ Pollut* 184: 9-17

- Bado-Nilles A, Techer R, Porcher JM, Geffard A, Gagnaire B, Betoulle S, Sanchez W (2014b) Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Environmental toxicology and pharmacology* 38: 672-683
- Barillet S, Buet A, Adam C, Devaux A, Devaux A (2005) Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection* 40: S175-S181
- Béguel JP (2012) Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*. Thesis of l'Université de Bretagne occidentale
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE (2001) Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25: 853-873
- Bony S, Gillet C, Bouchez A, Margoum C, Devaux A (2008) Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquatic toxicology* 89: 197-203
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254
- Brousseau P, Dunier M, Deschaux P, De Guise S, Krzystyniak K, Fournier M (1997) Marqueurs immunologiques. L. Lagadic et al: 287-315
- Caldwell CA, Hinshaw J (1994) Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture* 126: 183-193
- Carlberg I, Mannervik B (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250: 5475-5480
- Chilmonczyk S, Monge D (1999) Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & shellfish immunology* 9: 319-333
- Chou H-Y, Peng T-Y, Chang S-J, Hsu Y-L, Wu J-L (1999) Effect of heavy metal stressors and salinity shock on the susceptibility of grouper (*Epinephelus* sp.) to infectious pancreatic necrosis virus. *Virus Research* 63: 121-129
- Cossarini-Dunier M (1987) Effects of the pesticides atrazine and lindane and of manganese ions on cellular immunity of carp, *Cyprinus carpio*. *Journal of Fish Biology* 31: 67-73
- Cuenco ML, Stickney RR, Grant WE (1985) Fish bioenergetics and growth in aquaculture ponds: II. Effects of interactions among, size, temperature, dissolved oxygen, unionized ammonia and food on growth of individual fish. *Ecological Modelling* 27: 191-206

- Dautremepuits C, Betoulle S, Vernet G (2002) Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1573: 4-8
- De Andrade VM, da Silva J, da Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML, de Freitas TRO (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44: 459-468
- Dick PT, Dixon DG (1985) Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology* 26: 475-481
- Dunier M (1996) Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Italian Journal of Zoology* 63: 303-309
- El-Boshy M, Taha R (2011) Effects of mercuric chloride on the immunological, hematological, biochemical parameters and diseases resistance of Nile Tilapia challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Nat Sci* 9: 7-15
- Esteve C, Alcaide E, Ureña R (2012) The effect of metals on condition and pathologies of European eel (*Anguilla anguilla*): *In situ* and laboratory experiments. *Aquatic toxicology* 109: 176-184
- Eyckmans M, Celis N, Horemans N, Blust R, De Boeck G (2011) Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquat Toxicol* 103: 112-120
- Farina M, Avila DS, da Rocha JBT, Aschner M (2013) Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry international* 62: 575-594
- Fernandez-Davila ML, Razo-Estrada AC, Garcia-Medina S, Gomez-Olivan LM, Pinon-Lopez MJ, Ibarra RG, Galar-Martinez M (2012) Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae, *Ctenopharingodon idella*). *Ecotoxicology and environmental safety* 76: 87-92
- Ferreira M, Caetano M, Costa J, Pousao-Ferreira P, Vale C, Reis-Henriques MA (2008) Metal accumulation and oxidative stress responses in, cultured and wild, white seabream from Northwest Atlantic. *The Science of the total environment* 407: 638-646
- Förstner U, Wittmann GTW (2012) Metal pollution in the aquatic environment. *Springer Science & Business Media*

- Gagnaire B et al. (2015) Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of *in situ* metal toxicity. *Ecotoxicology* 24: 215-231
- Gagnaire B, Bado-Nilles A, Sanchez W (2014) Depleted uranium disturbs immune parameters in zebrafish, *Danio rerio*: an *ex vivo/in vivo* experiment. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 426-435
- Garcia-Medina S, Razo-Estrada C, Galar-Martinez M, Cortez-Barberena E, Gomez-Olivan LM, Alvarez-Gonzalez I, Madrigal-Bujaidar E (2011) Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comparative biochemistry and physiology Toxicology & pharmacology* : CBP 153: 113-118
- GEP (2010) Recommandations pour la gestion des anciens sites miniers d'uranium en France. *Des sites du Limousin aux autres sites du court aux moyen et long termes.*
- Gill TS, Bianchi CP, Epple A (1992) Trace metal (Cu and Zn) adaptation of organ systems of the American eel, *Anguilla rostrata*, to external concentrations of cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 102: 361-371
- GrapLimousin (2007) Mesures des pesticides en Limousin. *Bilan du suivi 2007*
- Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagne F (2013) Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat Toxicol* 126: 393-403
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139
- Hang BT, Milla S, Gillardin V, Phuong NT, Kestemont P (2013) In vivo effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish & shellfish immunology* 34: 339-347
- Hardie LJ, Fletcher TC, Secombes CJ (1994) Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 18: 57-66
- Heier LS et al. (2013) Sublethal effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to mixtures of copper, aluminium and gamma radiation. *Journal of environmental radioactivity* 121: 33-42

- Herlory O, Bonzom JM, Gilbin R, Frelon S, Fayolle S, Delmas F, Coste M (2013) Use of diatom assemblages as biomonitor of the impact of treated uranium mining effluent discharge on a stream: case study of the Ritord watershed (Center-West France). *Ecotoxicology* 22: 1186-1199
- Hetrick FM, Knittel MD, Fryer JL (1979) Increased susceptibility of rainbow trout to infectious hematopoietic necrosis virus after exposure to copper. *Applied and environmental microbiology* 37: 198-201
- Hynes H (1950) The food of fresh-water sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* and *Pygosteus pungitius*), with a review of methods used in studies of the food of fishes. *The journal of animal ecology*: 36-58
- Ingram GA (1980) Substances involved in the natural resistance of fish to infection - A review. *Journal of Fish Biology* 16: 23-60
- IRSN (2007) Inventaire national des sites miniers d'uranium.
- Jolly S et al. (2014) Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environmental Science and Pollution Research* 21: 13103-13117
- Kelly JM, Janz DM (2009) Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. *Aquat Toxicol* 92: 240-249
- Kerambrun E, Henry F, Perrichon P, Courcot L, Meziane T, Spilmont N, Amara R (2012) Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquat Toxicol* 108: 130-140
- Knittel MD (1981) Susceptibility of steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson to redmouth infection *Yersinia ruckeri* following exposure to copper. *Journal of Fish Diseases* 4: 33-40
- Kumar PA, Rajagopal G (2003) Lipid peroxidation in erythrocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian journal of clinical biochemistry* 18: 71-74
- 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* 21: 2705-2712

- Le Guernic A et al. (submitted) *In situ* effects of metal contamination from former uranium mining sites on the three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*, L.) health. *Ecotoxicology*
- Ling KH, Sin YM, Lam TJ (1993) Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot disease) in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 118: 23-35
- Lorin-Nebel C et al. (2013) Individual and combined effects of copper and parasitism on osmoregulation in the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquatic toxicology* 130-131: 41-50
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 101: 13-30
- Maceda-Veiga A, Monroy M, Navarro E, Viscor G, de Sostoa A (2013) Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean river. *The Science of the total environment* 449: 9-19
- MacFarlane RD, Bullock GL, McLaughlin JJA (1986) Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. *Transactions of the American Fisheries Society* 115: 227-231
- Marques SM, Chaves S, Goncalves F, Pereira R (2013) Evaluation of growth, biochemical and bioaccumulation parameters in *Pelophylax perezi* tadpoles, following an *in-situ* acute exposure to three different effluent ponds from a uranium mine. *The Science of the total environment* 445-446: 321-328
- Mitchelmore C, Chipman J (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399: 135-147
- Moore MN, Lowe D, Köhler A (2004) Biological effects of contaminants: measurement of lysosomal membrane stability. *International Council for the Exploration of the Sea*, vol 36.
- Münzing J (1963) The evolution of variation and distributional patterns in European populations of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Evolution*: 320-332
- Ndong D, Chen Y-Y, Lin Y-H, Vaseeharan B, Chen J-C (2007) The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish & shellfish immunology* 22: 686-694
- OECD (2000) Eleventh addendum to the OECD guidelines for testing of chemicals. *OECD Publishing*

- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95: 351-358
- Oliva M, Jose Vicente J, Gravato C, Guilhermino L, Dolores Galindo-Riano M (2012) Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial variation. *Ecotoxicology and environmental safety* 75: 151-162
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 70: 158-169
- Pandey S et al. (2008) Effects of exposure to multiple trace metals on biochemical, histological and ultrastructural features of gills of a freshwater fish, *Channa punctate*. *Bloch Chemico-biological interactions* 174: 183-192
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical biochemistry* 154: 536-541
- Pereira R, Antunes SC, Marques SM, Goncalves F (2008) Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I soil chemical characterization. *The Science of the total environment* 390: 377-386
- Playle RC (1998) Modelling metal interactions at fish gills. *Science of the Total Environment* 219: 147-163
- Pottinger T, Carrick T, Yeomans W (2002) The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish Biology* 61: 207-229
- Qu R, Feng M, Wang X, Qin L, Wang C, Wang Z, Wang L (2014) Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat Toxicol* 150: 9-16
- Regoli F, Nigro M, Orlando E (1998) Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic toxicology* 40: 375-392
- Requintina PJ, Oxenkrug GF (2003) Differential effects of lipopolysaccharide on lipid peroxidation in F344N, SHR rats and BALB/c mice, and protection of melatonin and NAS against its toxicity. *Ann N Y Acad Sci* 993: 325-333
- Roales RR, Perlmutter A (1977) The effects of sub-lethal doses of methylmercury and copper, applied singly and jointly, on the immune response of the blue gourami (*Trichogaster*

- trichopterus*) to viral and bacterial antigens. *Archives of environmental contamination and toxicology* 5: 325-331
- Robohm RA (1986) Paradoxical effects of cadmium exposure on antibacterial antibody responses in two fish species: Inhibition in cunners (*Tautoglabrus adspersus*) and enhancement in striped bass (*Morone saxatilis*). *Veterinary immunology and immunopathology* 12: 251-262
- Rougier F, Menudier A, Bosgiraud C, Nicolas J (1996) Copper and zinc exposure of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton–Buchaman): effects in experimental listeria infection. *Ecotoxicology and environmental safety* 34: 134-140
- Roussel H, Joachim S, Lamothe S, Palluel O, Gauthier L, Bonzom JM (2007) A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: individual and population responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat Toxicol* 82: 272-280
- Ruas CB, Carvalho Cdos S, de Araujo HS, Espindola EL, Fernandes MN (2008) Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicology and environmental safety* 71: 86-93
- Sanchez-Dardon J et al. (1999) Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*. *Environmental toxicology and chemistry* 18: 1492-1497
- Sanchez W (2007) Approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.): un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux. Thesis of Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS
- Sanchez W, Ait-Aissa S, Palluel O, Ditche JM, Porcher JM (2007) Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16: 279-287
- Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, Ditche JM, Porcher JM (2008a) Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environment international* 34: 490-498
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Ait-Aissa S (2005) Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental toxicology and pharmacology* 19: 177-183
- Sanchez W, Piccini B, Ditche JM, Porcher JM (2008b) 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: 791-798
- Santos R, Palos-Ladeiro M, Besnard A, Porcher JM, Bony S, Sanchez W, Devaux A (2013) Relationship between DNA damage in sperm after ex vivo exposure and abnormal embryo development in the progeny of the three-spined stickleback. *Reprod Toxicol* 36: 6-11
- Saxena M, Gopal K, Jones W, Ray P (1992) Immune responses to *Aeromonas hydrophila* in cat fish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 48: 194-201
- Sevcikova M, Modra H, Slaninova A, Svobodova Z (2011) Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet Med* 56: 537-546
- Sewerynek E, Melchiorri D, Reiter RJ, Ortiz GG, Lewinski A (1995) Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin. *European Journal of Pharmacology: Environmental Toxicology and Pharmacology* 293: 327-334
- Sheir SK, Handy RD (2010) Tissue injury and cellular immune responses to cadmium chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: Modulation by lipopolysaccharide. *Archives of environmental contamination and toxicology* 59: 602-613
- Sindayigaya E, Van Cauwenbergh R, Robberecht H, Deelstra H (1994) Copper, zinc, manganese, iron, lead, cadmium, mercury and arsenic in fish from Lake Tanganyika, Burundi. *Science of the Total Environment* 144: 103-115
- Spry DJ, Wiener JG (1991) Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: A critical review. *Environmental Pollution* 71: 243-304
- Stadtman E, Oliver C (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 266: 2005-2008
- Stolen JS, Fletcher TC (1994) Modulators of fish immune responses. Volume 1. Models for environmental toxicology/biomarkers immunostimulators. *DTIC Document*
- Sugino K, Dohi K, Yamada K, Kawasaki T (1987) The role of lipid peroxidation in endotoxin-induced hepatic damage and the protective effect of antioxidants. *Surgery* 101: 746-752
- Swain P, Nayak SK, Nanda PK, Dash S (2008) Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish & shellfish immunology* 25: 191-201

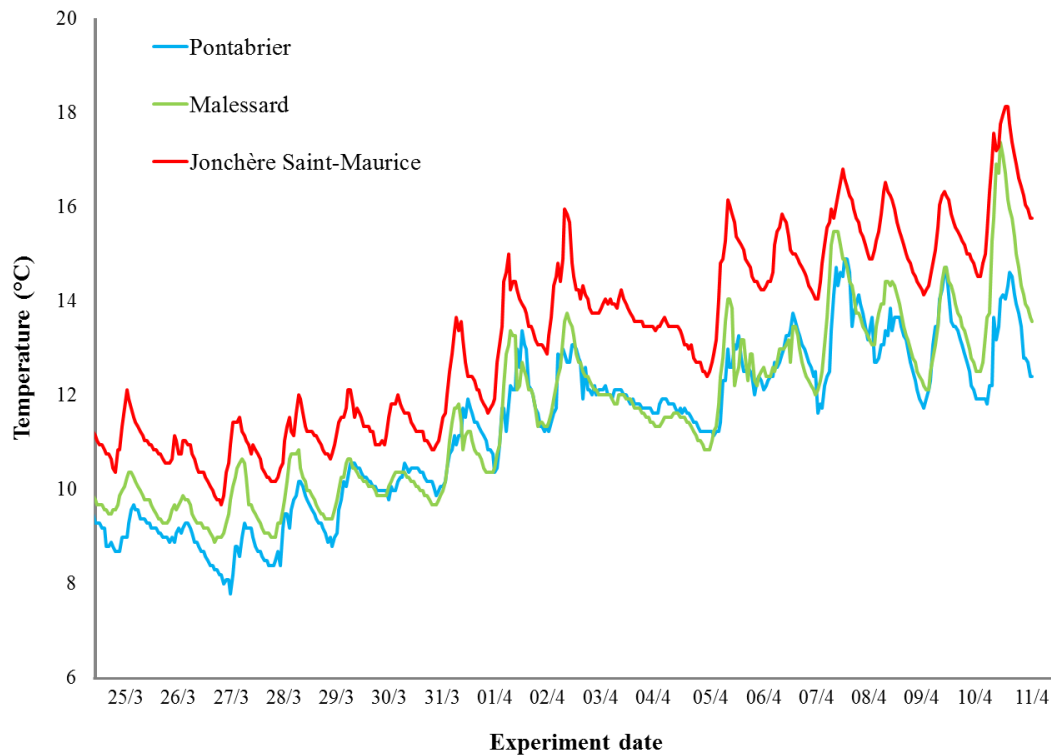
- Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G (1994) A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell biology and toxicology* 10: 415-421
- Vieira MC, Torronteras R, Cordoba F, Canalejo A (2012) Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicology and environmental safety* 78: 212-217
- Waagbø R (1994) The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquaculture Research* 25: 175-197
- Wirzinger G, Weltje L, Gercken J, Sordyl H (2007) Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool? *Mutation research* 628: 19-30
- Wootton RJ (1984) A functional biology of sticklebacks. *Univ of California Press*
- Xiang L-X, Peng B, Dong W-R, Yang Z-F, Shao J-Z (2008) Lipopolysaccharide induces apoptosis in *Carassius auratus* lymphocytes, a possible role in pathogenesis of bacterial infection in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 32: 992-1001
- Yadav KK, Trivedi SP (2009) Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctate*. *Chemosphere* 77: 1495-1500
- Zelikoff JT (1993) Metal pollution-induced immunomodulation in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3: 305-325

Appendix 1: Effects of LPS injections on fish biomarkers obtained during the preliminary experiment. Underlined values for PBS and anaesthesia control conditions are significantly different, as well as bolded values between PBS and injection control conditions. Inside of each sampling time, means with different letters are significantly different from each others (a > b > c / e > f > g / i > j > k / m > n > o) ($\alpha = 5\%$). D: injection day; Nec.: leucocyte necrosis; Apopt.: leucocyte apoptosis; Lympho.: lymphocyte percentage; LMI: lysosomal membrane integrity; Phago.: phagocytic capacity; ROS b.: ROS basal level; ROS a.: ROS activated level; SI: stimulation index of respiratory burst; GSH: total glutathione; Gr: glutathione reductase; GPx: glutathione peroxidase; GST: glutathione-S-transferase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; FU: fluorescence units.

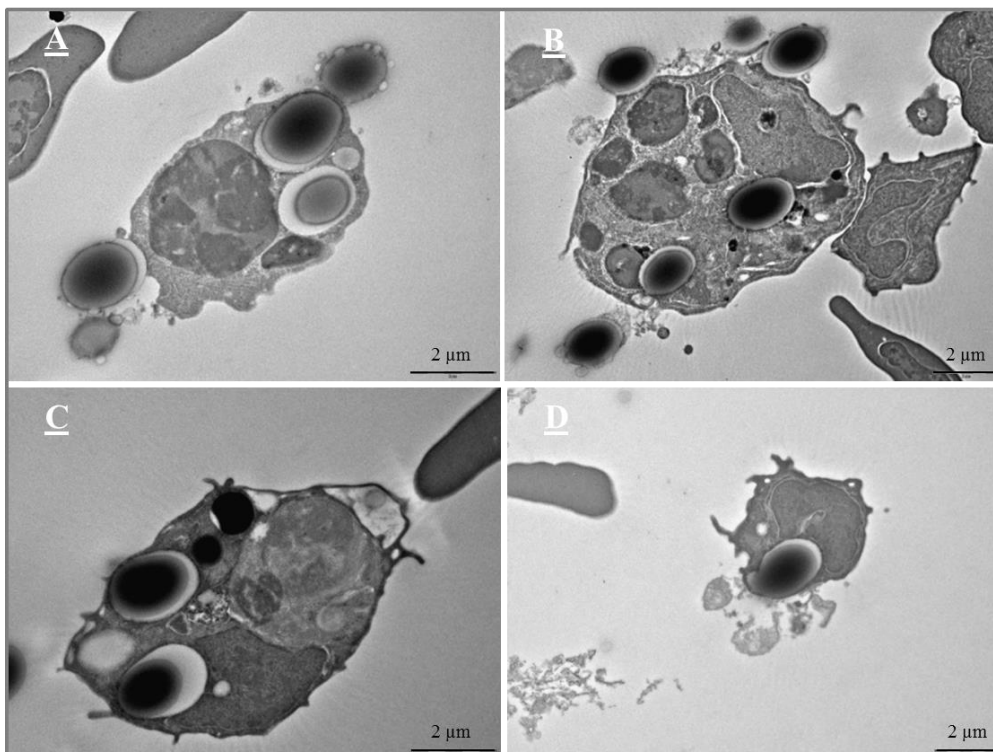
Sampling time	Injection conditions	Nec. (%)		Apopt. (%)		Lympho. (%)		LMI (FU)		Phago. (%)		ROS b. (FU)		ROS a. (FU)		SI												
		Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD											
D+1	Anaesthesia control	2.45	± 0.82	6.46	± 1.67	<u>80.63</u>	± 5.10	177.26	± 42.43	<u>16.14</u>	± 7.44	3.73	± 1.40	<u>2.38</u>	± 0.72	0.66	± 0.17											
	Injection control	3.24	± 1.40	6.58	± 2.12	84.43	± 3.85	155.04	± 32.16	9.39	± 4.06	4.44	± 1.14	3.97	± 2.58	0.84	± 0.32											
	PBS	2.11	± 0.73	b	5.98	± 1.65	c	84.36	± 4.13	ab	198.59	± 45.64	a	11.50	± 5.87	b	3.94	± 2.66	b	8.44	± 4.19	a	2.25	± 0.67	a			
	LPS (3 mg/kg)	2.38	± 0.57	b	7.11	± 1.81	bc	84.65	± 2.98	a	166.85	± 23.97	b	12.72	± 1.77	a	4.71	± 4.14	ab	8.17	± 3.91	a	1.96	± 0.71	a			
	LPS (6 mg/kg)	3.30	± 0.84	a	10.14	± 1.95	a	81.80	± 3.64	ab	138.14	± 65.64	b	11.75	± 2.06	ab	3.88	± 1.83	b	8.79	± 2.62	a	2.38	± 0.83	a			
D+2	LPS (9 mg/kg)	3.40	± 1.34	a	8.21	± 1.74	b	81.02	± 4.36	b	215.60	± 35.57	a	13.95	± 2.90	a	8.68	± 4.52	a	8.61	± 1.47	a	1.51	± 1.14	a			
	PBS	2.89	± 0.71	f	6.18	± 1.25	f	84.38	± 3.49	e	173.25	± 13.18	f	<u>7.56</u>	± 2.81	g	4.28	± 1.57	e	<u>5.37</u>	± 3.23	g	1.18	± 0.32	g			
	LPS (3 mg/kg)	2.86	± 0.59	f	6.43	± 2.13	f	83.96	± 3.86	e	160.02	± 15.95	fg	14.67	± 2.74	f	4.42	± 1.16	e	8.19	± 1.78	ef	1.92	± 0.41	f			
	LPS (6 mg/kg)	4.03	± 1.18	e	9.05	± 2.59	e	77.13	± 3.47	f	144.25	± 17.80	g	14.94	± 2.39	ef	3.80	± 1.51	e	7.96	± 0.90	fg	2.43	± 0.45	e			
	LPS (9 mg/kg)	3.14	± 0.72	ef	7.31	± 1.10	ef	82.32	± 2.61	e	197.79	± 33.71	e	16.55	± 2.75	e	5.98	± 3.31	e	11.44	± 3.06	e	2.23	± 0.87	ef			
D+4	PBS	2.66	± 0.48	i	7.63	± 0.84	i	<u>85.09</u>	± 3.44	i	157.99	± 20.52	j	4.39	± 1.05	i	<u>3.48</u>	± 1.22	j	3.78	± 1.16	ij	4.90	± 2.54	ij	1.24	± 0.33	j
	LPS (3 mg/kg)	3.42	± 1.08	i	6.98	± 1.26	ij	82.32	± 4.65	i	157.38	± 27.23	j	3.78	± 1.16	ij	4.90	± 2.54	ij	4.11	± 2.37	j	1.18	± 0.41	j			
	LPS (6 mg/kg)	3.21	± 1.34	i	9.29	± 3.60	i	79.90	± 8.24	i	141.79	± 38.26	j	3.27	± 0.92	j	4.11	± 2.37	j	3.12	± 0.88	j	6.28	± 3.53	i	2.09	± 0.79	i
	LPS (9 mg/kg)	2.86	± 0.68	i	6.63	± 0.95	j	84.98	± 3.37	i	205.52	± 30.13	i	3.12	± 0.88	j	6.28	± 3.53	i	2.09	± 0.79	i						
D+8	PBS	2.32	± 0.65	n	6.81	± 1.81	n	<u>87.35</u>	± 2.54	m	183.08	± 30.24	m	10.00	± 5.68	m	4.56	± 0.94	m	<u>2.87</u>	± 0.47	m	0.63	± 0.08	o			
	LPS (3 mg/kg)	3.06	± 0.71	m	8.26	± 1.09	m	85.53	± 2.66	n	201.16	± 50.52	m	9.30	± 5.29	m	3.51	± 0.44	n	3.02	± 0.48	m	0.85	± 0.05	n			
	LPS (9 mg/kg)	2.97	± 0.67	m	8.54	± 1.37	m	84.30	± 5.08	n	191.81	± 34.92	m	9.41	± 3.78	m	2.74	± 0.15	o	2.70	± 0.12	m	0.98	± 0.05	m			

Sampling time	Injection conditions	GSH (µmol/g tot prot)		Gr (U/g tot prot)		GPx (U/g tot prot)		GST (U/g tot prot)		CAT (10 ³ xU/g tot prot)		SOD (U/g tot prot)		TBARS (FU)								
		Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD	Mean	± SD							
D+1	Anaesthesia control	<u>19.58</u>	± 7.81	10.61	± 8.91	88.06	± 103.36	908.10	± 440.23	<u>713.96</u>	± 477.61	<u>821.23</u>	± 518.26	<u>15.463</u>	± 7.183							
	Injection control	16.28	± 3.49	8.88	± 5.47	134.63	± 104.96	631.75	± 183.30	818.55	± 290.48	475.95	± 181.79	13.604	± 7.289							
	PBS	12.70	± 6.82	a	10.22	± 3.57	a	157.52	± 138.30	a	675.69	± 268.74	a	817.07	± 297.39	a	<u>369.28</u>	± 296.89	a	11.874	± 4.080	a
	LPS (3 mg/kg)	11.67	± 3.66	a	8.98	± 3.99	a	96.53	± 85.57	a	614.38	± 236.68	a	667.73	± 376.36	a	349.96	± 232.96	a	9.414	± 3.136	a
	LPS (6 mg/kg)	9.51	± 2.88	ab	7.37	± 3.99	a	99.11	± 67.89	a	561.07	± 183.03	a	766.72	± 305.31	a	631.79	± 346.42	a	9.205	± 4.113	a
D+2	LPS (9 mg/kg)	6.88	± 3.03	b	7.21	± 4.33	a	58.49	± 42.25	a	515.49	± 116.79	a	734.19	± 260.39	a	570.79	± 260.33	a	10.014	± 3.896	a
	PBS	<u>12.80</u>	± 5.82	e	9.27	± 5.34	e	126.31	± 86.39	e	572.70	± 299.80	e	966.89	± 463.79	e	<u>346.13</u>	± 266.37	ef	11.470	± 5.481	e
	LPS (3 mg/kg)	10.62	± 3.26	e	6.89	± 2.65	e	90.30	± 65.46	e	527.06	± 180.55	e	560.69	± 266.35	f	302.75	± 257.53	f	10.654	± 4.529	e
	LPS (6 mg/kg)	13.30	± 8.26	e	8.05	± 3.06	e	90.59	± 55.87	e	630.57	± 302.37	e	979.10	± 276.06	e	674.62	± 406.05	e	9.607	± 2.369	e
	LPS (9 mg/kg)	9.57	± 3.94	e	7.84	± 5.01	e	105.83	± 126.63	e	468.59	± 262.98	e	903.23	± 545.15	ef	446.82	± 387.24	ef	9.958	± 3.695	e
D+4	PBS	13.81	± 5.64	i	7.29	± 3.21	i	123.85	± 68.21	ij	722.39	± 315.46	ij	<u>1287.13</u>	± 313.91	i	651.21	± 415.59	i	11.331	± 5.094	i
	LPS (3 mg/kg)	12.45	± 5.98	i	7.03	± 4.76	i	61.39	± 78.75	j	659.93	± 337.96	ij	717.75	± 563.96	j	619.05	± 480.00	i	11.626	± 4.346	i
	LPS (6 mg/kg)	13.32	± 4.26	i	9.98	± 3.28	i	167.57	± 82.61	i	857.75	± 391.79	i	1198.10	± 440.79	i	790.62	± 765.66	i	10.076	± 3.153	i
	LPS (9 mg/kg)	6.12	± 3.83	j	7.98	± 4.99	i	110.01	± 144.5	ij	456.99	± 250.96	j	693.07	± 409.41	j	454.24	± 326.78	i	8.671	± 3.304	i
D+8	PBS	<u>12.86</u>	± 5.56	m	8.69	± 4.78	m	113.48	± 74.85	m	583.60	± 227.58	m	908.34	± 474.81	m	623.63	± 339.33	m	<u>10.900</u>	± 3.487	m
	LPS (3 mg/kg)	9.45	± 4.07	mn	6.87	± 3.47	m	112.65	± 104.43	mn	516.39	± 217.49	m	797.52	± 438.74	m	380.58	± 186.13	mn	8.515	± 1.675	m
	LPS (9 mg/kg)	6.79	± 3.76	n	3.42	± 1.72	n	41.71	± 37.14	n	429.67	± 210.50	m	663.26	± 345.47	m	220.00	± 135.77	n	8.883	± 3.082	m

Appendix 2: Temperature (°C) inside cages according to ponds and to experiment date. Temperature was recorded each hour using probes.



Appendix 3: Transmission electron microscopy observations of leucocyte phagocytosis from stickleback spleen. Black circles represent fluorescent microbeads ingested. A, B and C: granulocytes; D: lymphocyte.



CHAPITRE 6 : EFFETS DE CONTRAINTEES LIEES A LA MANIPULATION *IN SITU*



1. Résumé de l'article

1.1. Objectifs

Le but de ces études était de savoir si des contraintes liées aux modalités de l'encagement et aux études *in situ* pouvaient impacter des marqueurs d'écotoxicité. Pour cela, trois contraintes liées à la technique d'encagement ont été testées lors de trois expérimentations distinctes. Elles ont concerné (i) la densité des poissons dans les cages, (ii) la période de jeûne de 14 jours et (iii) la durée de 20 minutes de transport avant l'euthanasie des poissons.

1.2. Matériels et méthodes

Les trois expérimentations d'encagement se sont déroulées à des périodes différentes et/ou dans des hydrosystèmes différents. Ces expérimentations ont toutes débuté après deux semaines d'acclimatation aux conditions physico-chimiques des hydrosystèmes.

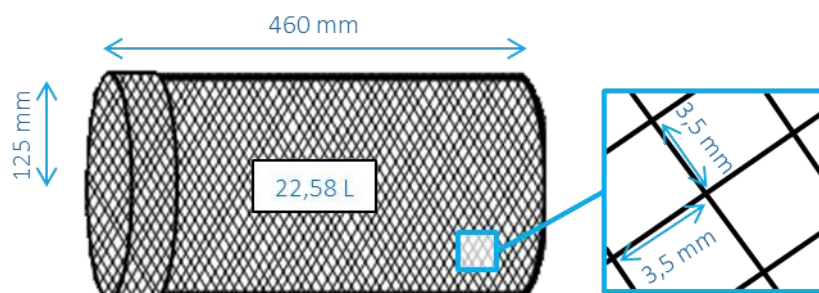


Figure 20 : Schéma et dimensions d'une cage utilisée lors des expérimentations *in situ* avec l'épinoche à trois épines.

1.2.1. La densité des épinoches dans les cages

Afin de tester si la densité à l'intérieur des cages (Cf. Figure 20) induisait un effet sur les réponses analysées, des épinoches ont été encagées dans l'étang de Pontabrier (Haute-Vienne) pendant 14 jours sans apport extérieur de nourriture selon trois densités différentes : 7, 15 et 23 poissons par $\frac{1}{2}$ cage, correspondant à 1,08 ; 2,31 et 3,54 kg/m^3 . Les résultats

obtenus avec la densité la plus faible constituaient les valeurs de référence. Au bout de 14 jours d'encagement les épinoches ont été sacrifiées afin d'évaluer différents biomarqueurs (Cf. Tableau 12).

1.2.2. Le jeûne de 14 jours

Des épinoches ont été réparties dans 2 cages (densité de 2,31 kg/m³) mises dans le ruisseau de l'Evêque (Oise). De la nourriture (larves de chironomes, 6% du poids total des épinoches) a été apportée tous les deux jours uniquement pour les épinoches d'une seule cage, les autres étant en jeûne pendant cette période. Au bout de 14 jours d'encagement, les épinoches ont été sacrifiées au laboratoire en vue des analyses (Cf. Tableau 12). Les résultats obtenus pour les épinoches nourries tous les deux jours ont servi de référence.

1.2.3. Vingt minutes de transport

Des épinoches ont été encagées dans l'étang de Pontabrier dans 2 cages différentes (15 poissons par ½ cage, densité de 2,31 kg/m³) pendant 14 jours sans apport extérieur de nourriture. Ensuite, 15 épinoches ont été transportées (20 minutes de voiture) avant d'être sacrifiées tandis que les 15 autres ont été disséquées directement à la sortie de l'eau pour l'analyse de certains biomarqueurs (Cf. Tableau 12). Les épinoches non transportées constituaient le lot de référence.

1.2.4. Analyses effectuées

Les analyses des marqueurs d'écotoxicité (Cf. Tableau 12) étaient concentrées sur les systèmes immunitaire et antioxydant, ainsi que sur les réserves énergétiques pour l'expérience sur le jeûne. Cette dernière analyse nécessitant le prélèvement du foie en entier, les dosages biochimiques pour le système antioxydant et la peroxydation lipidique n'ont pas pu être réalisés.

Tableau 12 : Nature des biomarqueurs analysés, méthodes de mesure et organes associés lors des expériences sur les contraintes liées à l'encagement ou aux manipulations *in situ*. Les croix informent de la présence des analyses pour l'expérience réalisée (densité, jeûne ou transport).

Type	Biomarqueur	Abréviations	Mesure	Organe utilisé	Densité	Jeûne	Transport
Indices de condition	Indice de condition de Fulton	K	Mesures et pesées	Poisson	X	X	X
	Indice hépatosomatique	HSL		entier	X	X	X
Système immunitaire	Nécrose leucocytaire	Nec.	Cytométrie en flux	Rate	X	X	X
	Apoptose leucocytaire	Apop.			X	X	X
	Pourcentage de lymphocytes	Ly			X	X	X
	Intégrité de la membrane lysosomale	IML			X	X	X
	Activité oxydative basale	ROS b.			X	X	X
	Activité oxydative stimulée	ROS s.			X	X	X
	Index de stimulation de la flambée oxydative	SI			X	X	X
	Capacité de phagocytose	Phago.			X	X	X
Système Antioxydant	Catalase	CAT	Dosages biochimiques	Foie	X		X
	Superoxyde dismutase	SOD			X		X
	Glutathion total	GSH			X		X
	Glutathion reductase	Gr			X		X
	Glutathion-S-transférase	GST			X		X
Peroxydation lipidique	Glutathion peroxydase	GPx			X	X	
	TBARS	TBARS	Dosage biochimique	Foie	X		X
Réserves énergétiques	Glycogène	-	Dosages biochimiques	Foie		X	
	Sucres libres	-				X	
	Lipides totaux	-				X	

1.3. Principaux résultats et discussion

Aucune différence significative sur l'ensemble des 17 biomarqueurs testés entre les poissons encagés à la plus faible densité (1,08 kg/m³) et ceux encagés à la moyenne densité (2,31 kg/m³) n'a été observée. Cependant, les épinoches encagés à la plus forte densité (3,54 kg/m³) présentaient une nécrose et une apoptose leucocytaires plus importantes, bien que non significatives, ainsi qu'une production stimulée d'ERO significativement supérieure par rapport aux autres conditions de densité. Même de faibles densités (3,54 kg/m³ pour l'épinoche à trois épines ou 2 kg/m³ pour le tilapia du Nil, Trevisan et al. (2013)), par rapport à d'autres retrouvées dans la littérature, induisent des effets sur les poissons pouvant avoir des conséquences sur l'interprétation des résultats lors d'études environnementales

Bien que le jeûne de 14 jours n'ait pas induit d'effets sur les réserves énergétiques, il a induit des modifications sur certains biomarqueurs testés. Les poissons qui ont reçu un apport extérieur de nourriture présentaient un embonpoint significativement plus élevé que ceux maintenus en jeûne. De même, ces poissons nourris présentaient significativement moins de phénomènes d'apoptose et nécrose leucocytaires, de meilleures stabilité de la membrane

lysosomale et capacité de phagocytose ainsi qu'une plus faible production basale d'ERO en comparaison aux poissons n'ayant pas été nourris. Nous pouvons émettre l'hypothèse que le jeûne de quatorze jours n'est pas assez long pour que les réserves énergétiques des épinoches soient modifiées significativement, mais ce stress induit tout de même des perturbations du système immunitaire.

Le court transport de 20 minutes conduisait à un stress oxydant, visible par l'augmentation significative de la production basale d'ERO, d'une partie du système antioxydant (GSH, GST, CAT) et de la peroxydation lipidique en comparaison aux poissons n'ayant pas été transportés. Cette étude a permis de savoir qu'un court transport et une densité légèrement supérieure aux recommandations de l'OCDE pouvaient entraîner des effets sur les systèmes immunitaire et antioxydant des épinoches. Concernant le jeûne de quatorze jours, d'autres études en augmentant le temps de jeûne seraient nécessaires afin de confirmer le stress nutritionnel.

2. Article scientifique

***In situ* experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.).**

Authors

Antoine Le Guernic^{1,2,3*}, Wilfried Sanchez², Olivier Palluel², Anne Bado-Nilles², Cyril Turies², Edith Chadili², Isabelle Cavalié¹, Christelle Adam-Guillermin¹, Jean-Marc Porcher², Alain Geffard³, Stéphane Betoulle³, Béatrice Gagnaire¹.

¹Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PRP-ENV/SERIS/LECO, Centre de Cadarache, 13115 Saint-Paul-lez-Durance, France.

²Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), UMR-I 02 SEBIO (Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques), BP 2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France.

³Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), UMR-I 02 SEBIO, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de la Housse, B.P. 1039, 51687 Reims, France.

*Corresponding author: antoineleguernic@gmail.com, phone: +33 4 42 19 96 32.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of caging constraints on multiple fish biomarkers used during ecotoxicological studies (biometric data, immune and antioxidant systems, and energetic status). Two of these constraints were linked to caging: starvation and fish density in cages, and one in relation to the post-caging handling: a short transport. Three *in situ* experiments were conducted with three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). The first experiment compared the effects of three densities (low, medium, and high). The second experiment compared effects of starvation in fish fed every two days with fish that were not fed. Finally comparisons between sticklebacks which have suffered a short car transport after caging and sticklebacks sacrificed without preliminary transport were made. The lack of food had no effect on fish energetic reserves but negatively affected their condition index and their immune system. Transport and high density induced oxidative

stress, defined as an overproduction of reactive oxygen species and a stimulation of the antioxidant system. These two constraints also harmed the leucocyte viability. In order not to have any impact on ecotoxicity biomarkers during *in situ* experiments, it is preferable to decrease fish density in cages, prevent transport before dissections and feed fish when the caging lasts more than two weeks.

Headings

- The effects of 20 minutes of car transport, three fish densities during caging and 14 days of starvation were evaluated on ecotoxicity markers in the three-spined stickleback.
- Transport induced an oxidative stress, while the highest density and starvation constraints modified the immune capacities of sticklebacks.

Keywords

Density; Immunomarkers; Starvation; Transport.

1. Introduction

Awareness of diverse and numerous anthropogenic environmental contaminants have prompted an evaluation and monitoring of ecosystem quality, including aquatic habitats. These assessments require the chemical determination of pollutants, but also the determination of their effects on aquatic flora and fauna. Tools have been developed to observe and measure biochemical, physiological, histological, morphological and behavioural changes after exposure to pollutants (Lagadic et al. 1997a). These measurable changes are commonly called biomarkers. The analysis of a single biomarker is not sufficient to appreciate the overall pollution or its effects on the health of organisms. In addition, some biomarkers only react with a specific contamination, and studies focusing only on one or two biomarkers can miss some effects. Evaluation of pollution effects on several biological functions and responses facilitates the observation and understanding of damage caused by this pollution and thus a multi-biomarker approach is increasingly used in environmental studies (Lagadic et al. 1997b; Hinck et al. 2008; Sanchez et al. 2008a; Gagnaire et al. 2015).

In the context of environmental risk assessment (ERA), *in situ* experiments can involve complex interactions often impossible to reproduce in the laboratory (Pereira et al. 2006). One possible solution is to sample and analyse organisms already present on the polluted site. However, most environmental studies involve sentinel species and these species can be absent on the studied sites. Moreover, even if the sentinel species is present, the number of individuals required and the stress of capture can be limiting factors (Frisch and Anderson 2000; Campbell et al. 2009). To avoid these problems, caging can allow work under semi-controlled conditions in aquatic habitats while keeping the natural environmental complexity. Caging presents many advantages (Oikari 2006) including the selection of well characterised homogenous organisms (number, age, size, weight, sex), and the control of exposure (location, time, season). Caging allows, under certain limitations, the use of sentinel species not naturally present in the studied environment. Caging also limits predation stress and greatly facilitates sampling. Therefore caging is increasingly used in ecotoxicological studies, particularly with a multiple contamination (Cazenave et al. 2014; Scarcia et al. 2014; Gagnaire et al. 2015).

However, caging also presents disadvantages that may impact analysed responses during *in situ* experiments (Oikari 2006). The stress due to caging has been assessed many times via responses such as catecholamines, glucocorticoids, and the levels of glucose or lactate (Pickering et al. 1991; Brydges et al. 2009), but few studies have focused on the possible

modulations of biomarkers commonly used in ecotoxicological studies following caging. Biases caused from caging can hide the results by decreasing the statistical power of the experiment, and can be more apparent than the effects of the pollutants. Trevisan et al. (2013) have observed that the confinement of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, induced stress which resulted in higher effects on some biomarkers than those induced by a polymetallic contamination. Our study presents an original approach by assessing effects due to 14 days of caging on biomarkers popularly used during ecotoxicological studies. Consequently, effects of two constraints linked to caging (starvation, fish density) and another due to handling post-caging (20 min of transport) were investigated using a multi-biomarker approach. The biomarkers analysed were related to physiology, defense capabilities, such as the antioxidant and immune systems, and also to energetic reserves. *In situ* experiments were conducted with three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), a fish species with useful features for in situ experiments. Sticklebacks are robust fish (Pottinger et al. 2002) and because of their small size, handling and caging are facilitated. The use of sticklebacks as a sentinel species for ecotoxicological studies has been noted repeatedly (Pottinger et al. 2002; Sanchez et al. 2007; Knag and Taugbøl 2013).

2. Material and methods

2.1. Caging characteristics

The cylindrical cages used in this study were 460 mm high with a radius of 125 mm (volume = 22.58 L). In order to sacrifice fewer sticklebacks while maintaining the desired density, cages could be divided in two by adding a wall. The cage mesh was 3.5 mm x 3.5 mm, which allowed water and particle flows and prevented fish from escaping. Cages were placed directly on the sediment at a water depth of 50 cm. Before being caged, fish were acclimated in the laboratory to physical and chemical conditions of each study site for two weeks (temperature, pH, conductivity). For each experiment, one year old three-spined sticklebacks from INERIS animal husbandry were used from the same initial fish group to limit individual variations. Fish were transported by car from INERIS to each caging site in several closed buckets containing water from their acclimation phase and previously super-oxygenated. Conductivity and pH of water for each experiment were assessed a first time when the caging started, and a second time when the experiment was over. Temperature was recorded each hour using a probe hooked to the cage (HOBO Pendant Temperature Data Logger, Onset, Bourne, MA, USA).

2.2. Caging experiments

Constraints tested in this study were: i) fish density in cages (2.31 kg/m^3 and 3.54 kg/m^3), ii) starvation and iii) 20 minutes of transport before dissections. Each caging condition was compared to one different reference condition. For fish density in cages, the reference condition was a density of 1.08 kg/m^3 , and this density was chosen in accordance with OECD guidelines (OECD 2000). Potential effect of 14 days starvation was assessed by comparing fish starved with fish fed every two days. Then, transportation effects were compared to fish sacrificed without transport. The transport and density experiments were conducted in a pond in the Haute-Vienne department (France), in April 2014 and October 2014 respectively, while the starvation experiment was carried out in November 2013 in a stream located in the Oise department (France). Characteristics of each experiment and water physical and chemical parameters are reported in the figure 1.

Forty-five sticklebacks ($1.76 \pm 0.28 \text{ g}$; $5.83 \pm 0.29 \text{ cm}$; female/male sex ratio of 1.25) were used for the density experiment and were distributed in three cages divided in two parts: seven sticklebacks in a cage (density of 1.08 kg/m^3), 15 sticklebacks in another cage (density of 2.31 kg/m^3) and 23 sticklebacks (density of 3.54 kg/m^3) in a third. During this experiment, sticklebacks were not fed. Fourteen days after caging, sticklebacks were sacrificed by cervical dislocation directly on the field, without transport before dissection.

Sixty sticklebacks ($1.88 \pm 0.41 \text{ g}$; $5.84 \pm 0.44 \text{ cm}$; female/male sex ratio of 1.31) distributed in two cages (30 fish per cage without walls; density: 2.31 kg/m^3) were used to highlight the possible effect of starvation on ecotoxicity biomarkers. Fish from one cage were fed every two days with bloodworms (ratio of food/fish of 6 % w/w every two days, Ocean Nutrition Europe, Essen, Belgium), while sticklebacks from the other cage were not fed. Fourteen days after caging, sticklebacks were sacrificed by cervical dislocation directly on the field, without transport before dissection.

In order to determine the effect of a short transport on stickleback responses, thirty sticklebacks ($1.35 \pm 0.16 \text{ g}$; $5.41 \pm 0.20 \text{ cm}$; female/male sex ratio of 1.14) distributed in two cages divided in two parts (15 fish per cage; 2.31 kg/m^3) were used. During this experiment, sticklebacks were not fed. Fourteen days after caging, 15 sticklebacks were removed from their cage and immediately sacrificed by cervical dislocation, while the other 15 fish from the

other cage were directly placed into closed buckets, transported by car for 20 minutes and then were sacrificed. During this short transport, the buckets contained the water of the pond in which fish were caged, and the same stickleback distribution and density were kept.

For each experiment, stickleback size, total and liver weights were recorded to calculate physiological indices, and the spleen was recovered for the immune system analyses. The splenic leucocyte isolation was performed following previous described method (Bado-Nilles et al. 2014b). In the field, spleens were pressed through sterilized nylon mesh (40 μm , Becton Dickinson, NJ, USA) with Leibovitz 15 medium (L15, Sigma, St. Louis, MO, USA) modified with heparin lithium (10 U/mL, Sigma), penicillin (500 U/mL, Sigma), and streptomycin (500 $\mu\text{g/mL}$, Sigma). The leucocyte suspension obtained was stored at 4 °C for 18 hours prior to analysis. During the density and transport experiments, the liver was recovered for the antioxidant system analyses, while during the starvation experiment the entire liver was used to assess energetic reserves (total lipids, glycogen, free sugars). In the field, livers were extracted, weighed, and placed in 400 μL of potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4) modified with glycerol (20 %, Sigma) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 2 μM , Sigma) in order to inhibit proteolysis. These livers were then frozen in liquid nitrogen and stored in freezer at -80 °C until oxidative stress analyses. Otherwise, livers used for energetic reserves were immediately removed from fish, weighed and frozen without buffer. They also were kept at -80°C until analyses.

2.3. Biological parameters

2.3.1. Biometric data

Fulton's K condition index (K) evaluates the general well-being of fish and is calculated by the formula: $K = (\text{weight}/\text{length}^3) \times 100$. The hepato-somatic index (HSI) is calculated by the formula: $\text{HSI} = (\text{liver weight}/\text{total body weight}) \times 100$.







	Density experiment	Starvation experiment	Transport experiment
Department	 Haute-Vienne	 Oise	 Haute-Vienne
Site	 Pontabrier pond	 Evêque stream	 Pontabrier pond
Period	April 2014	November 2013	October 2014
Temperature (°C) (mean ± SD)	11.27 ± 1.73	7.79 ± 0.65	16.93 ± 1.30
Temperature (°C) (min - max)	7.82 - 14.90	6.61 - 8.84	14.90 - 19.95
pH (min - max)	6.84 - 7.45	8.08 - 8.45	6.81 - 7.59
Conductivity (µS/cm) (min - max)	17 - 19	610 - 725	103 - 105

Fig. 1: Characterisation (location and physical and chemical parameters) of different caging experiments.

2.3.2. Immune capacities

Leucocyte necrosis, apoptosis, percentage of lymphocyte among leucocytes, lysosomal membrane integrity (LMI), respiratory burst, and phagocytic capacity were analysed following protocols previously described (Bado-Nilles et al. 2013; Bado-Nilles et al. 2014a; Gagnaire et al. 2015). Respiratory burst is described by three parameters: ROS basal level, corresponding to ROS production by unstimulated cells; ROS activated, corresponding to ROS production in cells stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma) and the stimulation index of respiratory burst, which is calculated by the formula: fluorescence of ROS activated / fluorescence of ROS basal (Chilmonczyk and Monge 1999). Leucocyte activities were evaluated by flow cytometry with 10,000 events counted for each suspension sample. Data of density and transport experiment were recovered using a Guava®EasyCyte™ 8HT flow cytometer (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) and analysed using Guavasoft 2.7 software, while analyses of starvation experiment were carried out using a Cyan ADP flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) with Summit 4.3 software.

2.3.3. Oxidative stress

Protein concentration was assessed using Bradford (1976) method with bovine serum albumin (Sigma for the two products). Among hepatic biomarkers, glutathione (GSH) (Vandeputte et al. 1994), glutathione-S-transferase (GST) (Habig et al. 1974), glutathione peroxidase (GPx) (Paglia and Valentine 1967), glutathione reductase (Gr) (Carlberg and Mannervik 1975), catalase (CAT) (Babo and Vasseur 1992), superoxide dismutase (SOD) (Paoletti et al. 1986), and thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) for lipid peroxidation assessment (Ohkawa et al. 1979), were analysed. All these measurements were adapted for stickleback by Sanchez et al. (2005) and Sanchez et al. (2007). Except for TBARS and GSH (mol/g of total protein), all results were calculated in U/g of total protein.

2.3.4. Energetic reserves

Energetic reserves were assessed only in the starvation experiment. The entire stickleback liver was required for these analyses; therefore the assessment of the oxidative status of the unfed sticklebacks could not be performed. Lipid and glycogen assays were performed according to Frings et al. (1972) and Carr and Neff (1984) protocols, respectively. According to the calibration curve (glucose, from 0 to 0.6mg/mL in ultrapure water, Sigma for glycogen

and free sugar assays; triolein, from 0 to 5mg/mL in the chloroform / methanol mix, Sigma for lipid assay), and to the volume of glycogen and free sugar homogenates, glycogen and free sugar reserves were expressed in percentage relative to the liver weight. Lipid measurements were adapted to fish and to microplate by Péry et al. (2014).

2.4. Statistical analyses

Results of the density, starvation and transport experiments were expressed as the ratio to fish without stress (caged with the lowest density, fish that were fed every two days, and fish that were not transported before being sacrificed, respectively). These ratios were made by dividing individual values of stressed fish over the mean results obtained without stress. Statistics were produced from all the values (including variability of control groups), not from the ratios. Numeric results are inscribed in the table in Table 1.

R software (3.1.1 version) was used for all statistical analyses. The number of replicates depends on the experiment ($n = 7, 14$ or 22 for density experiment; $n = 30$ for food experiment; $n = 15$ for transport experiment).

Concerning the density experiment, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Normality and homogeneity of variances of ANOVA residuals were assessed by the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively ($\alpha = 5\%$). If normality and homoscedasticity were respected, ANOVA was kept and was followed by a Tukey test, otherwise, ANOVA was replaced by a Kruskal-Wallis test followed by a Mann-Whitney test ($\alpha = 5\%$).

Concerning the transport and starvation experiments, normality and homogeneity of variances were tested using the Shapiro-Wilk and Fisher tests, respectively ($\alpha = 5\%$). If normality and homoscedasticity were respected, the Student test was performed, otherwise, Student test was replaced by the Wilcoxon test ($\alpha = 5\%$). Males and females were grouped as there was no sex effect on biomarkers analysed.

3. Results

3.1. Water Physical and chemical parameters

The minimum and maximum pH and conductivity, as well as the mean temperature for each experiment are included in figure 1. These parameters varied according to period and exposure.

3.2. Individual mortality

Two sticklebacks died during the density experiment (one in the medium density and one in the highest density cage). No deaths occurred during the other two experiments. Moreover, no external sign of stress (skin coloration, injuries), as well as no behavioural alteration were observed after caging (abnormal reaction when out of water, no swimming).

3.3. Fish density in cage

High individual variations were seen among conditions, and no significant difference for all biometric data was observed between sticklebacks caged with the lowest, the medium or the highest densities (Table 1; Figure 2). The highest density caused higher LMI in fish spleen compared to sticklebacks caged with the lowest density ($p = 3.04 \times 10^{-2}$) (Table 1; Figure 3). ROS basal level tended to increase with density but not significantly, while ROS activated level was significantly enhanced by the highest density compared to the medium and the lowest densities ($p = 4.55 \times 10^{-2}$ compared with the medium density and $p = 1.38 \times 10^{-2}$ with the lowest density) (Table 1; Figure 3). No effect of a low or a high density was observed on phagocytic capacity, on lymphocyte percentage, on antioxidant system or on lipid peroxidation (Gr activity could not be assessed for density conditions) (Table 1; Figure 4). It should be noted a non-significant increase in apoptosis between the lowest and highest density ($p = 9.45 \times 10^{-2}$). This increase became significant between the intermediate density and the highest ($p = 4.75 \times 10^{-2}$) (Table 1; Figure 3).

3.4. Starvation

Starvation was the only constraint which caused a decrease of K ($p = 4.25 \times 10^{-2}$) (Table 1; Figure 2). Concerning immune system, fish which were starved had higher leucocyte necrosis and apoptosis than fish fed every two days ($p = 4.06 \times 10^{-2}$ and $p = 1.14 \times 10^{-3}$, respectively) (Table 1; Figure 3). Correlatively, LMI was reduced when sticklebacks received no supplementary food ($p = 7.13 \times 10^{-3}$), while ROS basal level strongly increased during fasting ($p = 6.42 \times 10^{-4}$). This rise was reflected in a decrease in the stimulation index of respiratory burst ($p = 2.23 \times 10^{-3}$) (Table 1; Figure 3). Phagocytic capacity also was reduced in fish unfed ($p = 6.65 \times 10^{-3}$). No significant difference was observed on energetic reserves between sticklebacks fed or sticklebacks without supplementary food (Table 1).

3.5. Short transport before dissection

Transport had no effect on biometric data (Table 1; Figure 2). However, transport decreased significantly leucocyte apoptosis ($p = 6.30 \times 10^{-3}$), and strongly increased the ROS basal level ($p = 6.24 \times 10^{-5}$) (Table 1; Figure 3). The result on stimulation index was a significant decrease caused by transport ($p = 3.01 \times 10^{-5}$). Despite high individual variations, 20 minutes of transport induced increases of all antioxidant biomarkers and lipid peroxidation, and four of these increases were significant ($p = 6.16 \times 10^{-3}$ for GSH; $p = 1.18 \times 10^{-2}$ for GST; $p = 3.62 \times 10^{-2}$ for SOD; $p = 4.56 \times 10^{-2}$ for TBARS) (Table 1; Figure 4).

Table 1: Sticklebacks responses (means ± SEM) according to different caging experiments (biometric data, immune and antioxidant systems, and energy reserves. Measurements of the immune system between the density-starvation and transport experiments were not made with the same flow cytometer. Groups with the same letter (a or b) are not significantly different ($\alpha = 5\%$). A star or a point corresponds to a significant difference between the two conditions during transport or starvation experiment, respectively. * Statistical difference for $0.01 < p \leq 0.05$. ** Statistical difference for $0.001 < p \leq 0.01$. *** Statistical difference for $p \leq 0.001$. K: Fulton's condition index; HSI: hepato-somatic index; Necrosis: leucocyte necrosis; Apoptosis: leucocyte apoptosis; Lympho: Lymphocyte percentage among leucocytes; LMI: lysosomal membrane integrity; ROS b.: ROS basal level; ROS a.: ROS activated level; SI: Stimulation index of respiratory burst; Pg: phagocytic capacity; GSH: total glutathione; GPx: glutathione peroxidase; Gr: glutathione reductase; GST: glutathione-S-transferase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances FU : fluorescence units; W.W.: wet weight.

		DENSITY EXPERIMENT						TRANSPORT EXPERIMENT		STARVATION EXPERIMENT		
		low density		medium density		high density		without transport	with transport	fed	unfed	
Size	cm	5.77 ± 0.13	a	5.80 ± 0.06	a	5.88 ± 0.08	a	5.29 ± 0.06	5.51 ± 0.03	6.05 ± 0.09	6.33 ± 0.08	
Weight	g	1.77 ± 0.16	a	1.75 ± 0.07	a	1.77 ± 0.06	a	1.29 ± 0.04	1.39 ± 0.04	2.35 ± 0.10	2.52 ± 0.09	
K		0.91 ± 0.03	a	0.89 ± 0.02	a	0.87 ± 0.02	a	0.87 ± 0.03	0.83 ± 0.02	1.05 ± 0.03	0.99 ± 0.02	•
HSI		4.87 ± 0.59	a	4.78 ± 0.51	a	4.84 ± 0.43	a	3.86 ± 0.20	4.25 ± 0.19	5.44 ± 0.29	5.94 ± 0.32	
Necrosis	%	6.05 ± 0.83	a	7.80 ± 1.25	a	7.57 ± 0.47	a	5.85 ± 0.41	4.86 ± 0.60	6.92 ± 0.41	8.69 ± 0.62	•
Apoptosis	%	10.76 ± 2.03	ab	10.25 ± 0.92	b	13.13 ± 1.01	a	14.45 ± 1.04	9.89 ± 0.84	3.17 ± 0.31	4.20 ± 0.31	••
Lympho	%	76.32 ± 2.79	a	72.83 ± 2.04	a	73.74 ± 0.88	a	82.78 ± 0.85	86.21 ± 1.36	56.47 ± 1.64	53.91 ± 1.56	
LMI	FU	119.17 ± 5.88	b	121.53 ± 6.06	b	140.37 ± 5.10	a	181.55 ± 6.06	176.40 ± 5.51	15.16 ± 0.16	14.42 ± 0.20	•
ROS b.	FU	5.10 ± 1.33	a	5.43 ± 0.61	a	7.52 ± 0.97	a	2.81 ± 0.23	4.83 ± 0.28	143.87 ± 11.22	187.36 ± 11.33	•••
ROS a.	FU	5.43 ± 1.26	b	6.87 ± 1.83	b	9.28 ± 1.02	a	3.42 ± 0.21	3.46 ± 0.20	173.48 ± 24.75	180.88 ± 33.17	
SI		1.16 ± 0.22	a	1.14 ± 0.17	a	1.28 ± 0.09	a	1.28 ± 0.08	0.73 ± 0.04	1.14 ± 0.07	0.97 ± 0.15	••
Pg	%	4.79 ± 0.13	a	5.20 ± 0.17	a	5.18 ± 0.20	a	3.77 ± 0.19	3.31 ± 0.08	25.80 ± 0.62	23.10 ± 0.94	••
GSH	µmol/g prot	16.83 ± 3.86	a	17.94 ± 3.92	a	9.28 ± 1.43	a	12.23 ± 1.01	16.97 ± 0.99			**
GPx	U/g prot	15.83 ± 4.44	a	23.22 ± 5.84	a	24.61 ± 4.35	a	34.44 ± 9.06	63.33 ± 14.36			
Gr	U/g prot							1.45 ± 0.31	2.32 ± 0.52			
GST	U/g prot	2,090.99 ± 269.05	a	2,384.95 ± 131.57	a	2,204.87 ± 136.89	a	1,784.17 ± 157.84	2,420.44 ± 131.47			*
SOD	U/g prot	928.41 ± 134.20	a	1,105.58 ± 98.91	a	905.71 ± 48.17	a	906.69 ± 118.03	1,168.35 ± 83.02			*
CAT	U/g prot	127,836.38 ± 35,896.75	a	169,286.59 ± 26,722.94	a	157,718.54 ± 36,291.04	a	197,886.07 ± 51,842.89	55,3340.63 ± 19,3783.60			
TBARS	FU	20,534.09 ± 2,580.57	a	23,917.57 ± 2,556.38	a	18,419.53 ± 1,107.85	a	16,478.36 ± 1,276.24	20,269.97 ± 939.24			*
Total lipids	mg/g W.W.									98.84 ± 0.69	93.60 ± 0.83	
Glycogen	mg/g W.W.									3.36 ± 0.05	3.04 ± 0.04	
Free sugars	mg/g W.W.									2.64 ± 0.03	2.56 ± 0.02	

4. Discussion

4.1. Experimental design

Fourteen days between transport from INERIS to study sites and dissection were respected in order to not assess the potential manipulation and transport stress. Indeed, studies have demonstrated that two weeks of latency after handling and transport were sufficient to overcome this stress (Pickering et al. 1982; Möck and Peters 1990; Acerete et al. 2004). In addition, 14 days is a common sampling time during ecotoxicological studies with caging (Haasch et al. 1993; Fenet et al. 1998; Gagnaire et al. 2015).

The three *in situ* experiments were conducted in different periods and localisations, thus resulting in different water parameters (temperature, pH, conductivity, Figure 1). These differences did not allow comparisons of results between experiments, and explained the differences of basal levels of biomarkers recorded between experiments (Table 1). Seasonal variability of fish biomarkers has already been reported in several studies (De Andrade et al. 2004; Sanchez et al. 2008b; Oliva et al. 2012; Bado-Nilles et al. 2015).

Nonetheless, within each experiment, sticklebacks were subject to the same environmental conditions. Moreover, fish were acclimated in the laboratory to these environmental parameters according to study site and caging period. The only difference applied to fish within an experiment was the caging characteristic tested (fish density, transport before dissection and starvation). Among each experiment, sticklebacks were originated from the same animal husbandry and were the same age, decreasing individual variations.

For all these reasons, comparison of results between the different caging conditions for a given experiment can be performed.

4.2. Effects of density on fish biomarkers

For *in situ* experiment requiring caging, it is preferable to decrease stress by transporting fish in containers that are similar to those in which they will be experimentally caged (Oikari 2006), and also to decrease fish density in cages and use multiply cages for statistics. But sometimes, field experiments induces limits, like the number of fish or transportable cages that can be used. Moreover, the European Directive 2010/63 EU requires, among other things, a reduction in the number of animals used for scientific purposes. Densities used until now can be modified to be consistent with this directive and the results previously obtained may be varied. Many studies evidenced induction of stress biomarkers (cortisol and lactate) with

confinement and high density (Pickering et al. 1991; Vazzana et al. 2002; Urbinati et al. 2004).

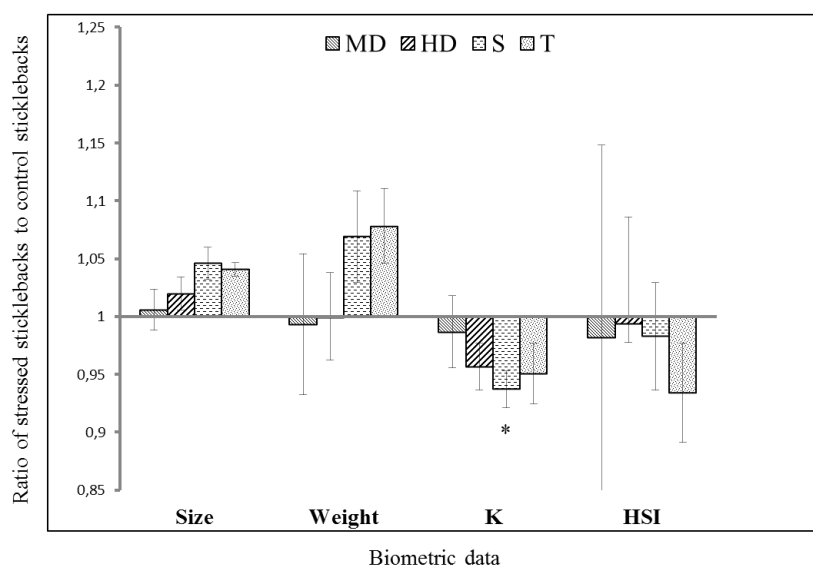


Fig. 2: Biometric data according to caging conditions. Results are expressed as ratios of medium and high densities relative to controls kept at a density of 1.08 kg/m³, as ratios of sticklebacks without food supply relative to controls with food intake, and as ratios of sticklebacks with transport relative to those without transport. Histograms represent means of ratios ± SEM. MD: medium density (2.31 kg/m³); HD: high density (3.54 kg/m³); S: starvation; T: with a short transport (20 minutes); K: Fulton's condition index; HSI: hepato-somatic index. * Statistical difference within an experiment for 0.01 < p ≤ 0.05.

Our results showed that the more fish density increased, the more the biomarkers were modified. After 14 days of caging, condition index tended to decrease for fish caged with the highest density compared to fish caged with the lowest density. Nevertheless, this difference was not significant. Some studies reported decreases of condition index due to high density confinement, but with a longer period of this stress. Pickering et al. (1991) highlighted a decrease of the condition index, when rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, were submitted to at least five months of chronic crowding. Andrade et al. (2015) highlighted the same effect on the Senegalese sole, *Solea senegalensis*, after 60 days at high density. It could be that if the caging time of our study was more important, the condition index of fish caged with the highest density would significantly decrease. Kiron (2012) reported that fish density, as transport, is stressful for fish and can be immunosuppressive. In our study, the increase of stickleback density in cages had negative effects on their immune capacities. Leucocyte necrosis and apoptosis tended to be higher, but not significantly, in fish caged with the highest density compared to the other two densities (leucocyte apoptosis was nonetheless

significantly higher in sticklebacks caged with the highest density compared to the medium density).

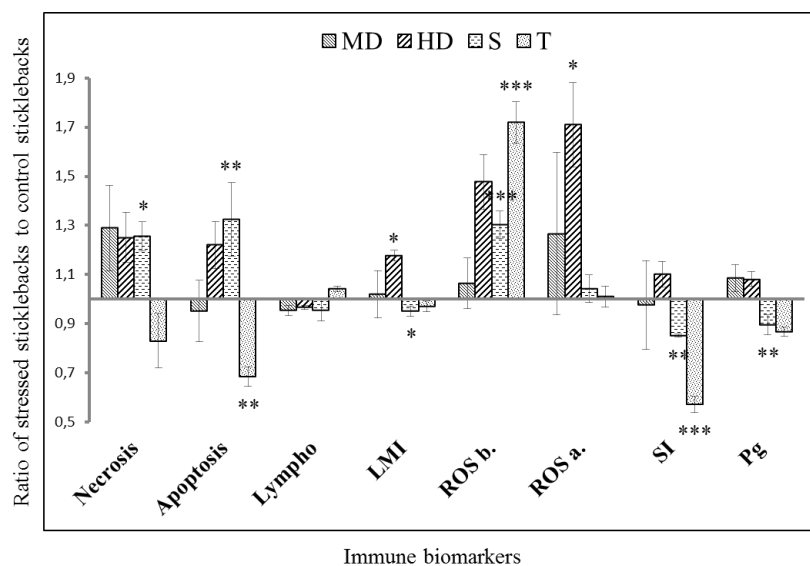


Fig. 3: Immune capacities according to caging conditions. Results are expressed as ratios of medium and high densities relative to controls kept at a density of 1.08 kg/m³, as ratios of sticklebacks without food supply relative to controls with food intake, and as ratios of sticklebacks with transport relative to those without transport. Histograms represent means of ratios ± SEM. MD: medium density (2.31 kg/m³); HD: high density (3.54 kg/m³); S: starvation; T: with a short transport (20 minutes); Necrosis: leucocyte necrosis; Apoptosis: leucocyte apoptosis; Lympho: Lymphocyte percentage among leucocytes; LMI: lysosomal membrane integrity; ROS b.: ROS basal level; ROS a.: ROS activated level; SI: Stimulation index of respiratory burst; Pg: phagocytic capacity. * Statistical difference within an experiment for 0.01 < p ≤ 0.05. ** Statistical difference within an experiment for 0.001 < p ≤ 0.01. *** Statistical difference within an experiment for p ≤ 0.001.

LMI was greater with the highest fish density. The LMI decrease is linked to leucocyte necrosis and apoptosis, as well as to an increase of ROS production (Hultin 1995; Pompéia et al. 2000; Bado-Nilles et al. 2013). However, in our study, leucocyte apoptosis and ROS basal level increased with density. This increase of LMI level was not logical according to the other immune responses. It is possible that the increase of the fluorescence was not due to greater lysosomal membrane integrity, but rather due to a higher number of lysosomes. This hypothesis is supported by the fact that the differences in red fluorescence used for LMI between conditions were not observed with the green fluorescence (data not shown), and by a higher ROS production in fish caged with the highest density, often accompanied by enzymes released by the lysosome. Ruane et al. (1999) observed a decrease of leucocyte number in rainbow trout and brown trout, *Salmo trutta*, with a confinement stress. In our study, no difference of lymphocyte percentage was seen. The increase of fish density in cages also increased respiratory burst. ROS production (ROS activated levels) was higher with the

highest density compared to the other two densities. ROS production can be influenced by many variables including crowding (Andrade et al. 2015). This can be due to energetic demands imposed by crowding (Trenzado et al. 2009). Other studies showed that immune capacities can be affected after confinement stress. Twenty-three hours after confinement stress, oxygen radical production of brown trout increased (Ruane et al. 1999). A high fish density can suppress immune capacities (respiratory burst and phagocytosis) (Vazzana et al. 2002). The increase in ROS production can create an oxidative stress, and therefore can induce the establishment of the antioxidant system. Nevertheless, in our study, fish density did not impact antioxidant system or induce lipid peroxidation, unlike in other studies. Trevisan et al. (2013) showed that high fish density altered parts of the antioxidant system (GSH and GST) of Nile tilapia, and these effects were higher than effects of a polymetallic contamination. Correlatively, Andrade et al. (2015) reported lower SOD, GPx, Gr activities and higher lipid peroxidation when Senegalese sole were kept 60 days at high density compared to low density. Although 14 days of caging is a short duration, Trevisan et al. (2013) observed these effects after 7 days of caging. Our differences in results with other studies may be due to the species. Indeed, responses to confinement and density stress depended to the species caged (Ruane et al. 1999; Caruso et al. 2005), and the developmental stage studied. Some of these studies focused on juvenile fish (Ruane et al. 1999; Andrade et al. 2015), while our study was used adults. Moreover, it is important to differentiate fish density in tanks at the laboratory or aquaculture (Ruane et al. 1999; Vazzana et al. 2002; Andrade et al. 2015) and caging in the field (Trevisan et al. 2013). Indeed, water volume inside tanks is limited and not constantly renewed compared to *in situ* caging.

In our study, the highest density induced stress on sticklebacks, particularly on immunity. No significant difference was observed between biomarkers from sticklebacks caged with the lowest density and those from sticklebacks caged with the intermediate density. For further *in situ* experiments on adult sticklebacks, we recommend the use of a low fish density in cages (1.08 or 2.31 kg/m³) in order to limit modulations of ecotoxicity immunomarkers caused by a high density (3.54 kg/m³). It is also preferable to cage social fish, or gregarious fish, and avoid breeding period, to eliminate competition and cannibalism between fish (Oikari 2006).

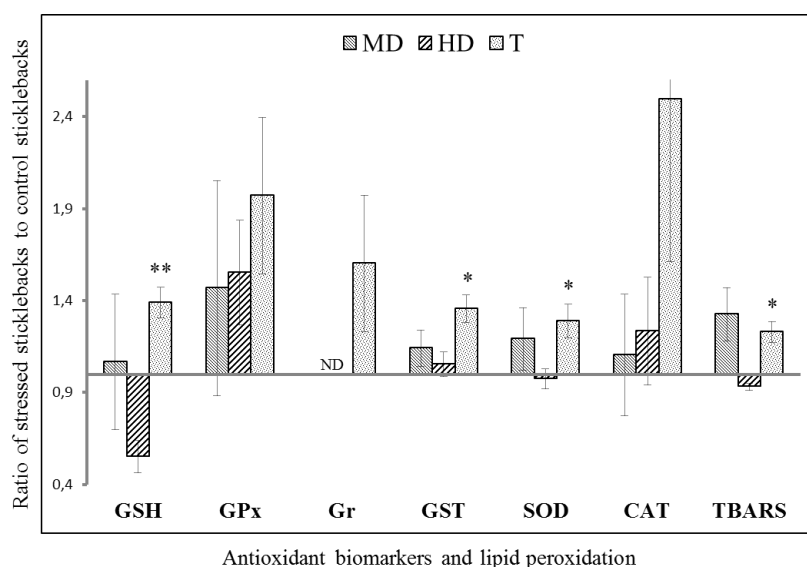


Fig. 4: Antioxidant system and lipid peroxidation according to caging conditions. Results are expressed as ratios of medium and high densities relative to controls kept at a density of 1.08 kg/m^3 , and as ratios of sticklebacks with transport relative to those without transport. Histograms represent means of ratios \pm SEM. MD: medium density (2.31 kg/m^3); HD: high density (3.54 kg/m^3); S: starvation; T: with a short transport (20 minutes); GSH: total glutathione; GPx: glutathione peroxidase; Gr: glutathione reductase; GST: glutathione-S-transferase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; ND: not determined. * Statistical difference within an experiment for $0.01 < p \leq 0.05$. ** Statistical difference within an experiment for $0.001 < p \leq 0.01$.

4.3. Effects of starvation on fish biomarkers

During an *in situ* experiment, the study site can be far from the laboratory and providing food daily to the caged fish can be difficult. That is one reason why it is important to estimate the effect of starvation on fish during caging procedure. The diet of the three-spined stickleback is made up of small invertebrates, such as worms, insects or crustaceans, as well as larvae or plankton (Hynes 1950; Allen and Wootton 1984). The meshes of our cage ($3.5 \times 3.5 \text{ mm}$) allowed the passage of these organisms. For fish caged in one cage, the food supply / fish ratio (6 % every two days) was estimated according to several studies (Allen and Wootton 1982; Triglidae 1998; Richter et al. 2002; Pascual et al. 2003; Craig and Helfrich 2009; Bado-Nilles et al. 2014b). Sticklebacks without supplementary food were not subject to a nutritional stress, proven by energetic reserves. Indeed, no significant differences of free sugars, lipid and glycogen contents were observed between livers from fish which received no supplementary food compared to livers from fed fish. These results can be explained by our short period of fasting. Indeed, most studies working on the effects of fasting lasted from two to nine weeks and fish from these studies did not have access to other potential food sources, unlike our sticklebacks, which can eat what passed through the mesh (Blom et al. 2000; Regost et al. 2001; Caruso et al. 2011; Gimbo et al. 2015). One month of starvation resulted in a decrease

in lipid levels in the pacu, *Piaractus mesopotamicus*, but it was not enough to cause a decrease in glycogen content in the liver of this fish (Gimbo et al. 2015). Despite a lack of significant differences in energetic reserves, our unfed sticklebacks had a lower K than fish fed every two days. A two week starvation was enough to induce a decrease of the three-spined stickleback condition index (Pottinger et al. 2002). This decrease was observed in other studies, but with longer periods of starvation. For rainbow trout, a decrease of condition index was observed after two weeks of starvation and a weight loss after 6 or 7 weeks (Sumpter et al. 1991; Blom et al. 2000). Regost et al. (2001) observed that a fat diet increased condition index of brown trout and a starvation resulted in a decrease of this index after 12 weeks of starvation. In our study, no difference concerning HSI was observed. Blom et al. (2000) found a decrease of rainbow trout HSI after 3 and 7 weeks of starvation. Similarly, HSI of brown trout decreased after 2 months of starvation (Regost et al. 2001). Therefore, we hypothesize that two weeks of starvation is not enough to induce an effect on this index in three-spined sticklebacks.

Among treatments tested in this study, the lack of food induced the most effects on fish immune system. Except the lymphocyte percentage, starvation induced increases of leucocyte necrosis, apoptosis, and ROS basal level, while LMI and phagocytic capacity were reduced with starvation. Lipids are important for leucocyte and lysosomal membrane integrities. Lipids are constituents of membranes and are involved in the synthesis of several immune protagonists (Lall 2000; Kiron 2012; Henry and Fountoulaki 2014). A change in lipid amounts or nature can be detrimental for fish immunity (Lall 2000). The slight and not significant decrease of lipids contents can affect cell membranes, and thus negatively affect leucocyte integrity (leucocyte necrosis, apoptosis and LMI) shown in our study.

Immune cells need nutrients to activate their functions, including phagocytosis. Although fasting had no effect on hepatic reserves, deficiencies of certain nutrients might explain the reduction of phagocytic capacity in unfed sticklebacks. Lall (2000) highlighted the importance of lipids in phagocytic process. Some fatty acids are essentials to keep membrane fluidity and therefore are essentials to the ingestion phase of phagocytosis (Lall 2000). Starvation was the only constraint tested in our study that had repercussions to the phagocytic capacity. Therefore, this decrease of phagocytic capacity also can be due to the slight reduction in lipid contents. Another hypothesis to explain this decrease of phagocytic capacity is that carbohydrates (glycogen and glucose), in addition to their utility in energy production, are involved directly or indirectly in the regulation of immune function (Secombes and

Fletcher 1992; Waagbø 1994). The slight and not significant decrease of glycogen content may explain a decrease of phagocytic capacity. Several studies have pointed out that a lack or an excess of carbohydrate (included glycogen and glucose) levels affect the fish physiology and immune system and their resistance during a challenge against pathogens (Waagbø 1994; Li et al. 2012). These immunosuppressive effects of the lack of carbohydrate may be the cause of the decrease in phagocytic capacity observed in our study in fish with no supplementary food.

Although stickleback phagocytic capacity was reduced by starvation, ROS basal level was enhanced by this constraint. Martínez-Álvarez et al. (2005) also reported oxidative stress after starvation. Immune capacities are energetically costly (Gimbo et al. 2015). However, two important energy sources are glycogen and glucose, and the glycogen in fish liver can be used to release glucose after fasting (Hemre et al. 2002). Glycogen cost for respiratory burst may explain the slight decrease of glycogen contents in our study. In other studies, immune capacities were reduced with starvation, for example in the European seabass, *Dicentrarchus labrax*, or in the pacu, which presented a lower respiratory burst after 30 or 31 days of starvation (Caruso et al. 2011; Gimbo et al. 2015).

Our study showed that stickleback starvation during caging can be conducted for two weeks without having repercussions on energetic reserves. Nonetheless, some immunomarkers can react with starvation, thus it is better to feed fish continuously over caging. The choice of species and diet is crucial before performing an in situ experiment involving caging. Similarly, if starvation is performed, it is necessary to choose a fish species with a large diet (Oikari 2006).

4.4. Effects of a short transport on fish biomarkers

In order to facilitate dissections, it is sometimes necessary to transport fish at the dissection place or in the laboratory. This transport is often short, but can create a stress. Few studies assessed stress of a short transport (less than one hour). In a general manner, studies which assessed transport effects showed a stress on fish, by quick increases of cortisol and blood glucose concentrations (Möck and Peters 1990; Frisch and Anderson 2000; Acerete et al. 2004; Urbinati et al. 2004; Tacchi et al. 2015). In our study, transport impacted the immune system by increasing ROS basal level. Interestingly, 20 minutes of transport decreased leucocyte necrosis and apoptosis. Transport can affect skin and mucus, the first barriers against pathogens (Tacchi et al. 2015). Twenty minutes of transport induced a global increase

of antioxidant system and lipid peroxidation. This increase was correlated with the increase of ROS production. Antioxidant responses can be transient and be indicative of a stress (Sanchez et al. 2005; Valavanidis et al. 2006). Transport effect can be reversible and be attenuated rapidly when stopped (Möck and Peters 1990; Frisch and Anderson 2000; Urbinati et al. 2004). The significant effects on some biomarkers faded between 4 to 72 hours after the end of the transport (Frisch and Anderson 2000; Urbinati et al. 2004).

Transport stress was defined on sticklebacks by an oxidative stress (increase of ROS production and stimulation of the antioxidant system). However, this stress may be transient because of the short duration of transport. It would have been interesting to assess these biomarkers one hour after transport to confirm this hypothesis.

5. Conclusion

This study evaluated effects of two constraints linked to caging (fish density in cage and starvation) and one linked to handling post-caging (a short transport) on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback. Environmental studies using caged sticklebacks can be achieved with densities of 1.08 and 2.31 kg/m³ without having repercussions on biomarkers. Indeed, no significant difference was observed between the medium and the lowest density. Only the highest density (3.54 kg/m³) induced stress resulting in increases in ROS production. Fourteen days of starvation did not reduce energetic reserves contained in the stickleback livers. Nevertheless, some modulations of immune capacities were observed during this experiment. Further studies should be conducted to explain these immunomodulations after fasting for 14 days. A short transport between caging and dissection induced oxidative stress in sticklebacks, evident by increases in ROS production and antioxidant activities. Avoiding transport before dissection, caging system with the medium and the lowest densities and without food supply is valid with stickleback for two weeks in a context of ERA. Having the same caging conditions is the most important experimental design when using cages to study ERA. Improvements in this caging system are nonetheless possible, as increasing the contact cage-sediment to improve food availability or limiting transport before dissection.

Acknowledgments

The authors are deeply grateful to the owners of the different study sites for having allowed these environmental experiments. This work was partly supported by IRSN, the financial

support of the 181 DRC 46 program of the French Ministry for Ecology and Sustainable Development, and the ECCOREV research federation. The authors are grateful to Tom Hinton for his help in correcting the English form of this paper.

Compliance with ethical standards

These experiments were conducted in accordance with the European Commission's recommendation 2007/526/EC on revised guidelines for the accommodation and care of animals used for experimental and other scientific purposes. The registration number for ethics of INERIS laboratory is the B60-769-02. For sampling, to avoid bias in the immune responses, no anaesthetic overdose can be used for euthanasia of sticklebacks. Indeed, in the 2010/63 / EU Directive of the European Parliament and the 22 September 2010 Council about the protection of animals used for scientific purposes, this option is envisaged "if anesthesia is incompatible with the purpose of the procedure". Therefore, sticklebacks were rapidly sacrificed by cervical dislocation followed by destruction of the brain. This method has been approved by the Committee No. 96-CREMEAP (Regional Ethics Committee in Animal Experimentation of Picardy).

References

- Acerete L, Balasch JC, Espinosa E, Josa A, Tort L (2004) Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture* 237: 167-178
- Allen J, Wootton R (1982) The effect of ration and temperature on the growth of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of Fish Biology* 20: 409-422
- Allen JRM, Wootton RJ (1984) Temporal patterns in diet and rate of food consumption of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in Llyn Frongoch, an upland Welsh lake. *Freshwater Biology* 14: 335-346
- Andrade T et al. (2015) Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture* 438: 6-11
- Babo S, Vasseur P (1992) *In vitro* effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic toxicology* 22: 61-68
- Bado-Nilles A, Betoulle S, Geffard A, Porcher JM, Gagnaire B, Sanchez W (2013) Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the

- three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology. *Environmental science and pollution research international* 20: 2692-2704
- Bado-Nilles A et al. (2014a) Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus* sp. *Environ Pollut* 184: 9-17
- Bado-Nilles A, Techer R, Porcher JM, Geffard A, Gagnaire B, Betouille S, Sanchez W (2014b) Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Environmental toxicology and pharmacology* 38: 672-683
- 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: 576-581
- Blom S, Andersson TB, Förlin L (2000) Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 α -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquatic toxicology* 48: 265-274
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72: 248-254
- Brydges NM, Boulcott P, Ellis T, Braithwaite VA (2009) Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *Applied Animal Behaviour Science* 116: 295-301
- Campbell MD, Patino R, Tolan J, Strauss R, Diamond SL (2009) Sublethal effects of catch-and-release fishing: measuring capture stress, fish impairment, and predation risk using a condition index ICES. *Journal of Marine Science: Journal du Conseil*
- Carlberg I, Mannervik B (1975) Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250: 5475-5480
- Carr RS, Neff JM (1984) Quantitative semi-automated enzymatic assay for tissue glycogen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 77: 447-449

- Caruso G, Denaro MG, Caruso R, Mancari F, Genovese L, Maricchiolo G (2011) Response to short term starvation of growth, haematological, biochemical and non-specific immune parameters in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and blackspot sea bream (*Pagellus bogaraveo*). *Marine environmental research* 72: 46-52
- Caruso G, Genovese L, Maricchiolo G, Modica A (2005) Haematological, biochemical and immunological parameters as stress indicators in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata* farmed in off-shore cages. *Aquaculture International* 13: 67-73
- Cazenave J, Bacchetta C, Rossi A, Ale A, Campana M, Parma MJ (2014) Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators* 38: 104-112
- Chilmonczyk S, Monge D (1999) Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish & shellfish immunology* 9: 319-333
- Craig S, Helfrich LA (2009) Understanding fish nutrition, feeds, and feeding. *Virginia Cooperative Extension* 420-256: 1-4
- De Andrade VM, da Silva J, da Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML, de Freitas TRO (2004) Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44: 459-468
- Fenet H, Casellas C, Bontoux J (1998) Laboratory and field-Caging studies on hepatic enzymatic activities in European eel and rainbow trout. *Ecotoxicology and environmental safety* 40: 137-143
- Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA (1972) Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem* 18: 673-674
- Frisch A, Anderson T (2000) The response of coral trout (*Plectropomus leopardus*) to capture, handling and transport and shallow water stress. *Fish physiology and biochemistry* 23: 23-34
- Gagnaire B et al. (2015) Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of *in situ* metal toxicity. *Ecotoxicology* 24: 215-231
- Gimbo RY, Fávero GC, Franco Montoya LN, Urbinati EC (2015) Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish & shellfish immunology* 43: 295-300

- Gust M, Fortier M, Garric J, Fournier M, Gagne F (2013) Immunotoxicity of surface waters contaminated by municipal effluents to the snail *Lymnaea stagnalis*. *Aquat Toxicol* 126: 393-403
- Haasch ML, Lech JJ, Prince R, Cooper KR, Wejksnora PJ (1993) Caged and wild fish: Induction of hepatic cytochrome P-450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor. *Environmental toxicology and chemistry* 12: 885-895
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249: 7130-7139
- Hemre GI, Mommsen TP, Krogdahl Å (2002) Carbohydrates in fish nutrition: effects on growth, glucose metabolism and hepatic enzymes. *Aquaculture Nutrition* 8: 175-194
- Henry M, Fountoulaki E (2014) Optimal dietary protein/lipid ratio for improved immune status of a newly cultivated Mediterranean fish species, the shi drum *Umbrina cirrosa*, L. *Fish & shellfish immunology* 37: 215-219
- Hinck JE et al. (2008) Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern United States. *The Science of the total environment* 390: 538-557
- Hultin HO (1995) Role of membranes in fish quality. *Fish Quality-Role of Biological Membranes*: 13-35
- Hynes H (1950) The food of fresh-water sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* and *Pygosteus pungitius*), with a review of methods used in studies of the food of fishes. *The journal of animal ecology*: 36-58
- Kiron V (2012) Fish immune system and its nutritional modulation for preventive health care. *Animal Feed Science and Technology* 173: 111-133
- Knag AC, Taugbøl A (2013) Acute exposure to offshore produced water has an effect on stress- and secondary stress responses in three-spined stickleback *Gasterosteus aculeatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 158: 173-180
- Lagadic L, Caquet T, Amiard J (1997a) Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions L Lagadic, T Caquet, JC Amiard and F Ramade, Editors, Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux, Masson, Paris:1-9
- Lagadic L, Caquet T, Amiard J (1997b) Intérêt d'une approche multiparamétrique pour le suivi de la qualité de l'environnement Biomarqueurs en écotoxicologie Aspects Fondamentaux Masson, Paris:393-401

- Lall SP (2000) Nutrition and health of fish1
- Li X-F, Liu W-B, Lu K-L, Xu W-N, Wang Y (2012) Dietary carbohydrate/lipid ratios affect stress, oxidative status and non-specific immune responses of fingerling blunt snout bream, *Megalobrama amblycephala*. *Fish & shellfish immunology* 33: 316-323
- Martínez-Álvarez R, Morales A, Sanz A (2005) Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fisheries* 15: 75-88
- Möck A, Peters G (1990) Lysozyme activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), stressed by handling, transport and water pollution. *Journal of Fish Biology* 37: 873-885
- OECD (2000) Eleventh addendum to the OECD guidelines for testing of chemicals. *OECD Publishing*
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95: 351-358
- Oikari A (2006) Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic toxicology* 78: 370-381
- Oliva M, Perales JA, Gravato C, Guilhermino L, Galindo-Riano MD (2012) Biomarkers responses in muscle of Senegal sole (*Solea senegalensis*) from a heavy metals and PAHs polluted estuary. *Marine pollution bulletin* 64: 2097-2108
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 70: 158-169
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Analytical biochemistry* 154: 536-541
- Pascual P, Pedrajas JR, Toribio F, López-Barea J, Peinado J (2003) Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-biological interactions* 145: 191-199
- Pereira R, Pereira ML, Ribeiro R, Goncalves F (2006) Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environ Pollut* 139: 561-575
- Péry ARR et al. (2014) A physiologically based toxicokinetic model for the zebrafish *Danio rerio*. *Environmental Science & Technology* 48: 781-790

- Pickering AD, Pottinger TG, Christie P (1982) Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology* 20: 229-244
- Pickering AD, Pottinger TG, Sumpter JP, Carragher JF, Le Bail PY (1991) Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and comparative endocrinology* 83: 86-93
- Pompéia C, Lopes LR, Miyasaka CK, Procópio J, Sannomiya P, Curi R (2000) Effect of fatty acids on leukocyte function. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33: 1255-1268
- Pottinger T, Carrick T, Yeomans W (2002) The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish Biology* 61: 207-229
- Regost C, Arzel J, Cardinal M, Laroche M, Kaushik SJ (2001) Fat deposition and flesh quality in seawater reared, triploid brown trout (*Salmo trutta*) as affected by dietary fat levels and starvation. *Aquaculture* 193: 325-345
- Richter H, Luckstadt C, Schlechtriem C, Focken U, Becker K (2002) Evidence of violation of a basic assumption in models currently used for food consumption estimation in fish. *Archive of Fishery and Marine Research* 49:171-188
- Ruane N, Wendelaar Bonga S, Balm P (1999) Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary–interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and comparative endocrinology* 115: 210-219
- Sanchez W, Ait-Aissa S, Palluel O, Ditché JM, Porcher JM (2007) Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16: 279-287
- Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, Ditché JM, Porcher JM (2008a) Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environment international* 34: 490-498
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Ait-Aissa S (2005) Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environmental toxicology and pharmacology* 19: 177-183
- Sanchez W, Piccini B, Ditché JM, Porcher JM (2008b) 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: 791-798

- Scarcia P, Calamante G, de la Torre F (2014) Biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*) and native collected fish (*Leporinus obtusidens*) in the Río de la Plata Estuary, Argentina. *Environmental toxicology* 29: 950-960
- Secombes CJ, Fletcher TC (1992) The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2: 53-71
- Sumpter JP, Le Bail PY, Pickering AD, Pottinger TG, Carragher JF (1991) The effect of starvation on growth and plasma growth hormone concentrations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and comparative endocrinology* 83: 94-102
- Tacchi L, Lowrey L, Musharrafieh R, Crossey K, Larragoite ET, Salinas I (2015) Effects of transportation stress and addition of salt to transport water on the skin mucosal homeostasis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 435: 120-127
- Trenzado CE, Morales AE, Palma JM, de la Higuera M (2009) Blood antioxidant defenses and hematological adjustments in crowded/uncrowded rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed on diets with different levels of antioxidant vitamins and HUFA. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 149: 440-447
- Trevisan R et al. (2013) Confinement during field studies may jeopardize antioxidant and physiological responses of Nile tilapia to contaminants. *Marine environmental research* 91: 97-103
- Triglidae SB (1998) Field estimates of food consumption of the searobin *Prionotus pumilus* (Bloch, 1797) on the continental shelf off Ubatuba, southeastern Brazil. *Rev bras oceanogr* 46: 1
- Urbinati EC, de Abreu JS, da Silva Camargo AC, Landinez Parra MA (2004) Loading and transport stress of juvenile matrinxã (*Brycon cephalus*, Characidae) at various densities. *Aquaculture* 229: 389-400
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M (2006) Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and environmental safety* 64: 178-189
- Vandeputte C, Guizon I, Genestie-Denis I, Vannier B, Lorenzon G (1994) A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: performance study of a new miniaturized protocol. *Cell biology and toxicology* 10: 415-421

Vazzana M, Cammarata M, Cooper E, Parrinello N (2002) Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210: 231-243

Waagbø R (1994) The impact of nutritional factors on the immune system in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: a review. *Aquaculture Research* 25: 175-197

CHAPITRE 7 : DISCUSSION GENERALE



1. Les rejets miniers uranifères

1.1. La composition métallique des rejets miniers

Bien qu'aucun des quatre étangs non soumis aux rejets miniers (Madic, Etang Noir, Malessard et la Jonchère Saint-Maurice) ne soit exempté de métaux, ils sont considérés comme des « étangs de référence » pour nos études. Quant aux deux étangs sous influence de rejets miniers (Saint-Pierre et Pontabrier), ils sont nommés « étangs contaminés ».

Ces derniers ont présenté des concentrations uranifères largement plus importantes que celles retrouvées dans les quatre autres étangs (de 6,0 à 38,1 µg/L d'uranium dans la fraction dissoute de l'eau pour les étangs contaminés et de 0,0 à 0,3 µg/L d'uranium pour les autres étangs). En plus de l'uranium, des concentrations plus élevées ont également été mesurées pour le manganèse dans les étangs contaminés (de 2 à 7 fois supérieures dans les étangs contaminés par rapport aux étangs de référence) (Cf. Tableau 7). Ces différences de concentrations pour les autres métaux majoritaires (baryum, aluminium, manganèse) entre les étangs n'ont pas suivi les mêmes tendances. Bien que les concentrations en aluminium les plus élevées de Haute-Vienne aient été retrouvées dans l'étang de Pontabrier, les deux étangs de référence du Cantal ont présenté de plus fortes concentrations en aluminium en comparaison à tous les autres plans d'eau (Cf. Tableau 7). Les différences de pollution métallique entre les étangs dits contaminés et les étangs de référence étaient donc focalisées sur les concentrations en uranium et en manganèse.

De nombreuses études ont rapporté la présence de ces cinq métaux dans des plans ou cours d'eau proches de mines d'uranium abandonnées (Cf. Tableau 13). Pyle et al. (2002) ainsi que Herlory et al. (2013) ont rapporté des concentrations métalliques semblables respectivement dans un étang du Canada et dans un cours d'eau du Limousin soumis à des rejets miniers. En comparant les concentrations de ces cinq métaux lors d'autres études sur les mines d'uranium (Cf. Tableau 13), les valeurs retrouvées au Canada et en France sont du même ordre de grandeur. Cependant, ces concentrations sont largement inférieures par rapport à celles retrouvées dans les quatre autres pays pour lesquelles des données existent dans la littérature (Portugal, Brésil, Tajikistan et Kirgizstan) (Cf. Tableau 13).

Tableau 13 : Liste des concentrations métalliques (U, Al, Fe, Mn et Ba) en µg/L retrouvées dans la fraction totale ou dissoute de l'eau de surface au niveau de plans ou cours d'eau impactés par d'anciens sites miniers uranifères. NA : non analysé.

Référence	Pays	U	Al	Fe	Mn	Ba	Saison	Fraction de l'eau	Remarque
		µg/L							
<i>Le Guernic et al.</i>	France	23	83	264	52	19	Printemps	Dissoute	Etang proche d'anciennes mines d'uranium (Pontabrier)
<i>Le Guernic et al.</i>	France	6	44	166	218	17	Printemps	Dissoute	Etang proche d'un ancien site minier uranifère (Saint-Pierre)
<i>Herlory et al. (2013)</i>	France	9	42	200	55	42	Été à Hiver	Dissoute	Cours d'eau recevant des rejets d'anciens sites miniers
<i>Gagnaire et al. (2015)</i>	France	21	57	274	45	22	Printemps	Dissoute	Etang proche d'anciennes mines d'uranium (Pontabrier)
<i>Pinto et al. (2004)</i>	Portugal	8490	NA	19800	15100	NA	Été	Dissoute	Analyses de l'eau recouvrant la mine
<i>Antunes et al. (2007)</i>	Portugal	552	495	1692	7016	29	Printemps	Dissoute	Analyses de l'eau recouvrant la mine
<i>Antunes et al. (2007)</i>	Portugal	680	9070	10657	11865	17	Automne	Dissoute	Analyses de l'eau recouvrant la mine
<i>Marques et al. (2008)</i>	Portugal	1750	NA	3260	7450	NA	-	Totale	Etang proche d'un ancien site minier uranifère
<i>Marques et al. (2013)</i>	Portugal	572	1519	1299	5832	NA	-	Totale	Analyses de l'eau recouvrant la mine
<i>Pyle et al. (2002)</i>	Canada	9	47	NA	NA	65	-	Totale	Etang proche d'un ancien site minier uranifère
<i>Klaverkamp et al. (2002)</i>	Canada	NA	NA	1238	68	NA	Été	Dissoute	Etang proche d'un ancien site minier uranifère
<i>Bennett et Janz (2007)</i>	Canada	0,4	NA	NA	NA	NA	Printemps et automne	Totale	Cours d'eau recevant des rejets d'anciens sites miniers
<i>Kraemer et Evans (2012)</i>	Canada	28	NA	NA	NA	NA	Printemps	Dissoute	Etang proche d'un ancien site minier uranifère
<i>Campos et al. (2011)</i>	Brésil	4020	NA	5180	88420	NA	Printemps	Totale	Analyses de l'eau recouvrant la mine
<i>Skipperud et al. (2013)</i>	Tadjikistan	1660	NA	1780	2710	NA	Automne	Dissoute	Analyses de l'eau recouvrant la mine
<i>Lind et al. (2013)</i>	Kyrgyzstan	213	NA	NA	NA	NA	Été	Totale	Etang proche d'un ancien site minier uranifère

Les différences de concentrations métalliques entre les différentes études peuvent être dues à plusieurs facteurs :

- L'eau prélevée directement au-dessus des mines est plus chargée en métaux que celle d'étangs recevant des rejets miniers, comme l'ont montré les études de Pinto et al. (2004), de Campos et al. (2011) et de Marques et al. (2013). Cette diminution peut être due aux traitements des radionucléides ainsi qu'aux phénomènes de dilution et de diffusion.
- La distance entre le site minier et les sites d'études peut varier en fonction des études, augmentant ou diminuant la dispersion/dilution des métaux et donc leurs concentrations.
- Bien que toutes ces études aient été réalisées au niveau de mines d'uranium abandonnées, certains des sites ne sont pas réhabilités et/ou aucune limitation des impacts chimiques n'a été mise en place à cause des coûts élevés, comme au Tadjikistan (Vinson, 2012).
- Les pays présentés dans le Tableau 13 contiennent de plus grosses réserves d'uranium que la France, et les pays non-européens continuent l'extraction d'uranium depuis d'autres mines. Il faut toutefois noter que le Kirghizstan et le Tadjikistan ne contiennent pas les plus grosses réserves mondiales d'uranium, mais sont limitrophes au Kazakhstan, le pays ayant les plus importantes réserves mondiales de cet actinide (CDE, 2014).
- Enfin, certaines analyses ont été réalisées sur la fraction dissoute de l'eau tandis que d'autres ont été faites sur la fraction totale, qui contient généralement des concentrations métalliques plus importantes.

Même si les concentrations des cinq métaux majoritaires trouvées dans notre étude sont faibles par rapport à celles retrouvées dans d'autres pays, et que leurs différences entre les étangs sont focalisées sur l'uranium et le manganèse, ces différences ont permis de distinguer chimiquement les étangs contaminés de ceux de référence. Ceci est d'autant plus certain dans le département de la Haute-Vienne où l'étang de Pontabrier présentait les plus fortes concentrations des cinq métaux lors de la deuxième expérimentation *in situ* (avril 2014, Cf. Tableau 11). La présence et les concentrations des métaux dits « minoritaires », ainsi que les variations métalliques saisonnières sont discutées dans ce chapitre, partie 3.2.1.

1.2. D'autres sources de contamination

1.2.1. Sources chimiques et biologiques

Bien que ces analyses n'aient été réalisées que lors de la deuxième expérimentation *in situ*, et donc seulement en Haute-Vienne, les trois étangs étudiés ne présentaient pas de concentrations en HAP, COV, PCB, pesticides et cyanobactéries testés, supérieures aux limites de détection des appareils de mesure (Cf. Tableau 14 et Annexe 2).

Tableau 14 : Limite de détection des appareils de mesure pour les analyses de HAP, PCB, COV et 6 pesticides des trois étangs de Haute-Vienne. Analyses réalisées par le laboratoire des eaux de la ville de Limoges.

Catégorie de polluant	Polluant	LD (ou gamme)
COV	-	< 0,05 µg/L
HAP	-	de < 0,002 à < 1 µg/L
PCB	-	< 0,01 µg/L
Pesticides	Atrazine	< 0,01 µg/L
	Diuron	< 0,01 µg/L
	2.4D	< 0,03 µg/L
	Triclopyr	< 0,08 µg/L
	AMPA	< 0,03 µg/L
	Glyphosate	< 0,03 µg/L

1.2.2. Sources de radioactivité

La radioactivité a été mesurée seulement lors de la première expérience dans les sédiments des six étangs. Le Tableau 15 en résume les valeurs. Malgré l'unique réplica et un nombre important de mesures en-dessous de la limite de détection de l'appareil (spectromètre gamma), la radioactivité retrouvée dans l'étang contaminé, Saint-Pierre, était plus forte pour le département du Cantal. Ce n'était pas le cas en Haute-Vienne, où la radioactivité la plus élevée se retrouvait dans deux étangs : Pontabrier et Malessard.

Ces niveaux d'activité correspondent à ceux trouvés au niveau des sites miniers français (Acro, 2007; Pearl, 2009; Gagnaire et al., 2015), mais se situent dans la tranche basse des activités rapportées par des études réalisées dans d'autres pays (Lozano et al., 2000; Černe et

al., 2012; Skipperud et al., 2013). Cette faible activité retrouvée dans l'étang de Pontabrier pourrait être expliquée par le curage des sédiments de cet étang effectué tous les cinq ans par le gestionnaire des mines à proximité.

Le Roux (2007) a estimé le fond géochimique de l'uranium 238 en France, équivalent à une activité de 40 Bq/kg. L'activité radiologique de l'uranium naturel est représentée en proportions égales par celle de l'uranium 234 (49,5 %) et par celle de l'uranium 238 (48,2 %) (Bleise et al., 2003). Dans notre étude, les mesures d'activité de cet élément dans tous les étangs étaient inférieures à la limite de détection, confirmant donc que la radiotoxicité de l'uranium naturel est négligeable par rapport à sa chimiotoxicité (Cf. Tableau 15). Inversement, les activités du thorium 232 mesurées dans les étangs de Saint-Pierre, Pontabrier et Malessard sont de 3 à 8 fois supérieures au niveau d'activité moyen dans les sols français (40 Bq/kg) évalué par Le Roux (2007).

Tableau 15 : Radioactivité (en Bq/kg) des produits de dégradation de l'uranium évaluée dans les sédiments des étangs du Cantal (en bleu) et de la Haute-Vienne (en vert) au D28 (n = 1). Les valeurs en gras indiquent la radioactivité la plus forte par département et par radionucléide. LD : limite de détection.

		²³⁴ U	²³⁵ U	²³⁶ U	²¹⁰ Pb	²¹¹ Pb	²¹² Pb	²¹⁴ Pb	²²⁸ Ac
Cantal	Saint-Pierre	<LD	8,32	<LD	169,77	<LD	44,63	82,65	44,72
	Madic	<LD	<LD	<LD	328,79	<LD	21,21	<LD	22,73
	Etang Noir	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	29,16	22,96	31,13
Haute-Vienne	Pontabrier	<LD	27,59	<LD	260,1	34,48	155,17	151,23	164,53
	Malessard	<LD	40,34	<LD	605,88	<LD	87,39	284,87	106,72
	Jonchère Saint-Maurice	<LD	<LD	<LD	76,23	6,59	21,05	42,83	24,19
		²²⁷ Th	²²⁸ Th	²³⁰ Th	²³¹ Th	²³² Th	²³⁴ Th	²⁰⁷ Tl	²⁰⁸ Tl
Cantal	Saint-Pierre	3,22	<LD	218,43	26,65	136,31	94,9	<LD	14,76
	Madic	<LD	<LD	<LD	<LD	42,42	<LD	<LD	16,67
	Etang Noir	<LD	<LD	130,15	16,26	30,64	16,85	<LD	9,36
Haute-Vienne	Pontabrier	6,4	424,63	835,96	<LD	246,31	320,69	<LD	51,23
	Malessard	22,69	<LD	<LD	46,22	347,9	428,57	<LD	32,77
	Jonchère Saint-Maurice	<LD	<LD	<LD	6,39	59,9	52,57	<LD	7,54
		²²³ Ra	²²⁴ Ra	²²⁶ Ra	²¹¹ Bi	²¹² Bi	²¹⁴ Bi	²³¹ Pa	²³⁴ Pa
Cantal	Saint-Pierre	4,38	48,48	34,17	<LD	44,63	74,6	<LD	187,03
	Madic	<LD	69,7	71,21	<LD	<LD	<LD	<LD	822,73
	Etang Noir	3,15	26,31	48,77	<LD	42,27	19,61	<LD	77,64
Haute-Vienne	Pontabrier	<LD	154,19	15,76	<LD	182,27	138,92	<LD	270,94
	Malessard	11,76	84,87	198,32	<LD	73,95	255,46	<LD	886,55
	Jonchère Saint-Maurice	8,06	20,42	93,93	<LD	13,19	38,12	<LD	192,36

1.3. Accumulation des métaux dans les organes des épinoches

La bioaccumulation des cinq métaux majoritaires a été évaluée après 28 jours d'exposition dans les étangs de la Haute-Vienne et du Cantal. Pour les deux départements, une constante a été remarquée : les épinoches engagées dans les étangs recevant les rejets miniers ont présenté des concentrations uranifères dans la rate, le foie et le muscle plus importantes que les épinoches engagées dans les étangs de référence. Cette observation a été confirmée par les corrélations significatives et positives entre les concentrations en uranium dans les eaux et la bioaccumulation dans les organes. L'accumulation de l'aluminium dans la rate était aussi plus importante chez les épinoches engagées dans les étangs contaminés que dans les étangs de référence. Cette différence était encore confirmée par les corrélations entre concentration dans les étangs de Haute-Vienne et la bioaccumulation. Les autres métaux (fer, manganèse, baryum) n'ont pas été accumulés différemment selon les étangs.

Cette bioaccumulation de l'uranium dans les organes des poissons exposés aux rejets miniers uranifères a été observée maintes fois dans la littérature (Parkhurst et al., 1984; Klaverkamp et al., 2002; Kelly et Janz, 2009; Kraemer et Evans, 2012; Skipperud et al., 2013; Gagnaire et al., 2015). Les valeurs de concentrations uranifères retrouvées dans les organes des épinoches sont du même ordre de grandeur que la quasi-totalité de ces études, excepté pour celle de Kelly et Janz (2009) qui n'ont pas mesuré à quelles concentrations métalliques les grands brochets (*Esox lucius*) étaient exposés. Bien que les concentrations d'autres métaux que l'uranium aient été plus importantes au niveau du site contaminé, Klaverkamp et al. (2002), Skipperud et al. (2013) et Gagnaire et al. (2015) n'ont pas observé de différences de bioaccumulation dans les organes entre les poissons engagés dans ce site contaminé ou dans le site de référence. Ceci vient appuyer les résultats de bioaccumulation de l'aluminium, du manganèse, du baryum et du fer dans les organes des épinoches.

Une observation intéressante est que les cinq métaux ont été accumulés plus fortement dans la rate que dans les deux autres organes. Cet organe n'est que très peu utilisé pour évaluer la bioaccumulation métallique. Chez la souris (*Mus musculus*), la rate a accumulé plus de zinc et de cuivre pendant les 40 premiers jours que les autres organes testés, le rein et le foie (Teodorova et al., 2003). Cependant, ceci n'est pas valable pour le cadmium, le plomb ainsi que pour le cuivre et le zinc passé 40 jours (Teodorova et al., 2003). Les observations de

bioaccumulation dans la rate des épinoches ont peut-être révélé un organe de choix pour la bioaccumulation métallique.

Excepté à Saint-Pierre, le muscle a accumulé plus de métaux que le foie des épinoches. Ce résultat est contradictoire avec ceux de Kraemer et Evans (2012), de Skipperud et al. (2013) et de Gagnaire et al. (2015). Ceci est d'autant plus important avec l'uranium qui peut se concentrer 47 fois plus dans le foie que dans le muscle du poisson rouge, *Carassius auratus* (Skipperud et al., 2013), et avec le fer accumulé 1000 fois plus dans le foie que dans le muscle des gardons (Gagnaire et al., 2015).

Ces niveaux de bioaccumulation sont toutefois très dépendants de l'organe testé et de l'espèce, comme le montrent les comparaisons entre les travaux décrits dans ce manuscrit et ceux de Gagnaire et al. (2015), ou entre la bioaccumulation chez le grand brochet et chez le meunier noir, *Catostomus commersoni* (Klaverkamp et al., 2002). Comme pour la disponibilité des métaux dans les compartiments hydriques, la bioaccumulation métallique dans les organes des épinoches peut être dépendante de facteurs confondants, qui sont discutés dans ce chapitre, partie 3.2.

Les épinoches engagées dans les étangs contaminés ont donc présenté de plus fortes bioaccumulations en uranium que celles engagées dans les étangs de référence. Il faut noter que les différences de concentrations en uranium selon les étangs étaient bien plus importantes que les différences pour les autres métaux. Une autre explication de ces différences serait due à des interactions d'antagonismes entre les métaux (Hoffman, 2002; Kelly et Janz, 2009) pour l'entrée et le stockage dans les organes. Enfin, la période de reproduction a certainement entraîné un métabolisme hépatique plus important, pouvant modifier les concentrations métalliques dans cet organe (Honda et al., 1983). Il aurait été intéressant de mesurer la bioaccumulation métallique lors des autres expérimentations *in situ* afin de savoir si les différences de concentrations métalliques dans les eaux se répercutaient dans les organes des épinoches.

2. Toxicité du mélange métallique lié aux rejets miniers

2.1. Effets sublétaux chez l'épinoche

Les effets de la contamination polymétallique sur l'épinoche ont pu être évalués lors de la première expérimentation *in situ* après 14 et 28 jours d'exposition ainsi que lors de la deuxième expérimentation chez les épinoches ayant subi une injection de PBS au bout de 14 jours. Bien que les conditions d'exposition des épinoches à la contamination polymétallique n'aient pas été identiques entre les deux expérimentations *in situ* (concentrations métalliques, conditions environnementales), des comparaisons peuvent néanmoins être réalisées sur les résultats obtenus lors du D14 chez les poissons encagés dans les trois étangs de la Haute-Vienne entre les deux expériences (Cf. Tableau 16).

Tableau 16 : Liste des similarités et différences sur les résultats obtenus au D14 des deux expériences *in situ* en Haute-Vienne. Un (-) signifie que le niveau du biomarqueur est significativement plus faible pour les épinoches engagées dans l'étang indiqué que pour celles engagées dans les deux étangs, et inversement pour le (+). K : indice de condition de Fulton, HSI : indice hépatosomatique, Nec. : nécrose leucocytaire, Lympho. : pourcentage de lymphocytes, IML : intégrité de la membrane lysosomale, ROS b. : activité oxydative basale, Phago. : capacité de phagocytose, CAT : catalase, SOD : superoxyde dismutase, GSH : glutathion total, Gr : glutathion réductase, GPx : glutathion peroxydase, TBARS : substances réactives à l'acide Thio barbiturique, DNA : dommages à l'ADN.

BIOMARQUEURS	SIMILARITES AU D14	DIFFERENCES AU D14
K	Malessard (+)	
HSI		Jonchère Saint-Maurice 2013 (-)
Nec.		Pontabrier 2014 (-)
Lympho.		Pontabrier 2013 (-)
IML	Malessard (+) et Jonchère Saint-Maurice (-)	
ROS b.	Pontabrier (+)	
Phago.		Pontabrier 2013 (-)
CAT	Pas de différences entre les étangs	
SOD		Jonchère Saint-Maurice 2014 (-)
GSH		Jonchère Saint-Maurice 2014 (-)
Gr	Malessard (+)	
GPx	Pas de différences entre les étangs	
TBARS		Pontabrier 2014 (+) Malessard 2013 (-)
DNA		Pontabrier 2013(+) Jonchère Saint-Maurice 2014 (+)

2.1.1. Déséquilibre de la balance oxydante

Le stress oxydant étant un effet bien connu d'une exposition à des métaux (Amiard et Amiard Triquet, 2008; Lushchak, 2011), il était important de se placer des deux côtés de la balance oxydative, c'est-à-dire du côté pro-oxydant et du côté antioxydant.

2.1.1.1. Effets pro-oxydants

L'effet le plus récurrent de l'exposition aux métaux contenus dans les étangs soumis aux rejets miniers était l'augmentation de la production basale d'ERO par les leucocytes de la rate des épinoches. En effet, cette augmentation d'activité a été observée chez les épinoches engagées dans les deux étangs contaminés (Pontabrier et Saint-Pierre) lors de la première expérience, mais aussi chez les épinoches engagées à Pontabrier lors de la deuxième expérimentation *in situ* (Cf. Tableau 16). Cette élévation des niveaux de production des ERO par les leucocytes de la rate a été mise en corrélation avec la présence de tous les métaux majoritaires mesurés dans cet organe. De nombreuses études ont déjà souligné cet effet chez un poisson suite à une exposition aux métaux (Lushchak, 2011; Sevcikova et al., 2011; Fernandez-Davila et al., 2012; Farina et al., 2013; Jolly et al., 2014).

Cette augmentation n'était cependant visible que sur l'activité oxydative basale des cellules, et non celle en réponse (stimulée) à un activateur (PMA). Gagnaire et al. (2015) n'ont pas trouvé de différence de production d'ERO lors d'une stimulation au PMA chez le gardon, qu'il soit engagé dans l'étang de Pontabrier ou dans un étang proche de celui de Malessard. Gagnaire et al. (2014) ont fait la même observation au niveau des leucocytes rénaux du poisson zèbre après une exposition à de l'uranium, tandis que Jolly et al. (2014) ont observé une augmentation de la production d'ERO stimulée par le PMA chez le gardon exposé à de l'aluminium dans cet organe, mais pas au niveau de la rate de ces poissons. Cette production d'ERO stimulée n'est peut-être pas exacerbée par les métaux chez l'épinoche, mais plutôt par d'autres sources de stress, comme une infection parasitaire (Scharsack et al., 2004) ou des perturbateurs endocriniens (Bado-Nilles et al., 2014b).

La surproduction d'ERO, si elle n'est pas prise en compte par le système antioxydant, peut déséquilibrer la balance oxydative et donc créer un stress oxydant.

2.1.1.2. Le système antioxydant

Concernant le système antioxydant, les résultats entre les étangs de la Haute-Vienne n'étaient pas aussi reproductibles entre les expériences que ceux de l'activité oxydative (Cf. Tableau 16). En effet, tandis que les niveaux de la plupart des protagonistes (GPx, SOD, GSH) du système antioxydant n'ont pas varié selon les étangs lors de la première expérience, les

niveaux de GSH, GST et SOD étaient plus faibles dans l'étang le moins contaminé (Jonchère Saint-Maurice) lors de la deuxième expérience. Seules les activités de la Gr et de la GPx étaient identiques entre les deux expériences (Cf. Tableau 16). Aucune analogie n'a été observée sur les activités antioxydantes entre les résultats obtenus dans le Cantal et dans la Haute-Vienne.

Cependant, les corrélations entre la bioaccumulation métallique et ces biomarqueurs évalués au Cantal ont montré un effet des métaux accumulés sur le système antioxydant (Cf. Chapitre 4, Table 5 de l'article scientifique). Ceci était d'autant plus important avec la présence de l'uranium et du manganèse dans le foie des épinoches. L'accumulation de ces métaux dans le foie des épinoches engagées dans les étangs du Cantal était négativement corrélée avec les activités de la GPx, de la CAT, ainsi que la teneur en GSH, mais seule la corrélation négative avec la SOD était significative. Inversement, la présence hépatique de ces deux métaux était corrélée positivement avec l'activité de la Gr. L'uranium et le manganèse impactaient donc les activités et concentrations de la plupart des acteurs du système antioxydant, en réduisant la plupart de ces activités. Concernant les autres métaux, les corrélations de fer et du baryum avec les réponses antioxydantes étaient très faibles, proches de zéro, traduisant la faible incidence de ces métaux sur ces réponses. Néanmoins, ces corrélations de l'uranium et du manganèse n'ont pas été retrouvées au niveau des étangs de la Haute-Vienne, excepté pour la corrélation négative avec l'activité de la CAT, bien que non significative. La corrélation positive et significative entre la présence du manganèse dans le foie des épinoches et la concentration du GSH dans ces organes argumente encore les différences de résultats entre les départements.

Le système antioxydant a donc été négativement impacté par la présence de deux métaux dans le foie des épinoches (uranium et manganèse) engagées dans les étangs du Cantal. Ces résultats n'ont pas été observés en Haute-Vienne, où le système antioxydant n'a pas été impacté par la contamination polymétallique. Cette différence de résultats entre les deux départements peut être mise en relation avec les concentrations en manganèse dans les étangs recevant les rejets miniers. L'étang de Saint-Pierre possédait les plus fortes concentrations de ce métal parmi les 6 étangs, et près de sept fois plus que l'étang de Pontabrier. Cette différence a été retranscrite dans le foie des épinoches où la

bioaccumulation de ce métal était plus de deux fois supérieure chez les épinoches encagées à Saint-Pierre qu'à Pontabrier (Cf. Ch. 4, Table 2 de l'article scientifique). De surcroît, aucune différence de bioaccumulation du manganèse n'a été observée entre Pontabrier et Malessard. Cependant, le manganèse, métal essentiel, est un cofacteur pour une isoforme de la SOD (Mn-SOD), qui protège la mitochondrie du stress oxydant (Zelko et al., 2002; Favier, 2003). La corrélation observée entre la bioaccumulation du manganèse dans le foie des épinoches et l'activité de la SOD était négative, alors que la totalité des études ont relaté l'inverse (Favier, 2003; Falfushynska et al., 2011). Zelko et al. (2002) ont toutefois souligné le fait que le manganèse, à fortes concentrations, pouvait être toxique pour les organismes. Rouleau et al. (1995) ont borné les concentrations en manganèse dans les tissus des poissons d'eau douce entre 1 à 10 µg/g, et ont évalué un bruit de fond pour l'accumulation de ce métal de 8 ng/g dans le foie des truites européennes (*Salmo trutta*), organe accumulant le plus de manganèse. L'accumulation de ce métal dans le foie des épinoches encagées dans l'étang de Saint-Pierre était plus élevée que ces valeurs ($\approx 13 \mu\text{g/g}$), pouvant peut-être conduire à une diminution de l'activité de la SOD.

Les effets des métaux sur le système antioxydant des poissons relatés dans la littérature sont très variés. Bien que la grande majorité des études ont souligné l'effet pro-oxydant des métaux (Martínez-Álvarez et al., 2005; Lushchak, 2011; Sevcikova et al., 2011), les métaux peuvent aussi bien inhiber, stimuler ou ne pas avoir d'effet sur le système antioxydant des poissons. Ces réponses sont en fait dépendantes d'un grand nombre de variables. En plus de facteurs confondants (Cf. Ch. 7, partie 3.2) et du sexe des poissons (Cf. Ch. 7, partie 3.1), la nature du métal, sa concentration et la durée de l'exposition à ce ou ces métaux font varier les réponses antioxydantes aux métaux (Sanchez et al., 2005; Ferreira et al., 2008; Qu et al., 2014). Les réponses antioxydantes envers une exposition métallique peuvent aussi être fonction de l'espèce étudiée (Ruas et al., 2008; Eyckmans et al., 2011). Les niveaux de base du système antioxydant peuvent être déjà très différents entre les espèces. Un exemple a été donné par Aksnes et Njaa (1981), où l'activité de la SOD de la truite arc-en-ciel était cinq fois supérieure à celle du merlan bleu (*Micromesistius poutassou*).

2.1.1.3. Les dommages oxydatifs

Si la production d'ERO était suractivée et que les réponses antioxydantes n'ont pas été augmentées par l'exposition à la contamination polymétallique chez les épinoches, alors la balance oxydative ne devait plus être à l'équilibre et des dommages oxydatifs ont pu surgir. Les dommages oxydatifs évalués lors de ces études étaient les dommages à l'ADN et la peroxydation lipidique.

La peroxydation lipidique était plus faible dans l'étang du Cantal contenant le moins d'uranium et de manganèse (Madic) au D28. Ce résultat a été confirmé par les corrélations positives et significatives entre la présence de ces deux métaux dans le foie des épinoches et la peroxydation lipidique évaluée dans cet organe. Bien que ces corrélations n'aient pas été observées au niveau des étangs de la Haute-Vienne, les niveaux de peroxydation lipidique les plus faibles ont été observés dans l'étang contenant le moins de métaux (Malessard). Lors de la seconde expérimentation conduite en Haute-Vienne, les concentrations métalliques à la Jonchère Saint-Maurice ont, excepté pour le baryum, toutes baissé, expliquant que la peroxydation lipidique soit plus élevée seulement à Pontabrier. La quasi-totalité des études ont montré une augmentation de la peroxydation lipidique lors d'une contamination métallique (Ates et al., 2008; Ruas et al., 2008; Sanchez et al., 2008a; Oliva et al., 2012a).

L'augmentation de la peroxydation lipidique via la production d'ERO par l'organisme a été confirmée via les corrélations positives et, pour la plupart significatives, entre l'activité oxydative basale des leucocytes de la rate et la peroxydation lipidique dans le foie des épinoches (Cf. Tableau 17).

Tableau 17 : corrélations (test de Pearson) entre la peroxydation lipidique (TBARS) et la production basale d'ERO en fonction des expériences et des départements. S : corrélation significative ; NS : corrélation non-significative ($\alpha = 5\%$).

Expérimentation	Département	Corrélation	Significativité
avr-13	Cantal	0,48	S
	Haute-Vienne	0,17	NS
avr-14	Haute-Vienne	0,46	S

Certains métaux sont connus pour être génotoxiques (De Andrade et al., 2004; Barillet et al., 2005; Garcia-Medina et al., 2011; Chezian et al., 2012). Les dommages à l'ADN, estimés via la moyenne de migration des événements dans la queue de la comète chez des épinoches n'ayant pas été exposées à une source de contamination, étaient en moyenne de $12,34 \pm 4,06$ %, soit le niveau des dommages retrouvés chez les épinoches engagées dans tous les étangs, à tous les temps de prélèvement et pour toutes les expériences, excepté à Pontabrier, au D14, où ces dommages ont augmenté jusqu'à 30 %. Les épinoches engagées dans l'étang présentant les plus fortes concentrations métalliques ont donc présenté les plus forts dommages à l'ADN. Au D28, ces différences n'étaient cependant plus observées, laissant croire à la mise en place de système de réparation entre les deux temps de prélèvement. De surcroît, des corrélations positives et significatives ont été observées entre ces dommages et la bioaccumulation de l'aluminium et du baryum dans les rates des épinoches de la Haute-Vienne. Toutefois, lors de la deuxième expérience localisée dans la Haute-Vienne, les épinoches engagées dans l'étang de Pontabrier ne présentaient plus ces dommages à l'ADN, alors que les concentrations uranifères dans cet étang ont augmentées entre les deux expériences. En outre, lors de cette expérience, ce sont les épinoches de l'étang de la Jonchère Saint-Maurice qui ont présenté les plus hauts taux de cassures de brins d'ADN et sites abasiques.

L'exposition aux contaminations polymétalliques présentes dans les étangs de Saint-Pierre et de Pontabrier a créé un stress oxydant chez les épinoches, via de plus fortes production basale d'ERO par les leucocytes de la rate et peroxydation lipidique hépatique, voire même de plus importants dommages à l'ADN lors de la première expérience limousine *in situ*. Cependant, les biomarqueurs du système antioxydant ont variés selon les étangs, les départements et les temps de prélèvement, ne suivant pas la contamination métallique évaluée en Haute-Vienne.

2.1.2. Impacts sur l'intégrité de la membrane lysosomale

L'intégrité de la membrane lysosomale était négativement corrélée à la peroxydation lipidique lors de la première expérimentation *in situ* en Haute-Vienne (corrélation de Pearson de -0,37, significative pour $\alpha = 5$ %). Cependant, ceci n'a pas été répété lors des autres

expérimentations. Tandis qu'aucune différence significative de l'IML n'a été rapportée entre les étangs du Cantal, les mêmes différences de cet immunomarqueur ont été soulignées lors des deux expériences réalisées dans le département de la Haute-Vienne, à savoir une IML plus importante à Malessard et plus faible à la Jonchère Saint-Maurice (Cf. Tableau 16). De plus aucune corrélation entre bioaccumulation métallique et ce biomarqueur n'a été observée. Il semblerait donc que ce biomarqueur ne soit pas fonction des concentrations métalliques, que ce soit au niveau des étangs, ou au niveau des rates des épinoches. En comparant les variations de l'IML entre les étangs et celles d'autres variables, des corrélations négatives avec les concentrations en magnésium, en potassium et en carbone inorganique ont été observées lors du D14 et du D28 de la première expérience *in situ* ainsi que lors de la deuxième expérience réalisée en Haute-Vienne. Des différences singulières de niveaux de ce biomarqueur entre les étangs de Haute-Vienne (moyennes allant de 63,45 à 135,57 unités de fluorescence) et ceux du Cantal (moyennes allant de 137,28 à 242,94 unités de fluorescence), ainsi que des variations contraires au fil de l'expérience entre les deux départements confortent la difficulté d'interprétation des effets de la contamination polymétallique *in situ* sur ce marqueur d'intégrité membranaire. Il aurait été intéressant d'obtenir le nombre de lysosome, pouvant changer la fluorescence mesurée, afin d'affiner ces résultats.

2.1.3. Impacts sur le système immunitaire

2.1.3.1. Impacts sur les cellules immunitaires

La mortalité leucocytaire (c-à-d la nécrose et l'apoptose leucocytaires) des épinoches engagées dans les 6 étangs était plus élevée que celle des épinoches non-engagées. En effet, tandis que les leucocytes nécrosés des épinoches laissées au laboratoire constituaient en moyenne $2,35 \pm 0,51$ % des leucocytes, la nécrose évaluée sur le terrain se situait entre 4 et 8 %. La même observation a pu être faite sur l'apoptose leucocytaire ($6,70 \pm 1,37$ % au laboratoire, contre des moyennes de 8 à 13 % sur le terrain). L'engagement dans les étangs a donc induit une augmentation de ces deux marqueurs de mortalité leucocytaire, pouvant même doubler la nécrose des leucocytes de la rate des épinoches.

L'apoptose leucocytaire n'a été évaluée que lors de la deuxième expérience dans les étangs de la Haute-Vienne. Aucune différence entre les étangs n'a été observée pour l'apoptose. Concernant la nécrose leucocytaire, aucune différence entre les étangs n'a été observée lors

de la première expérience *in situ*, que les épinoches aient été engagées dans le Cantal ou en Haute-Vienne. Cependant, les résultats de corrélation ont mis en évidence des interactions positives entre la bioaccumulation de certains métaux dans la rate et cet immunomarqueur. Au Cantal, l'augmentation de la nécrose leucocytaire est corrélée avec l'augmentation de tous les métaux dans la rate des épinoches, tandis qu'en Haute-Vienne, ces corrélations n'ont été observées qu'avec les augmentations du manganèse et du fer (Cf. Ch. 4, Table 5 de l'article scientifique).

D'un autre côté, les résultats obtenus en Avril 2014 étaient différents. En effet, la nécrose leucocytaire était plus importante pour les épinoches engagées dans les étangs de référence que pour celles engagées dans l'étang contaminé. Bien que la bioaccumulation n'ait pas été évaluée lors de cette expérience, la nécrose n'était pas corrélée avec les concentrations en manganèse et en fer dans la fraction dissoute de l'eau. Ces résultats sont à mettre en relation avec les dommages à l'ADN, plus importants dans les étangs de référence qu'à Pontabrier. Il se pourrait qu'un stress, autre que ceux évalués, ait pu négativement impacter les poissons engagés dans les deux étangs de référence lors de la deuxième expérience *in situ*.

Plusieurs études ont noté une diminution de la proportion de lymphocytes chez un poisson suite à une exposition à des métaux (Garcia-Medina et al., 2011; Jolly et al., 2014), ou une augmentation de la proportion des cellules granulocytaires (Maceda-Veiga et al., 2013). Ces mêmes observations ont été faites dans les étangs contaminés (Pontabrier et Saint-Pierre) lors de la première expérience d'engagement. Cette diminution des lymphocytes était corrélée négativement avec la présence de tous les métaux (sauf pour le baryum dans le département du Cantal). Dunier (1996) a souligné le pouvoir du manganèse d'inhiber la prolifération lymphocytaire, pouvant expliquer ces baisses de lymphocytes parmi les leucocytes. Néanmoins, cette observation n'a pas été répétée lors de la deuxième expérience *in situ*, alors que les concentrations métalliques ont augmenté dans l'étang contaminé, sauf pour le manganèse.

La distribution leucocytaire ne semble donc pas être impactée par les concentrations des métaux présents dans les étangs, ou du moins pas lors de la deuxième expérience *in situ*.

2.1.3.2. Impacts sur la capacité de phagocytose

Les pourcentages de capacité de phagocytose calculés (100 × fluorescence des cellules ayant ingéré 3 billes et plus / fluorescence des cellules ayant ingéré 1 bille et plus) étaient faibles par rapport à ceux de la littérature (8 % en moyenne contre environ 17 % pour le même modèle biologique (Bado-Nilles et al., 2014b) ; 5 à 52 % chez le chabot commun, *Cottus* sp. (Bado-Nilles et al., 2015b) ; 10 à 15 % chez la truite arc-en-ciel (Chilmonczyk et Monge, 1999) ; environ 20 % pour la perche dorée, *Macquaria ambigua*, et pour *Melanotaenia fluviatilis* (Harford et al., 2006)). Ces plus faibles valeurs de phagocytose sont liées à la technique analytique utilisée. Le cytomètre en flux utilisé lors de nos études peut saturer lors d'un fort débit causé par le passage des leucocytes et des microbilles fluorescentes. Afin de ne pas saturer le cytomètre, les concentrations en cellules et en billes ont été réduites, diminuant ainsi la probabilité de la rencontre avec les cellules et donc la capacité de phagocytose. Des mises au point ont abouti, après la première expérience *in situ*, à la multiplication au minimum par deux de cette capacité sur ce cytomètre en flux. Ces améliorations n'ont toutefois pas été mises en place lors des autres expériences afin de pouvoir comparer les résultats avec la première. Des observations au microscope électronique à transmission (MET) ont permis de confirmer la phagocytose par les leucocytes de la rate des épinoches (Cf. Figure 21).

La capacité de phagocytose ne semblait pas être fonction de la contamination polymétallique, puisque ce biomarqueur variait en fonction des temps de prélèvement, des sites et des expériences. Même les corrélations entre métaux et phagocytose variaient selon les métaux accumulés dans la rate, et étaient différentes selon les expériences.

Ces différences de phagocytose en fonction de la nature des métaux, de la période et du temps d'exposition et de l'espèce étudiée ont déjà été relatées dans la littérature (Chilmonczyk et Monge, 1999; Harford et al., 2006; Bado-Nilles et al., 2011; Bado-Nilles et al., 2015b).

Mise à part la production basale d'ERO par les leucocytes de la rate, la contamination polymétallique n'a pas impacté les immunomarqueurs évalués dans ces travaux.

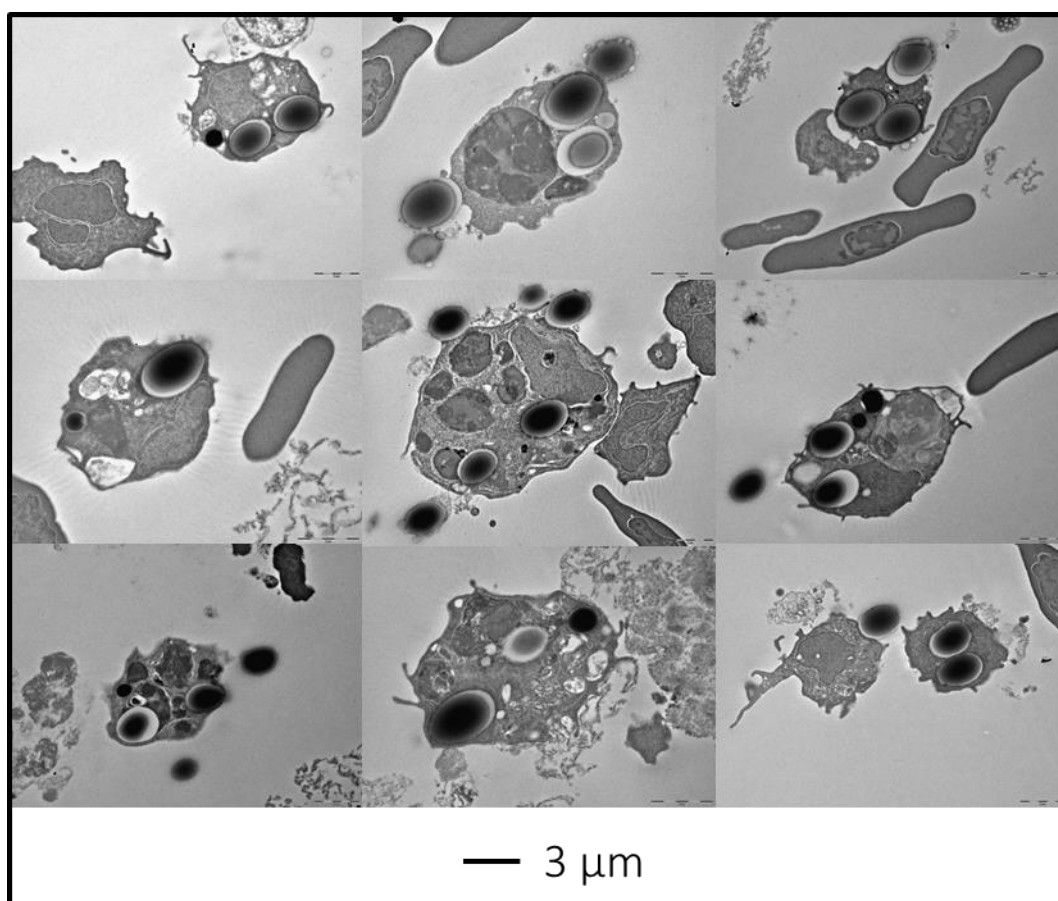


Figure 21 : Photographies au MET de leucocytes provenant de la rate d'épinoches et ayant ingéré des microbilles fluorescentes (apparaissant en noir).

2.1.4. Impacts sur les indices de condition

Les valeurs de K, étaient différentes selon l'étang et le département. En Haute-Vienne, selon l'expérience, K était soit plus élevé pour les épinoches encagées dans l'étang le moins contaminé métalliquement, soit plus faible dans l'étang de Pontabrier. Au Cantal, la seule différence était observée au D14, où les épinoches encagées à Madic avaient un K plus faibles que pour les deux autres étangs. L'augmentation de cet indice lors du D28 coïncidait avec la diminution des concentrations en fer dans cet étang. Kerambrun et al. (2012) ont également observé une diminution de cet indice chez le turbot (*Scophthalmus maximus*) après 7 et 21 jours d'exposition à une pollution multiple (HAP, métaux, etc.). Il faut toutefois noter que ces turbots étaient des juvéniles en croissance, contrairement aux épinoches adultes encagées

dans les étangs proches d'anciennes mines d'uranium étudiés dans ce manuscrit. Roussel et al. (2007) ont rapporté cette diminution chez l'épinoche à trois épines mâle au bout de deux mois d'exposition à 75 µg/L de cuivre. D'autres études ont aussi remarqué la diminution de l'indice de condition après une exposition métallique (Laroche et al., 2002; Sanchez et al., 2008a; Kerambrun et al., 2013). Les effets des polluants sur cet indice de condition sont toutefois dépendants de l'espèce étudiée (Bennett et Janz, 2007). Bien que les variations de K semblent être fonction de la contamination métallique, la disponibilité en nourriture peut agir aussi sur ces données. En effet, l'analyse des contenus stomacaux n'a fourni qu'une image quantitative au moment du prélèvement des épinoches, et ne peut pas confirmer que les épinoches sont alimentées en quantité égale entre tous les étangs, et pendant l'intégralité de l'encagement. De plus, la qualité de la nourriture présente dans le tube digestif des épinoches, qui pouvait être différente entre les étangs, n'a pas été évaluée. Ces différences de prise de nourriture ont pu conduire aux différences de K observées dans nos études. Cette hypothèse est appuyée par les travaux de Kerambrun et al. (2012), qui ont montré une baisse de K chez le turbot, lorsque ce dernier est privé de nourriture pendant trois semaines, ainsi que par l'expérimentation sur l'épinoche montrant une diminution de K après deux semaines de jeûne (Cf. Ch. 6, partie 1).

Contrairement à K, le HSI des épinoches n'a pas varié en fonction de la contamination présente dans les étangs du Cantal et de Haute-Vienne.

2.1.5. Autres effets sublétaux

Les autres biomarqueurs cités dans cette partie n'ont été évalués que lors de la première expérience sur le terrain (AChE, MT, agrégats macrophagiques au niveau du rein postérieur). Aucun, ou presque aucun agrégat macrophagique n'a été observé au niveau de coupes de rein postérieur des épinoches encagées dans les six étangs, démontrant que 28 jours d'exposition aux différentes concentrations métalliques n'induisent pas de dommages histologiques rénaux chez l'épinoche.

Aucune relation n'a été mise en évidence entre les concentrations des métaux et les MT. Malgré le fait que les MT ont une forte affinité pour les métaux, ceux retrouvés majoritairement dans les étangs du Cantal et de Haute-Vienne ont une plus faible capacité à se lier au groupement thiol des MT, contrairement à d'autres métaux (e.g. zinc, cadmium,

mercure, etc.) (Roesijadi, 1996), expliquant donc l'absence de différence de ce biomarqueur entre les étangs.

Au bout de 28 jours d'encagement, les épinoches des étangs contaminés (Saint-Pierre et Pontabrier) ont présenté des activités de l'ACHé plus importantes que celles encagées dans les quatre autres étangs. Il est connu que certains métaux peuvent être neurotoxiques, tels que le manganèse (Rouleau et al., 1995; Falfushynska et al., 2011), le cuivre (Falfushynska et al., 2011) ou encore le mercure (Shaw et Panigrahi, 1990), mais seule l'inhibition de l'activité de l'ACHé par des polluants avait été soulignée (Coppage et al., 1975; Shaw et Panigrahi, 1990; Fulton et Key, 2001). Une augmentation de l'activité de l'ACHé suite à une exposition à un ou plusieurs métaux a été rapportée par plusieurs études (Barillet et al., 2011; Wepener et al., 2011; Oliva et al., 2012b), justifiant les résultats obtenus au Cantal et en Haute-Vienne. Zarros et al. (2013) ont listé les effets du cadmium sur l'activité de l'ACHé du rat de laboratoire. Ils ont rapporté une grande diversité de réponses de ce biomarqueur avec presque autant d'études observant une augmentation qu'une diminution ou aucun effet de l'activité de l'ACHé.

L'activité de l'ACHé était négativement corrélée avec le baryum accumulé dans le muscle des épinoches encagées dans les étangs de la Haute-Vienne et cette corrélation était significative dans le département du Cantal. Cette corrélation a aussi été observée avec le baryum et l'activité de l'ACHé dans le muscle des gardons (Gagnaire et al., 2015), ainsi qu'avec le fer, le plomb et le cadmium chez la sole du Sénégal, *Solea senegalensis* (Oliva et al., 2012b).

La contamination polymétallique présente dans les deux étangs soumis aux rejets miniers a pu entraîner des modifications sur la transmission synaptique en augmentant l'activité de l'ACHé de leurs muscles. Il serait intéressant d'évaluer plusieurs composantes comportementales chez l'épinoche, comme la nage, après une augmentation significative de l'activité de cette enzyme.

2.2. Modification de la susceptibilité de l'épinoche à un stress biologique

Sans aucun autre stress (au laboratoire), le stress biologique choisi (9 mg LPS par kg de poisson et 4 jours de latence avant les dissections) induisait des effets significatifs sur les systèmes immunitaire et antioxydant des épinoches.

Tous ces effets des LPS ont été retrouvés sur le terrain, mais significativement seulement pour trois d'entre eux, dépendamment des étangs. Les effets des LPS sur les fonctions biologiques des épinoches observés au laboratoire et sur le terrain sont listés dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Effets des LPS sur des biomarqueurs de l'épinoche en fonction de la localisation de l'expérience (laboratoire ou terrain). Sauf indication entre parenthèses, ces réponses ou effets ont été observés 4 jours après les injections. La capacité de phagocytose n'a pas pu être évaluée 4 jours après les injections de LPS (problème lié à l'analyse). Néc. : nécrose leucocytaire ; Apop. : apoptose leucocytaire ; ROS s. : activité oxydative stimulée ; SI : index de stimulation de la flambée oxydative ; Phago. : capacité de phagocytose ; GSH : glutathion total ; GST : glutathion-S-transférase ; CAT : catalase S : effet significatif ; NS : effet non significatif ; Js : effet significatif observé seulement dans l'étang de la Jonchère Saint-Maurice ; Po : effet significatif observé seulement dans l'étang de Pontabrier.

Biomarqueurs	Effet	Significativité	
		Laboratoire	Terrain
Néc.	↗	S (8 jours)	NS
Apop.	↗	S (8 jours)	S (Js)
ROS s.	↗	S	NS
SI	↗	S	NS
Phago.	↗	S (2 jours)	S (Js)
GSH	↘	S	NS
GST	↘	S	S (Po)
CAT	↘	S	NS (↘ et ↗)

Au laboratoire, les LPS ont induit une réaction immunitaire des épinoches en augmentant leur activité oxydative stimulée et leur phagocytose. Dans les trois étangs de Haute-Vienne, cette

activité oxydative suite à l'injection de LPS était plus élevée que celle des poissons n'ayant pas reçu ce stress biologique, bien que cette augmentation était non significative. Concernant la capacité de phagocytose, une interaction significative entre les deux stress (chimique et biologique) a été observée (Cf. Tableau 19). Seules les épinoches encagées dans l'étang présentant les plus faibles concentrations métalliques (Jonchère Saint-Maurice) ont montré une augmentation significative de cette réponse phagocytaire suite à l'injection de LPS. Excepté pour cette condition (Jonchère Saint-Maurice et LPS), les moyennes de phagocytose évaluées étaient plus faibles que celles retrouvées lors des études au laboratoire sans stress biologique ainsi que lors de la première expérience *in situ* (moyennes de 7,43 à 7,97 % contre 8,47 à 9,06 % en avril 2013 et de 8,67 à 16,20 % au laboratoire).

Tableau 19 : Interactions entre stress chimique (variable étang) et stress biologique (variable injection) via des analyses de la variance (ANOVA) à un ou deux facteurs. Seules les interactions significatives sont présentées, avec ●: $0.05 > p \geq 0.10$; *: $0.01 > p \geq 0.05$; **: $0.001 > p \geq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$. K : indice de condition de Fulton ; HSI : indice hépatosomatique ; Néc. : nécrose leucocytaire ; Apop. : apoptose leucocytaire ; Ly : pourcentage de lymphocytes ; IML : intégrité de la membrane lysosomale ; Phago. : capacité de phagocytose ; ROS b. : activité oxydative basale ; ROS s. : activité oxydative stimulée ; SI : index de stimulation de la flambée oxydative ; Gr : glutathion réductase ; GPx : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion total ; GST : glutathion-S-transférase ; CAT : catalase ; SOD : superoxyde dismutase ; TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique.

Biomarqueurs		ANOVA à 2 facteurs			ANOVA à 1 facteur
		Etang	Injection	Etang × Injection	Etang × Injection
Indices de condition	K	*			
	HSI				
Capacités immunitaires	Néc.	***	●		
	Apop.		**		
	Ly				
	IML	***			
	Phago.	***	**	*	***
	ROS b.	***			
	ROS s.				
	SI	***			
Système antioxydant	Gr	*	●		
	GPx				
	GSH	*		●	***
	GST	*	*		
	CAT	**		●	*
	SOD	**			
Peroxydation lipidique	TBARS	**	●	***	***
Dommages à l'ADN	DNA	*			

Les épinoches ayant reçu une injection de LPS au laboratoire ont présenté de plus faibles teneurs en GSH. Ce résultat a une nouvelle fois été observé en Haute-Vienne. En effet, même si aucune différence significative entre les niveaux de GSH des épinoches ayant subi un stress biologique et celles sans injection de LPS n'a été observée, ce biomarqueur est fonction de l'interaction étang-condition d'injection. Les diminutions du GSH ont été soulignées dans les deux étangs contenant les plus fortes concentrations métalliques.

L'explication des effets du mélange métallique sur la résistance de l'épinoche aux LPS est divisée en deux parties selon leur conclusion :

↳ *Partie 1 : l'exposition des épinoches aux plus fortes concentrations métalliques (encagement à Malessard et Pontabrier) n'a pas permis la réaction phagocytaire envers le stress biologique, observée au laboratoire et dans l'étang le moins contaminé. Cette altération des défenses des poissons par les métaux a empêché les épinoches exposées aux plus fortes concentrations métalliques de maintenir leurs teneurs en GSH, qui ont été diminuées à cause du stress biologique. La GST n'était pas fonction de l'interaction entre les étangs et le stress biologique, (Cf. Tableau 19), mais n'a diminué significativement qu'à Pontabrier après l'injection de LPS. Le GSH est un substrat pour l'activité de la GST. Ainsi, une diminution des concentrations en GSH peut conduire à une diminution de l'activité de la GST (Regoli et Principato, 1995).*

Une exposition préalable aux métaux présents dans les étangs de la Haute-Vienne a augmenté la susceptibilité des épinoches face à un stress biologique soudain, en empêchant leur réponse phagocytaire, et perturbant la teneur en GSH et l'activité de la GST.

Cette explication peut être confortée par plusieurs études reportant des effets immunotoxiques des métaux (Knittel, 1981; Saxena et al., 1992; Stolen et Fletcher, 1994; Sanchez-Dardon et al., 1999; El-Boshy et Taha, 2011), et pouvant donc diminuer les défenses indispensables pour la protection envers un pathogène (Stolen et Fletcher, 1994; Dunier, 1996).

Tandis que les valeurs de la peroxydation lipidique avec ou sans stress biologique des épinoches engagées à Malessard et à la Jonchère Saint-Maurice étaient au niveau de celles des épinoches non-exposées, la contamination polymétallique présente à Pontabrier a doublé ces valeurs. Sachant que les activités de la GST et les teneurs en GSH ont diminué dans cet

étang après l'injection de LPS, les ERO pourraient être moins dégradées par les systèmes antioxydants, entraînant donc une peroxydation lipidique plus importante. Cependant, lorsque le stress biologique a été appliqué aux épinoches engagées dans cet étang, la peroxydation lipidique a diminué (bien que non significativement) en même temps que l'augmentation de l'activité de la catalase.

Seules les épinoches engagées dans l'étang de la Jonchère Saint-Maurice ont eu significativement plus de leucocytes apoptotiques lorsque l'injection de LPS a été réalisée (Cf. Tableau 19). Cependant l'augmentation de l'apoptose suivant le stress biologique était visible pour les épinoches engagées dans les deux autres étangs, et notamment à Pontabrier (p -valeur = 0,11).

↪ *Partie 2 : la diminution de TBARS serait due à une activité de la catalase plus importante empêchant le peroxyde d'hydrogène d'actionner son fort pouvoir oxydant. La CAT est l'enzyme préférentielle pour se protéger envers de grandes quantités de H_2O_2 par rapport au complexe GSH-GPx (Béguet, 2012) et peut donc être activée si le GSH est diminué. Kumar et Rajagopal (2003) ont rapporté qu'une augmentation de l'activité de la CAT pour faire face au peroxyde d'hydrogène chez l'homme peut survenir lorsque la GPx est impuissante face à cette ERO à cause d'un déficit de son substrat, le GSH.*

L'apoptose était augmentée au niveau de tous les étangs de Haute-Vienne, et le fait que seules les épinoches engagées à la Jonchère Saint-Maurice ont présenté des différences significatives sur ce biomarqueur était probablement dû à la variabilité individuelle.

La diminution des TBARS et l'augmentation de l'apoptose n'étaient donc pas dues à l'interaction significative entre étangs et stress biologique soudain.

En conclusion, les épinoches exposées aux plus fortes concentrations métalliques ont vu leur capacité de phagocytose, leur concentration en GSH et l'activité de leur GST, protagonistes de défense envers des pathogènes, diminuer, augmentant donc leur susceptibilité à un stress biologique soudain, appliqué par une injection de LPS.

Il faut néanmoins noter que le stress chimique a induit beaucoup plus de différences de réponses que le stress biologique, comme le montrent les graphiques d'ACP affichés sur la Figure 22. Les distributions des individus en fonction des réponses biologiques étaient plus différenciées selon les étangs que selon les conditions d'injection.

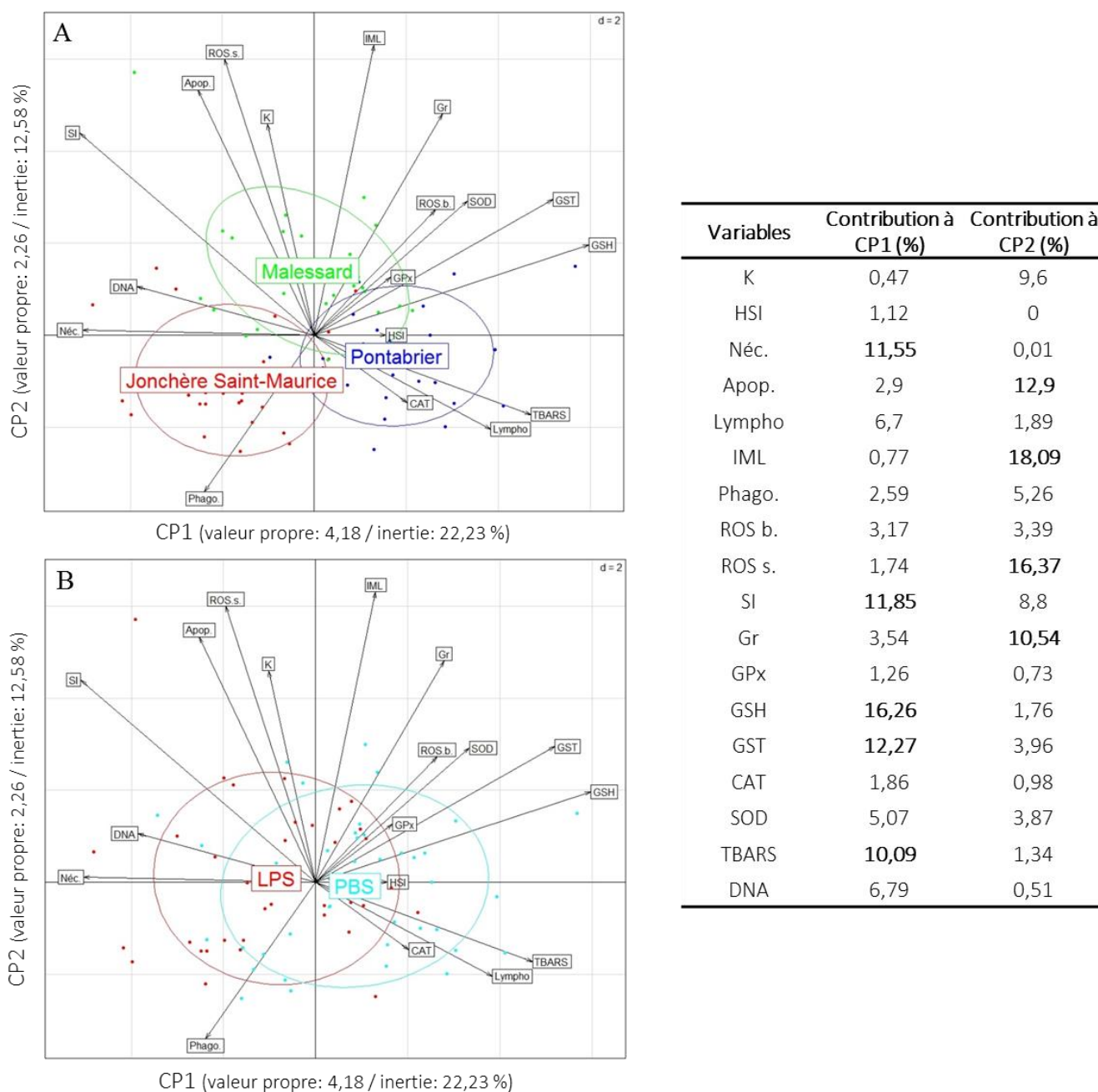


Figure 22 : ACP représentant les individus regroupés en fonction de l'étang (A) ou du stress biologique (B) (variables illustratives). Les composantes principales (CP 1 et CP 2) sont construites à partir de tous les biomarqueurs analysés. Le nombre de dimensions sélectionnées est de 2. Les valeurs entre parenthèses correspondent aux valeurs propres de chaque axe, suivies par les valeurs d'inertie. Le tableau à droite résume les contributions aux axes de chaque variable (en pourcentage), avec les contributions supérieures à 10 % indiquées en gras. K : facteur de condition de Fulton ; HSI : indice hépatosomatique ; Néc. : nécrose leucocytaire ; Apop. : apoptose leucocytaire ; Lympho : pourcentage de lymphocytes ; IML : intégrité de la membrane lysosomale ; Phago. : capacité phagocytaire ; ROS b. : activité oxydative basale ; ROS s. : activité oxydative stimulée ; SI : indice de stimulation de la flambée oxydative ; Gr : glutathion réductase ; GPx : glutathion peroxydase ; GSH : glutathion total ; GST : glutathion-S-transférase ; CAT : catalase ; SOD : superoxyde dismutase ; TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique ; DNA : dommages à l'ADN.

3. Quelques interférences

3.1. Liées au sexe des épinoches

Il a été de nombreuses fois montré qu'une variabilité du métabolisme et des réponses à un stress entre les poissons mâles et les poissons femelles existait, et notamment chez l'épinoche à trois épines (Sanchez et al., 2007; Wirzinger et al., 2007). Ces différences inter-sexe ont été observées au niveau du système immunitaire, dont les niveaux de lysozyme et la capacité de phagocytose (Fournier et al., 2000; Saurabh et Sahoo, 2008), mais aussi du système antioxydant (Sanchez et al., 2007; Vega-Lopez et al., 2007), des indices de condition (Yang et Baumann, 2006; Roussel et al., 2007; Sanchez et al., 2007; Abba et al., 2010), des dommages à l'ADN (Akcha et al., 2004; Wirzinger et al., 2007) et des MT (Olsson, 1996). Ces différences entre les sexes sont exacerbées lors des périodes de reproduction (Huntingford et al., 2001; Picchitti et al., 2001; Sanchez et al., 2007). Cependant certains biomarqueurs ne semblent pas différer en fonction du genre, comme l'AChE (Sturm et al., 1999; Beauvais et al., 2002; Linde-Arias et al., 2008). Il faut néanmoins noter que ces différences inter-sexe sont étroitement liées à l'espèce étudiée et à son cycle de vie. En effet, pour un même biomarqueur, de nombreuses études n'ont pas observé les mêmes résultats inter-sexe en fonction de l'espèce choisie. Un exemple de ces différences entre les espèces s'observe avec la peroxydation lipidique, qui ne varie pas en fonction du sexe chez une espèce de poisson chat (*Heteropneustes fossilis*), chez l'épinoche à trois épines ou chez le chabot commun (Parihar et Dubey (1995); Sanchez et al. (2007); Bado-Nilles et al. (2014a), respectivement), mais est plus élevée chez le *Girardinichthys viviparus* mâle (Vega-Lopez et al., 2007) ou chez le flet européen femelle (*Platichthys flesus*) (Winzer et al., 2001). Ces espèces aquatiques n'étaient toutefois pas exposées aux mêmes polluants.

Le sexe des poissons n'a pas été pris en compte dans l'ensemble des études de cette thèse, et le Tableau 20 en justifie les causes. En effet, lors des expériences réalisées au printemps (Avril), seule l'activité de la GPx a été impactée par le sexe des épinoches, avec 12 différences significatives sur 15 possibles (Cf. Tableau 20), les trois *p*-valeurs non significatives étant de 0,056, 0,072 et 0,118, soit assez proches du risque α (5 %). Cette différence de niveaux

d'activité de la GPx a déjà été observée chez l'épinoche lors de la période de reproduction par Sanchez et al. (2007) et (2008b). Comme les résultats obtenus lors de ces études, les épinoches femelles encagées dans les étangs du Cantal et de la Haute-Vienne possédaient une activité de la GPx plus importante que les mâles. Par exemple, à Malessard, au D14 de la première expérience *in situ* (Avril 2013), l'activité de la GPx chez les femelles était en moyenne de $235,30 \pm 78,28$ unités/g de protéines totales tandis que celles des mâles était de $57,69 \pm 18,86$ unités/g de protéines totales. Sanchez et al. (2008b), via l'étude de Burk et al. (1980), ont émis l'hypothèse que cette importante activité chez les femelles pendant la période de reproduction était due au métabolisme hormonal. Nos résultats ne peuvent que conforter ces résultats, puisqu'aucune différence significative de l'activité de la GPx entre les sexes n'a été observée lors de l'expérimentation conduite hors de la période de reproduction, en septembre 2014 (Cf. Tableau 20).

Tableau 20 : Différences entre épinoches mâles et femelles sur l'ensemble des biomarqueurs analysés lors des trois expérimentations *in situ* réalisées. La colonne de droite résume le nombre de différences significatives entre les sexes observées pour un biomarqueur donné. Les biomarqueurs non analysés lors d'une expérience sont hachurés. Un astérisque désigne une différence significative pour un biomarqueur entre mâles et femelles, avec * : $0,01 < p \leq 0,05$; ** : $0,001 < p \leq 0,01$ et *** : $p \leq 0,001$. K : indice de condition de Fulton, HSI : indice hépatosomatique, Nec. : nécrose leucocytaire, Lympho. : pourcentage de lymphocytes, IML : intégrité de la membrane lysosomale, Phago. : capacité de phagocytose, ROS b. : activité oxydative basale, ROS s. : activité oxydative stimulée, SI : index de stimulation de la flambée oxydative, DNA : dommages à l'ADN, GSH : glutathion total, Gr : glutathion réductase, GPx : glutathion peroxydase , CAT : catalase, SOD : superoxyde dismutase, TBARS : substances réactives à l'acide Thio barbiturique , AChE : acétylcholinestérase, MT : métallothionéines.

Etang	CANTAL						HAUTE-VIENNE												Total de différences observées
	Saint-Pierre		Madic		Etang Noir		Pontabrier				Malessard				Jonchère Saint-Maurice				
	avr-13		avr-13		avr-13		avr-13		avr-14		sept-14		avr-13		avr-14		sept-14		
Temp	D14	D28	D14	D28	D14	D28	D14	D28	D18	D14	D14	D28	D18	D14	D14	D28	D18	D14	
K																			0 \ 18
HSI	**				*					**	*				*				5 \ 18
Nec.											**								1 \ 18
Apop.																			0 \ 6
Lympho.															**				1 \ 18
IML																*			1 \ 18
Phago.				*															1 \ 18
ROS b.																			0 \ 18
ROS s.																			0 \ 3
SI																			0 \ 3
DNA								**											1 \ 18
GSH		**											**						2 \ 18
Gr	**																		1 \ 15
GPx	***	***		**	*	**			***		***	**	***		*	***	**		12 \ 18
GST																			0 \ 6
CAT																			0 \ 18
SOD	*					*													2 \ 18
TBARS					*							**			*				3 \ 18
AChE																			0 \ 12
MT																			0 \ 12

Malgré ces différences de niveau d'activité de la GPx entre les épinoches mâles et les femelles, aucune répercussion sur leurs réponses face à la contamination polymétallique n'a été soulignée que les deux sexes soient groupés ou séparés (exemple sur la Figure 23). Les activités de la GPx chez les épinoches mâles et femelles ne sont donc pas impactées par la contamination polymétallique. Des différences entre les étangs ou entre les temps de prélèvement auraient pu exister si le sexe ratio entre mâles et femelles était déséquilibré entre les étangs. Cependant, lors de l'acclimatation précédant l'encagement, ainsi que lors de la mise en cage, les mâles et les femelles ont été répartis dans les différentes cages afin d'avoir un sexe ratio par étang et à chaque temps de prélèvement proche de 1.

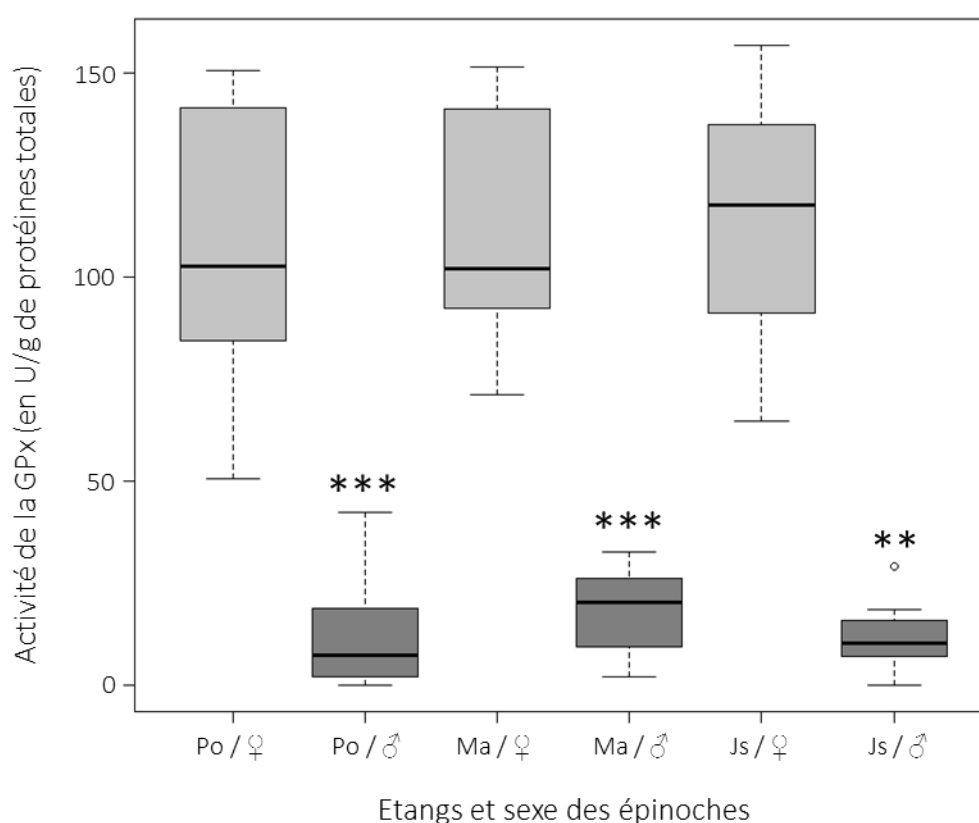


Figure 23 : Activité de la glutathion peroxydase (en U / g de protéines totales) en fonction de l'étang d'exposition et du sexe des épinoches lors du D14 (PBS) de la deuxième expérimentation *in situ* (avril 2014). Po : Pontabrier, Ma : Malessard, Js : Jonchère Saint-Maurice. Un astérisque correspond à des différences significatives pour le même étang entre mâles (♂) et femelles (♀) avec ** : $0,01 < p \leq 0,001$ et *** : $p \leq 0,001$.

Un autre biomarqueur varie légèrement en fonction du sexe : l'indice hépatosomatique (Cf. Tableau 20). En effet, pour cinq temps de prélèvement, cet indice est significativement plus élevé chez les femelles que chez les mâles. Ce résultat a maintes fois été observé pendant la

période de reproduction des poissons (Yang et Baumann, 2006; Sanchez et al., 2007; Jolly et al., 2012), bien que cette différence entre mâles et femelles s'estompe hors de la période de reproduction (Hinck et al., 2008; Jolly et al., 2012). Une hypothèse pour expliquer ces résultats est fournie par Huntingford et al. (2001), qui repose sur le fait que pendant la période de reproduction, les réserves énergétiques des épinoches mâles seraient transférées des organes somatiques aux organes reproducteurs, expliquant en partie la diminution de leur HSI. Néanmoins, dans notre étude, aucune différence de réponse face à la contamination polymétallique entre les étangs n'a été observée lorsque les mâles et les femelles sont groupés ou séparés.

Les autres différences significatives et éparses entre les biomarqueurs évalués chez les mâles et ceux mesurés chez les femelles étaient anecdotiques, et certainement dues à la variabilité inter-individuelle.

Pour toutes ces raisons (peu de différences significatives entre mâles et femelles, et sinon aucune conséquence sur les réponses aux métaux), nous avons choisi de ne pas prendre en compte l'effet du sexe dans nos résultats.

3.2. Liées à des facteurs abiotiques

3.2.1. Les variations saisonnières des concentrations métalliques

Une autre expérience *in situ* a été réalisée en septembre 2014. Un temps de prélèvement (D14) a été réalisé sur des épinoches n'ayant pas subi de stress biologique. Ce temps permet de savoir si la période d'exposition (hors de la période de reproduction, nouvelle saison avec des conditions environnementales différentes) a des répercussions sur les biomarqueurs.

Le Tableau 21 résume les concentrations métalliques retrouvées au D14 pour chaque expérimentation dans les départements du Cantal et de la Haute-Vienne. Contrairement aux articles scientifiques des parties précédentes, ce tableau liste aussi les autres métaux, dits « minoritaires », mesurés sur la fraction dissoute de l'eau. Rappelons que le choix restreint à cinq métaux (uranium, aluminium, fer, manganèse et baryum), parmi les 12 métaux mesurés dont les concentrations étaient supérieures aux limites de détection de l'appareil de mesure,

a été décidé via les occurrences de ces métaux au niveau d'anciens sites miniers uranifères et via leurs concentrations. En effet, comme précédemment décrit (Cf. Ch 2, partie 4.2), ces cinq métaux se retrouvent de manière naturelle ou anthropique dans les rejets miniers, justifiant ainsi leur mesure. De surcroît, les concentrations en aluminium, en fer et en manganèse mesurées dans les étangs de la Haute-Vienne et du Cantal sont supérieures à des concentrations maximales sans effets (NOEC) chez une espèce de poisson d'eau douce (Cf. Tableau 21). Il faut toutefois noter que la NOEC du baryum sur le poisson n'est pas encore disponible, et que celle référée sur le Tableau 21 a été réalisée sur une moule marine (*Mytilus californianus*).

Des différences de concentrations métalliques ont été soulignées entre le printemps 2013 et le printemps 2014 en Haute-Vienne. Les concentrations en zinc dans les trois étangs ont toutes augmenté en un an, tout comme les concentrations d'aluminium, de fer et de manganèse à Malessard, tandis que que celles de la Jonchère Saint-Maurice ont diminué (Cf. Tableau 21). Cependant, les différences de concentrations métalliques les plus importantes ont lieu au cours de la même année. Les concentrations métalliques ont beaucoup varié en fonction des saisons (printemps et automne), et notamment pour les cinq métaux majoritaires. La saison automnale de 2014 étant plus pluvieuse que le printemps de la même année, rigoureusement sec (Météo-France, 2015), une dilution des métaux causée par l'eau de pluie a pu contribuer à la diminution de leurs concentrations. Cette hypothèse a généralement été observée : les concentrations métalliques (excepté pour le nickel et le fer, ainsi que pour le plomb et l'aluminium pour la Jonchère Saint-Maurice) ont diminué entre le printemps et l'automne. Cependant, les concentrations en fer ont drastiquement augmenté du printemps à l'automne dans les étangs de Pontabrier et de la Jonchère Saint-Maurice, allant même franchir les mg/L. Antunes et al. (2007) ont également observé de fortes augmentations des concentrations métalliques au niveau d'un ancien site minier du printemps à l'automne, mais pour presque tous les métaux analysés. Ces auteurs ont émis l'hypothèse que leurs fluctuations ne seraient pas causées par la pluviométrie, mais plutôt par la montée des eaux souterraines en automne, plus chargées en métaux. Les saisons pluvieuses peuvent aussi conduire à une montée des eaux superficielles, pouvant lessiver les sols et sédiments et augmenter le débit des rejets provenant des anciennes mines d'uranium (Pinto et al., 2004).

Cette forte augmentation du fer dans les étangs observée en automne, contraire à la diminution générale des autres métaux, pouvait être due au fait que le fer est généralement présent dans les eaux profondes anoxiques, qui ont pu remonter à la surface à cause d'une pluviométrie plus importante en automne qu'au printemps.

Ces différences de concentrations métalliques dans les étangs étudiés entre les saisons rendent difficiles les comparaisons de réponses des épinoches à la contamination polymétallique entre les expériences.

Tableau 21 : Moyennes ± écart-types des concentrations (en µg/L) des métaux contenus dans la fraction dissoute des eaux des différents étangs du Cantal et du Limousin lors des différentes expérimentations *in situ*. Pour chaque expérimentation, la valeur de la concentration provient du temps de prélèvement D14. Les valeurs des NOEC sont choisies sur un poisson d'eau douce (excepté pour le baryum) et si possible avec un temps de 30 jours. Les références correspondantes aux NOEC (en µg/L) sont inscrites dans la colonne de droite. Une case blanche désigne un métal non mesuré lors d'une expérience. LD : limite de détection. NOEC : No-Observed Effect Concentration (concentration la plus forte à laquelle aucun effet n'est observé).

Etang	CANTAL			HAUTE-VIENNE									NOEC (poisson d'eau douce)			
	Saison	Saint-Pierre	Madic	Etang Noir	Pontabrier			Malessard			Jonchère Saint-Maurice					
		avr-13			avr-13	avr-14	sept-14	avr-13	avr-14	sept-14	avr-13	avr-14	sept-14			
en µg/L	U	moyenne	5,95	0,09	0,02	23,53	38,14	28,36	0,29	0,20	0,16	0,06	0,00	0,12	< 400	Holdway (1992)
		écart-type	0,07	0,00	0,00	0,91	4,10	0,28	0,00	0,02	0,01	0,00	0,00	0,01	15j	
	Al	moyenne	44,10	137,00	202,20	82,70	83,72	29,06	44,90	57,86	9,74	48,70	19,65	26,86	33,00	Buckler et al. (1995)
		écart-type	1,00	3,93	147,89	4,66	10,07	1,56	6,34	5,53	0,14	8,18	3,88	6,11	50j	
	Fe	moyenne	165,70	466,40	295,00	263,60	316,38	810,98	82,00	199,96	120,53	396,60	249,76	1399,57	320,00	Birge et al. (1995)
		écart-type	14,98	26,01	112,38	8,39	56,50	4,83	0,94	36,79	2,40	11,74	64,05	254,44	33j	
	Ba	moyenne	16,50	40,50	21,20	18,50	35,06	34,62	6,40	22,83	4,14	22,10	22,77	9,81	100,00	Spangenberg et Cherr (1996)
		écart-type	0,25	1,00	0,56	0,41	22,50	0,33	0,08	19,09	0,04	0,15	7,16	0,27	sur moule marine, 2j	
	Mn	moyenne	218,10	44,30	28,70	52,20	46,37	18,44	16,10	28,52	1,99	27,10	21,20	8,39	4,55	Stubblefield et al. (1997)
		écart-type	3,85	1,58	8,68	0,90	2,60	0,21	0,12	0,39	0,12	1,27	5,20	0,88	52j	
	Cr	moyenne	< LD	0,16	0,34	0,08	0,09		0,08	0,09		0,07	0,10		538,00	Sauter et al. (1976)
		écart-type		0,01	0,09	0,00	0,00		0,04	0,01		0,01	0,00		28j	
	Co	moyenne	0,40	0,18	0,13	0,20	0,51		0,04	0,34		0,15	0,24		60,00	Dave et Xiu (1991)
		écart-type	0,09	0,03	0,00	0,04	0,39		0,00	0,15		0,01	0,08		16j	
	Cu	moyenne	1,47	1,54	1,65	1,30	1,19	1,13	1,32	0,47	0,55	1,36	0,84	1,14	61,00	BKH (1995)
		écart-type	0,66	0,38	0,43	0,29	1,20	0,51	0,99	0,11	0,42	0,23	0,07	0,16	28j	
Ni	moyenne	1,41	0,66	0,30	0,21	0,28	1,61	0,14	0,22	1,02	0,82	2,02	1,26	109,00	Lind et al. (1978)	
	écart-type	0,70	0,55	0,02	0,04	0,05	0,87	0,00	0,15	0,15	0,36	1,51	0,02	30j		
Zn	moyenne	0,87	1,35	1,36	3,93	12,41		2,19	8,07		1,67	4,36		25,00	Sinley et al. (1978)	
	écart-type	0,13	0,98	0,20	0,36	4,53		0,67	2,34		0,13	1,51		25j		
Cd	moyenne	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	< LD	0,01	0,01	< LD	0,00	0,00	< LD	4,40	Eaton et al. (1978)	
	écart-type	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		0,00	0,00		0,00	0,00		10 à 31j		
Pb	moyenne	0,13	0,12	0,21	0,30	0,22	0,12	0,31	0,42	0,15	0,44	0,17	0,64	120,00	Dave et Xiu (1991)	
	écart-type	0,01	0,01	0,07	0,12	0,09	0,01	0,17	0,04	0,02	0,10	0,08	0,13	16j		

3.2.2. Les variations saisonnières des effets sublétaux

Les comparaisons des niveaux des biomarqueurs entre ces périodes sont schématisées sur la Figure 24 et la Figure 25.

Des différences entre les saisons (printemps et automne) ont été observées à Malessard pour l'indice de condition K, l'activité de la CAT, ainsi que pour l'activité oxydative basale pour les deux étangs en dehors de l'influence de rejets miniers. Le nombre de différences le plus important n'a pas été observé entre les saisons, mais plutôt entre les années. En effet, les réponses immunitaires en avril 2014 étaient différentes de celles obtenues en avril 2013 et septembre 2014, et les réponses antioxydantes étaient supérieures en avril 2013 par rapport aux deux autres périodes.

Le vécu différent des poissons (conditions environnementales et concentrations métalliques), ainsi que le volume différent des cages lorsqu'elles étaient divisées en deux ou non (même si la densité restait identique) limitent la comparaison de réponse au stress chimique entre les différentes saisons et années.

Ces différences de niveaux selon la saison ont maintes fois été démontrées par des études chez le poisson et sur de nombreux biomarqueurs (De Andrade et al., 2004; Sanchez et al., 2008b; Oliva et al., 2012b; Bado-Nilles et al., 2015b).

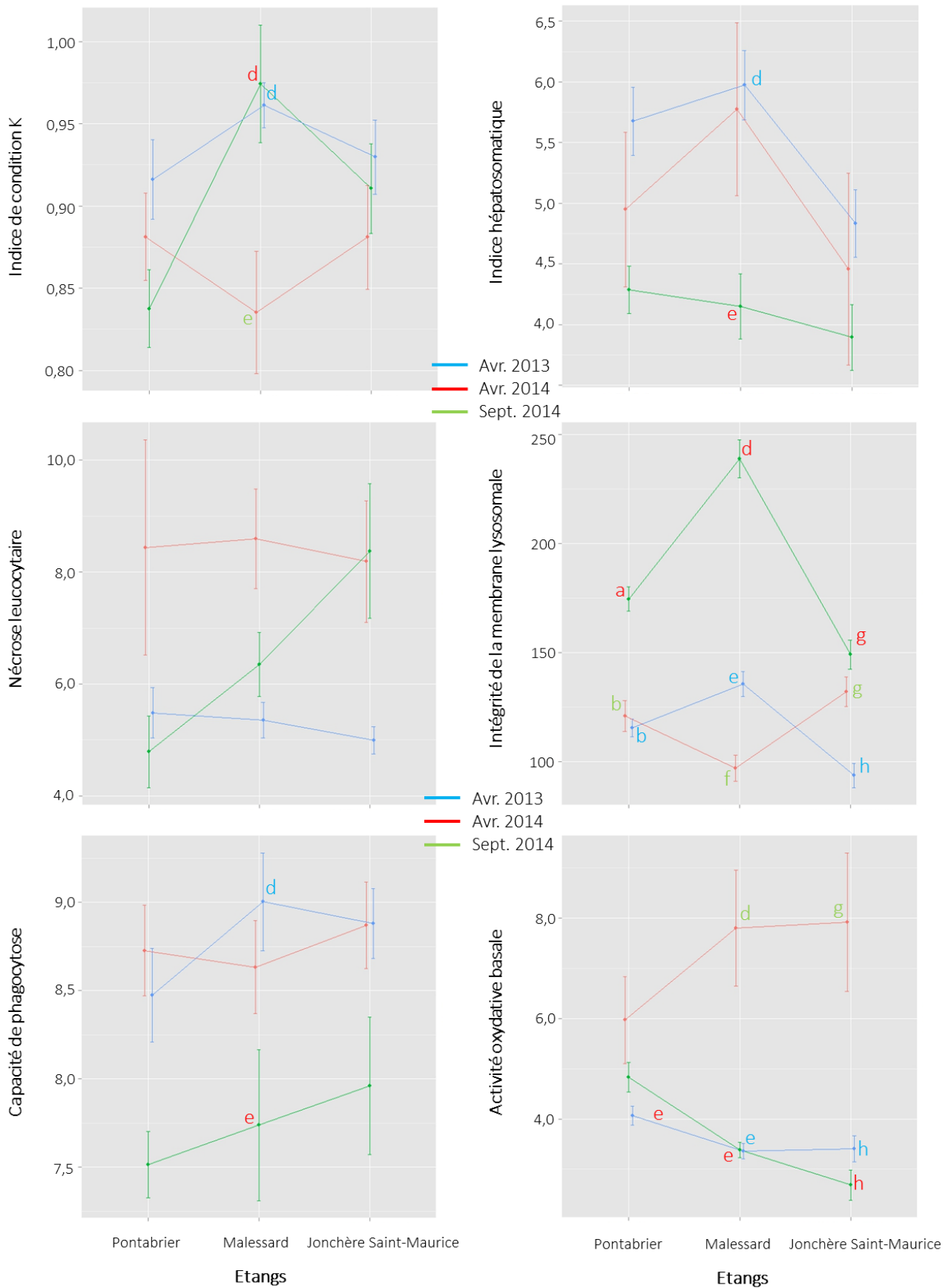


Figure 24 : Réponses biologiques en fonction des étangs et de la période d'exposition (D14 pour chaque période). Les lignes bleues représentent les résultats obtenus en avril 2013, en rouge ceux d'avril 2014 et en vert ceux de septembre 2014. Les différences significatives entre les périodes sont représentées par différentes lettres minuscules ($\alpha = 5\%$), les différences entre les étangs n'étant pas représentées.

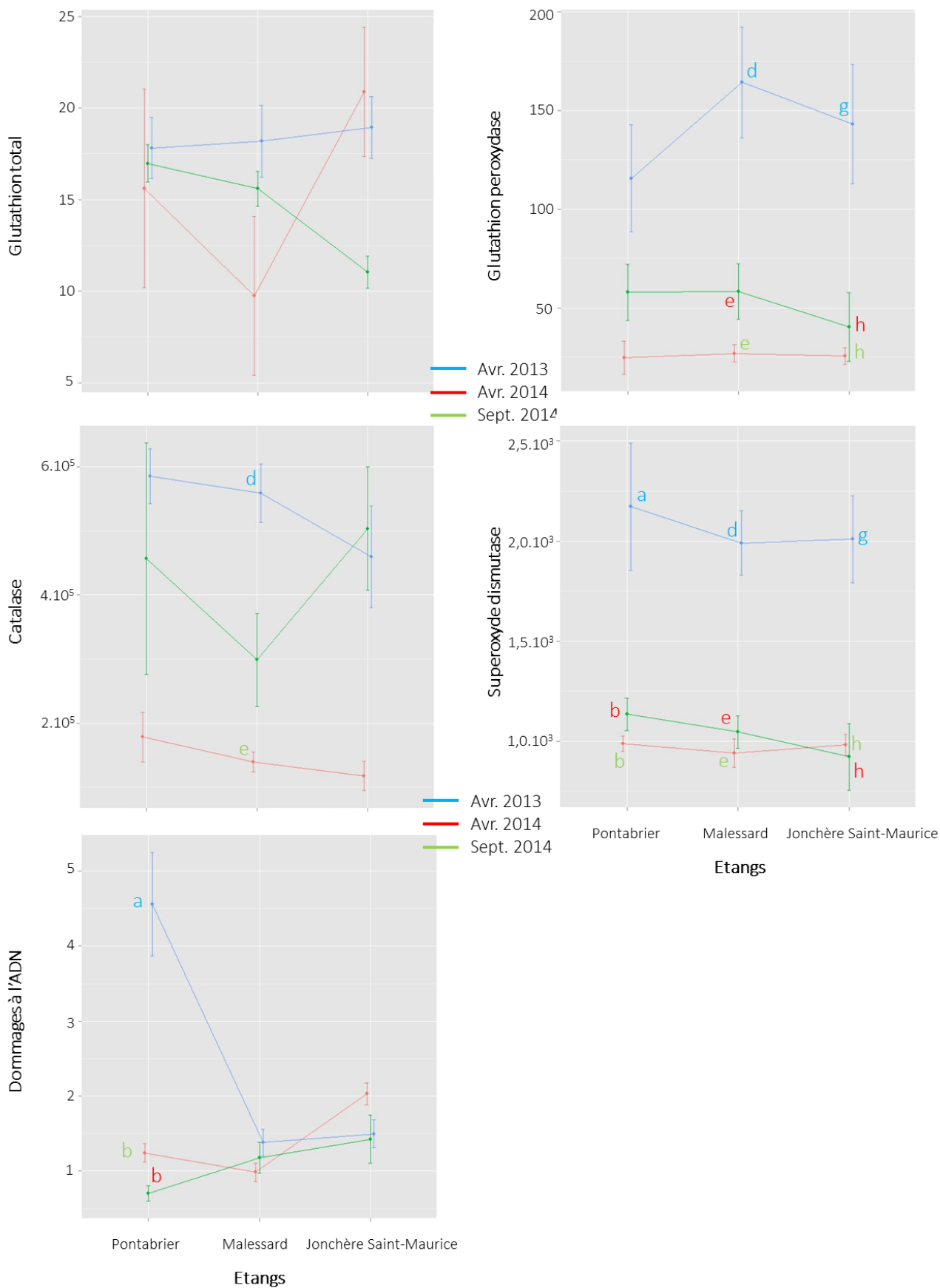


Figure 25 : Réponses biologiques (suite) en fonction des étangs et de la période d'exposition (D14 pour chaque période). Les lignes bleues représentent les résultats obtenus en avril 2013, en rouge ceux d'avril 2014 et en vert ceux de septembre 2014. Les différences significatives entre les périodes sont représentées par différentes lettres minuscules ($\alpha = 5\%$), les différences entre les étangs n'étant pas représentées.

3.2.3. Les variations des conditions environnementales

La proportion des différentes espèces de métaux, ou spéciation, est fonction de plusieurs facteurs abiotiques, tels que la température, le pH et la dureté de l'eau. En fonction des valeurs de ces paramètres, telle ou telle espèce métallique sera plus présente que d'autres et ceci peut influencer la biodisponibilité, modulant l'accumulation du métal dans un organisme et donc sa toxicité. Aucune analyse de spéciation n'a été réalisée dans cette étude, ne permettant pas de statuer sur les espèces métalliques présentes dans les différents étangs. Bien que cette analyse aurait permis de mieux comprendre les possibles effets des facteurs confondants, cela aurait rajouté un grand nombre de variables, pouvant rendre hésitante l'interprétation des résultats. Les facteurs confondants sont discutés ci-dessous de manière individuelle, mais leur interaction peut tout aussi bien impacter les réponses aux xénobiotiques que chaque facteur seul (Fischer et al., 2013).

3.2.3.1. Les variations de température dans les étangs

Les poissons étant poïkilothermes, la température est certainement le facteur confondant le plus étudié lors d'études environnementales utilisant ce taxon comme modèle biologique. Ce paramètre peut influencer le métabolisme des poissons, et donc leur croissance, leur consommation d'oxygène, et d'importantes fonctions biologiques (Cuenco et al., 1985; Lushchak, 2011). En fonction de l'espèce, des températures et de la durée de l'expérience, les effets de ce paramètre sur les poissons sont très variables. Les variations de température peuvent aussi bien inciter le système immunitaire que l'altérer (Dexiang et Ainsworth, 1991; Hardie et al., 1994; Engelsma et al., 2003; Nikoskelainen et al., 2004; Kumari et al., 2006). Les effets de la température s'observent également sur le système antioxydant et sur la peroxydation lipidique (Parihar et Dubey, 1995; Parihar et al., 1997; Dorts et al., 2012; Vinagre et al., 2012).

Il existe néanmoins des effets généraux d'une élévation ou d'une diminution de la température sur le poisson. Une élévation de la température augmente généralement la consommation d'oxygène des poissons et augmente donc la production d'ERO (Lushchak, 2011). Enfin Sturm et al. (1999) ainsi que Beauvais et al. (2002) n'ont observé aucun effet de ce paramètre sur les activités des cholinestérases des poissons. En plus du métabolisme des

poissons, la température peut également modifier la toxicité d'un métal en impactant sa biodisponibilité, sa solubilité et son accumulation (MacLeod et Pessah, 1973; Luoma, 1983; Chen et al., 2000). Il paraît donc indispensable de mesurer ce paramètre lors d'études sur le terrain.

La gamme de température possible pour l'épinoche se situe entre 0 et 22,7°C (Sanchez, 2007) et n'était donc pas dépassée lors de nos expérimentations *in situ*, excepté lors de la première journée en septembre 2014 (Cf. Figure 26). Avant chaque expérimentation, une acclimatation au laboratoire de 2 à 3 semaines à la température et aux autres paramètres physico-chimiques des étangs a été respectée. Cette acclimatation était indispensable pour éviter les brusques changements de température qui ont souvent des effets prononcés sur les poissons (Hardie et al., 1994; Parihar et al., 1997; Engelsma et al., 2003).

Lors de la première expérimentation *in situ*, la température était évaluée lors de la mise en eau et lors des temps de prélèvement. Cette méthode a posé des problèmes d'interprétation des résultats, car la température des différents étangs n'était pas évaluée à la même heure. En effet, tandis que la température d'un étang pouvait être évaluée vers 9h, celle du dernier étang l'était aux alentours de 11h, et donc était généralement plus importante de 4 ou 5°C. Ces différences de température augmentaient donc le poids de cette variable lors des analyses en composantes principales (ACP).

Afin de minimiser ces biais, des sondes attachées aux cages ont enregistré ce paramètre continuellement (toutes les heures) pendant les autres expériences. La Figure 26 retrace les variations de température en fonction des étangs et des expériences. Ces tracés ont souligné le fait que les variations des températures en fonction des heures et des jours étaient identiques dans les trois étangs. Pour chaque expérience, la température mesurée dans l'étang de Pontabrier était inférieure de 2 à 3 °C à celle de l'étang de la Jonchère Saint-Maurice, la température au niveau des cages maintenues dans l'étang de Malessard se situant entre celles des deux autres étangs (Cf. Figure 26).

Peu d'études se sont focalisées sur les effets d'une diminution ou d'une augmentation de température de seulement 2 ou 3°C chez les poissons. La grande majorité des études soulignant un effet de ce paramètre l'ont observé pour des variations allant de -14 à -5°C (Dexiang et Ainsworth, 1991; Nikoskelainen et al., 2004) ou de +5 à +12°C (Parihar et Dubey,

1995; Baykan et al., 2007). Deux études se sont rapprochées des 2, 3°C en observant des effets d'une baisse ou d'une augmentation de la température de 4°C. Hardie et al. (1994) ont observé une augmentation de la flambée oxydative chez la truite arc-en-ciel après une baisse de 4°C de la température, tandis que Ndong et al. (2007) ont rapporté une diminution de la phagocytose chez le tilapia du Nil, exposé à des variations de + ou – 4°C par rapport à sa température optimale. Les variations de température peuvent aussi influencer la susceptibilité de ce poisson à un stress biologique, comme l'ont montré Ndong et al. (2007) après une exposition à une bactérie (*Streptococcus iniae*) suivie par différentes températures. Une variation de -8 ou +8°C par rapport à une température d'acclimatation augmente la mortalité des poissons suite au stress biologique, et donc leur susceptibilité envers cette bactérie.

Malgré le manque d'études sur les faibles variations de température, le fait que les épinoches aient été encagées dans des étangs avec une température dans leur gamme thermique, que les variations quotidiennes de température étaient identiques entre les étangs, et que les différences de valeurs de ce paramètre entre les étangs étaient seulement de 2 à 3°C, réduit grandement l'importance de ce facteur dans la comparaison et l'interprétation des résultats.

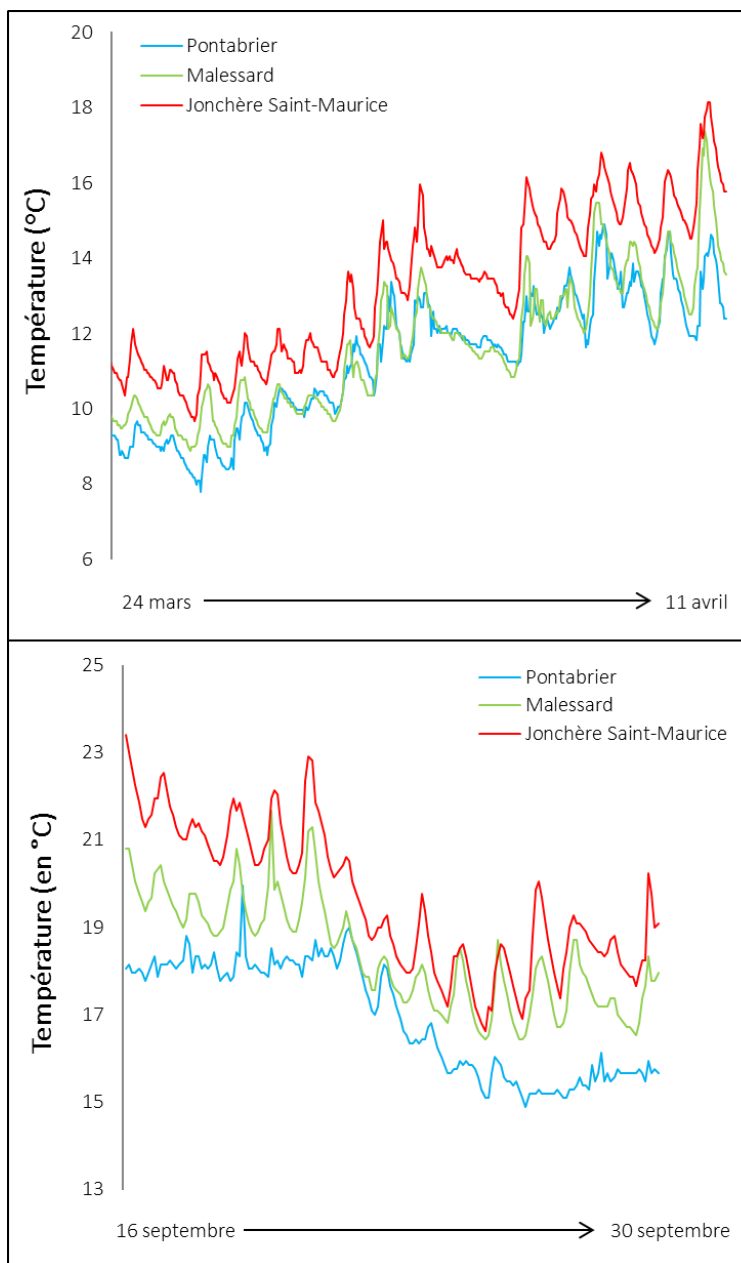


Figure 26 : Températures à l’intérieur des cages des trois étangs de la Haute-Vienne pendant l’expérience d’avril 2014 (en haut) et celle de septembre 2014 (en bas). La température a été enregistrée toutes les heures de la mise en eau à la fin des expériences.

3.2.3.2. Les variations des autres paramètres physico-chimiques de l'eau

D'autres paramètres physico-chimiques peuvent impacter la toxicocinétique et la toxicodynamique des métaux et certaines fonctions biologiques de l'organisme. C'est le cas du pH, du taux d'oxygène ou encore de la dureté de l'eau (Lushchak et al., 2001; Martínez-Álvarez et al., 2005; Bowden, 2008).

Comme dit précédemment, le pH est un facteur critique pour la solubilité et la toxicité de l'aluminium (Goyer et Clarkson, 1996). Il agit aussi sur la spéciation d'autres métaux, dont l'uranium, le cuivre, le cadmium, le mercure, le plomb ou encore le zinc (Spry et Wiener, 1991; Rand et al., 1995; Sevcikova et al., 2011; Skipperud et al., 2013; Qu et al., 2014). Tout comme la température, les variations du pH peuvent induire des effets néfastes sur les systèmes immunitaire et antioxydant. Contrairement aux variations de pH entre les étangs (min : 6,65; max : 8,08 ; moy : $7,31 \pm 0,42$), les études montrant des effets du pH ont mis en place des pH plus faibles (4,5 à 5) ou plus forts (9) (Nagae et al., 2001; Bowden, 2008; Qu et al., 2014). Quant aux études évaluant les effets de xénobiotiques sur des organismes, les différences de pH entre les sites sont soit écartées (De la Torre et al., 2007) soit n'ont pas d'impact sur les résultats (Wepener et al., 2011).

Lors des ACP réalisées lors de chaque expérimentation dans la Haute-Vienne, ou lorsque ces trois expérimentations sont réunies (Cf. Figure 27), la variable explicative pH n'a pas eu de poids dans l'explication des résultats.

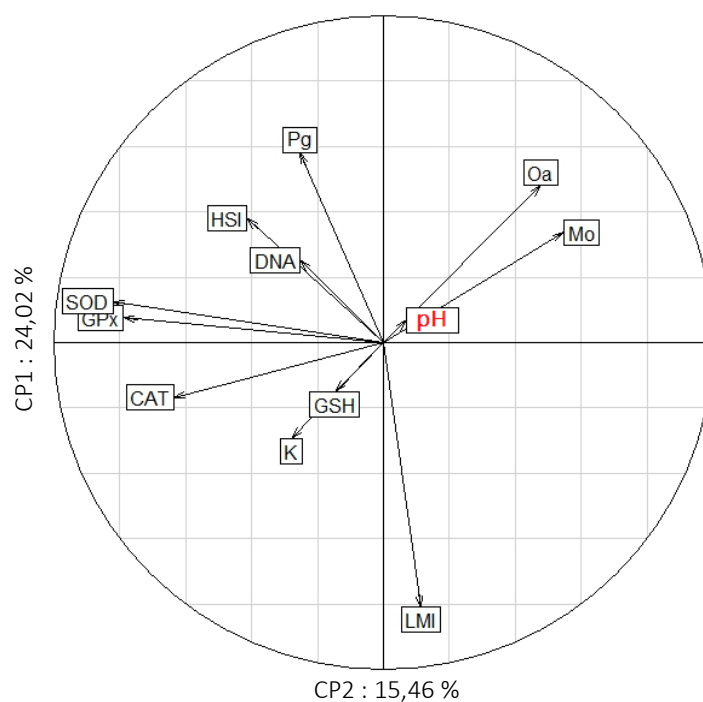


Figure 27 : Analyse en composantes principales effectuée sur les réponses obtenues chez les épinoches encagées dans les trois étangs de la Haute-Vienne en avril 2013, avril 2014 et septembre 2014. La variable pH (en rouge) est illustrative, donc non-utilisée lors de la construction de l'ACP. Les pourcentages au niveau des deux composantes principales (CP1 et CP2) sont leur inertie. K : indice de condition de Fulton ; HSI : indice hépatosomatique ; Mo : nécrose leucocytaire ; Oa : production basale d'ERO ; LMI : intégrité de la membrane lysosomale ; Pg : capacité de phagocytose ; GSH : glutathion total ; CAT : catalase ; GPx : Glutathion peroxydase ; SOD : superoxyde dismutase ; DNA : dommages à l'ADN.

Grâce à ces résultats appuyant le fait que les variations de pH étaient relativement faibles par rapport à celles de la littérature, ce paramètre a probablement eu peu d'importance dans l'explication des résultats obtenus entre les différents étangs.

Il existe un manque de données dans la littérature sur les possibles effets d'un autre facteur confondant sur l'accumulation et la toxicité des métaux, mais aussi sur les poissons : la conductivité. Cependant, ce paramètre donne des informations quant à la présence de sels dissous ou non dans l'eau, dont certains sels métalliques potentiellement toxiques (Nieto et al., 2007). Dans notre étude, les conductivités retrouvées au niveau des 6 étangs de Haute-Vienne et du Cantal sont très faibles, allant de 8 à 125 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Au laboratoire, avant leur mise en eau, les épinoches ont été acclimatées progressivement à une faible conductivité (50 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Cette acclimatation progressive a permis de limiter les stress quant à la vie dans des eaux avec de si faibles conductivités.

Le taux d'oxygène peut aussi être un facteur influençant la santé des organismes aquatiques. Des conditions d'hyperoxie entraînent une surconsommation d'oxygène pouvant déséquilibrer la balance oxydative et créer un stress oxydant. Cette augmentation du stress oxydant a de nombreuses fois été rapportée chez les poissons (Lushchak et al., 2005a; Olsvik et al., 2005; Salas-Leiton et al., 2009), entraînant des activités antioxydantes élevées (Roberts et al., 1987; Ritola et al., 2002a; Ritola et al., 2002b). On pourrait penser que des conditions hypoxiques entraînent donc une diminution de la consommation d'oxygène et de la production d'ERO. Cependant, les organismes ont développé une stratégie adaptative pour faire face au possible stress oxydant lors de la réoxygénation de leur milieu. Cette stratégie, nommée « préparation au stress oxydant », décrite par Hermes-Lima et al. (1998), se traduit par une augmentation des activités antioxydantes lors d'hypoxie. Ce processus a ensuite été plusieurs fois observé chez les poissons (Cooper et al., 2002; Lushchak et al., 2005b; Martínez-Álvarez et al., 2005; Lushchak et Bagnyukova, 2007). Le facteur le plus critique pour les organismes ne serait pas l'hypoxie mais la réoxygénation, induisant le stress oxydant le plus important (Halliwell, 1994). Il faut toutefois noter que l'hypoxie peut aussi entraîner du stress (Caldwell et Hinshaw, 1994), réduire les capacités immunitaires (Welker et al., 2007; Bowden, 2008) et impacter la croissance (Cuenco et al., 1985) des poissons.

Le taux d'oxygène n'a été évalué que dans les étangs de la Haute-Vienne lors d'une seule expérimentation (avril 2014), dont les valeurs sont :

Pontabrier :	13,14 mg/L ou 127,6 %
Malessard :	12,95 mg/L ou 124,6 %
Jonchère Saint-Maurice :	11,79 mg/L ou 117,7 %

Tandis que la plupart des conditions d'hypoxie dans les études citées précédemment sont caractérisées par un pourcentage d'oxygène allant de 0 à 65 %, les conditions d'hyperoxie commencent à 130 % pour un maximum de 300 %. L'oxygénation dans les étangs de la Haute-Vienne correspondait donc à des conditions proches de l'hyperoxie et pouvait donc induire un stress oxydant chez les épinoches. Cependant, le manque de données sur ce paramètre ne permet pas de conclure sur les conditions d'oxygénation des étangs et les possibles différences entre les étangs.

D'autres conditions physico-chimiques peuvent-être considérées comme des facteurs confondants, tels que la dureté de l'eau, évaluée par les ions calcium et magnésium, ainsi que la photopériode. Bien que la photopériode puisse entraîner des modifications de la physiologie (Bowden, 2008), des protagonistes du système immunitaire (Ángeles Esteban et al., 2006; Valenzuela et al., 2006; Valenzuela et al., 2007) et du système antioxydant (Fitzgerald, 1992; Ángeles Esteban et al., 2006), le fait d'avoir une photopériode naturelle et que les étangs de chaque département soient proches évite les différences de photopériode. Ceci permet donc d'exclure ce facteur confondant lors des comparaisons inter-sites.

La dureté de l'eau peut agir sur l'accumulation des métaux dans les organismes et sur leur toxicité. Plusieurs études ont montré que plus la dureté de l'eau augmente, moins le métal s'accumule et/ou moins la toxicité du métal est importante. C'est le cas avec l'ion uranyle (Markich et al., 1996), le cadmium et le cuivre (Saglam et al., 2013). Sorensen (1991) a par contre rapporté l'inverse avec le zinc, qui s'accumulait plus dans les organes des poissons lorsque la dureté de l'eau est plus élevée. Bien que la dureté à proprement dite n'a pas été calculée dans les étangs du Cantal et de Haute-Vienne, les concentrations du calcium et du manganèse ont été mesurées dans les différents étangs. A chaque expérimentation et pour chaque département, les concentrations les plus élevées de calcium ont été retrouvées dans les étangs soumis aux rejets miniers. Les concentrations en magnésium n'étaient par contre pas corrélées avec les expérimentations ou les étangs. En calculant les corrélations entre les concentrations en calcium et magnésium dans la fraction dissoute de l'eau des six étangs et la bioaccumulation métallique dans les trois organes des épinoches lors de la première expérimentation (Cf. Tableau 22), l'accumulation de l'uranium dans les trois organes semblait augmenter lorsque le calcium augmentait. Ce résultat a été retrouvé aussi bien au Cantal qu'en Haute-Vienne. Néanmoins, cette concentration en calcium est aussi fortement corrélée avec celle en uranium dans l'eau, ce qui limite l'hypothèse que l'augmentation de la dureté de l'eau induisait une augmentation de l'accumulation de l'uranium dans les organes de l'épinoche.

Tableau 22 : Corrélation entre les concentrations en Ca et Mg dans la fraction dissoute de l'eau des six étangs et la bioaccumulation des 5 métaux majoritaires dans les trois organes des épinoches. Les valeurs en rouge sont des corrélations significatives (test de Pearson, $\alpha = 5\%$).

Bioaccumulation		Cantal		Haute-Vienne	
Metal	Organe	Ca	Mg	Ca	Mg
Uranium	rate	0,40	0,28	0,52	0,06
	foie	0,62	0,21	0,59	0,06
	muscle	0,36	0,15	0,47	0,06
Aluminium	rate	0,05	-0,20	0,36	0,19
	foie	0,24	0,12	0,01	0,26
	muscle	-0,15	-0,09	0,38	0,43
Fer	rate	-0,25	-0,35	0,20	0,50
	foie	-0,14	0,04	0,27	0,06
	muscle	-0,19	0,07	-0,22	-0,12
Baryum	rate	0,01	-0,14	0,35	0,12
	foie	-0,24	-0,02	0,23	-0,03
	muscle	-0,16	0,13	-0,27	-0,20
Manganèse	rate	-0,15	-0,25	0,05	0,43
	foie	0,62	0,29	-0,01	-0,40
	muscle	0,09	0,05	-0,19	-0,41

Concernant les corrélations entre l'accumulation des autres métaux et les teneurs en calcium ou en magnésium, aucun patron commun n'a été observé (Cf. Tableau 22), si ce n'est des corrélations significatives entre le magnésium et l'accumulation du manganèse dans les organes. La nature de cette corrélation était toutefois organo-dépendante.

Le nombre de facteurs environnementaux pouvant interagir avec les réponses biologiques est important. Afin d'éviter ces facteurs confondants lors de l'interprétation des résultats, les épinoches ont donc été acclimatées avant chaque expérimentations *in situ*, et notamment à la faible conductivité présente dans les étangs du Cantal et de la Haute-Vienne. Malheureusement le pH et la conductivité n'ont pas pu être mesurés continuellement au niveau des cages comme l'était la température. Le fait de travailler en milieu naturel ne permet pas de contrôler les variables environnementales, mais ces mesures ont permis de réduire l'importance de ces paramètres physico-chimiques dans nos résultats.

3.2.4. L'encagement et ses contraintes

Lors des expérimentations *in situ*, la biosurveillance active a été choisie via l'encagement d'épinoche pour (i) avoir des épinoches dans tous les étangs, (ii) en nombre suffisant et (iii) pour faciliter les prélèvements. Cette stratégie a induit du stress via des contraintes liées aux manipulations de terrain, noté dans l'article scientifique du chapitre 6.

Notre système d'encagement (Cf. Figure 20) a été fabriqué selon plusieurs critères :

- Le volume de la cage a été calculé pour contenir un nombre suffisant d'épinoches pour les analyses statistiques tout en gardant une densité ($2,31 \text{ kg/m}^3$) située entre celles recommandées par l'OCDE : densité de 4 à 8 kg/m^3 pour la truite arc-en-ciel, de 0,2 à 2 kg/m^3 pour le médaka (*Oryzias latipes*) et de 0,2 à 1 kg/m^3 pour le poisson zèbre (OECD, 2000).
- La taille des mailles ($3,5 \text{ mm} \times 3,5 \text{ mm}$) a été retenue afin de ne pas permettre aux épinoches de s'échapper (observation personnelle de la sortie des épinoches d'une cage ayant des mailles de $4,5 \text{ mm} \times 4,5 \text{ mm}$), tout en laissant passer de potentielles sources de nourriture.
- La forme cylindrique a été choisie pour faciliter la nage des poissons et par facilité de construction.

Ce système a ensuite directement été utilisé lors des études environnementales présentées dans ce manuscrit. Les études concernant les possibles stress dus à l'encagement n'ont été réalisées qu'à la suite des études environnementales. Ce choix a été fait puisque tout confinement induit inévitablement du stress chez les organismes encagés (Ruane et al., 1999; Vazzana et al., 2002; Oikari, 2006). Il n'existe pas de cage parfaite évitant tout stress chez les poissons. Même la biosurveillance passive induit du stress ponctuel chez les poissons, soit par la capture avec un filet (Pickering et al., 1982; Blom et al., 2000; Brydges et al., 2009), soit par la pêche à la ligne ou électrique (Dotson, 1982; Mesa et Schreck, 1989; Gustaveson et al., 1991; Bracewell et al., 2004). Suite aux expériences concernant les possibles effets de notre système d'encagement sur des marqueurs d'écotoxicité, la densité utilisée lors des études environnementales au Cantal et en Haute-Vienne n'a pas affecté les biomarqueurs des épinoches. En effet, seule une densité 150 % plus forte que celle utilisée, soit $3,54 \text{ kg/m}^3$, a impacté ces biomarqueurs. Bien que l'étude n'était que quantitative, les contenus stomacaux prélevés sur les épinoches ayant passé 28 jours encagées dans les six sites d'étude ont prouvé

que les épinoches pouvaient se nourrir même à l'intérieur de ces cages. Une étude qualitative aurait été intéressante afin de connaître la nature des proies qui pouvaient passer à travers les cages. Seules les contraintes liées à la distance entre les étangs et à celle entre les étangs et le laboratoire ont impacté des biomarqueurs d'écotoxicité. En effet, un court transport (20 minutes) des épinoches entre les étangs avant dissection a augmenté le stress oxydant, tandis que le jeûne de ces poissons a modifié les capacités immunitaires. Cependant le jeûne de 14 jours n'était pas visible au niveau des réserves énergétiques, et les effets observés étaient peut-être dus à l'interaction entre le stress nutritionnel et les xénobiotiques contenus dans le ruisseau où les épinoches étaient encagées. La plupart des conditions de notre système d'encagement peuvent donc être validées pour les études écotoxicologiques :

- L'épinoche à trois épines est un bon candidat pour l'encagement (peu de mortalité et de cannibalisme, espèce sociale et relativement petite).
- La densité utilisée n'induit pas d'effet sur les marqueurs d'écotoxicité.
- La taille des mailles est suffisante pour laisser passer des aliments capturés par les épinoches.

Des améliorations de ce système d'encagement ou des conditions liées aux expériences sur le terrain sont possibles :

- La forme cylindrique des cages ne permet pas un bon contact cage-sédiment et une cage à fond plat serait plus adaptée.
- Il faudrait éviter tout transport avant dissection.
- Un apport quotidien de nourriture permettrait d'éliminer le facteur alimentation dans les possibles stress liés à l'encagement. Cependant, cet apport n'est pas souvent réalisable lorsque l'étang se situe loin du laboratoire, et peut tout de même induire du stress chez les organismes si l'apport nécessite une manipulation de la cage.
- Le bien-être est un état de complète santé mentale et physique de l'organisme comme s'il pouvait vivre sa vie naturelle. Or, sous pression extérieure, comme la mise en cage, ce bien-être peut être corrompu, créant un stress chez cet organisme. Afin d'améliorer le bien-être des épinoches encagées un enrichissement de leur nouvel environnement est possible, comme par exemple ajouter des objets ou matériaux dans lesquels elles peuvent passer, se cacher, etc.

CHAPITRE 8 : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES



1. Réponses aux objectifs de la thèse

Le Tableau 23 résume les principaux résultats obtenus lors des expériences *in situ* pour répondre aux objectifs posés en amont.

La contamination métallique des étangs proches d'anciens sites miniers uranifères présente-t-elle un risque pour l'épinoche ?

↳ *Oui, ces étangs ont présenté de plus fortes concentrations métalliques que d'autres plans d'eau en dehors de l'influence des sites miniers, et notamment pour l'uranium, qui a été accumulé dans les organes des poissons encagés. Cette exposition aux métaux provenant d'anciens sites miniers a créé un stress oxydant induisant une peroxydation lipidique, ainsi qu'une augmentation de l'activité de l'acétylcholinestérase. D'autres effets ont pu être observés, mais variaient en fonction du département, du temps de prélèvement ou du métal accumulé.*

L'exposition à cette pollution chimique modifie-t-elle la susceptibilité des épinoches envers un stress biologique soudain ?

↳ *Oui, en empêchant la réponse phagocytaire et une partie de la réponse antioxydante liées à l'injection de lipopolysaccharides. Cependant, la contamination polymétallique a davantage modifié les réponses analysées que le stress biologique ou l'interaction des deux stress.*

Les conditions d'encagement de l'épinoche à trois épines valident-elles cette technique lors de prochaines expériences *in situ* ?

↳ *Oui, l'épinoche à trois épines est un bon candidat à notre système encagement. Une densité inférieure ou égale à $2,31 \text{ kg/m}^3$ n'a pas impacté les biomarqueurs analysés. Cependant, le jeûne de plus de 14 jours ainsi qu'un transport avant dissection sont à éviter afin de ne pas moduler certaines réponses à une pollution.*

Tableau 23 : résumé des effets observés ou de l'absence d'effets sublétaux de la contamination polymétallique sur l'épinoche ainsi que sur sa susceptibilité envers un stress biologique soudain (injection de LPS).

Type d'effet ou fonction biologique impactée	Effets particuliers de la contamination polymétallique	Aucun effet de la contamination polymétallique	Remarques
Déséquilibre de la balance oxydative	Augmentation de la production basale d'ERO Modification des réponses antioxydantes	Production d'ERO stimulée par le PMA Index de stimulation de la flambée oxydative	Fonction des départements et périodes
Dommages oxydatifs	Augmentation de la peroxydation lipidique	Dommages à l'ADN Intégrité de la membrane lysosomale	
Capacités immunitaires		Nécrose leucocytaire Apoptose leucocytaire Capacité de phagocytose	Distribution leucocytaire impactée lors d'une seule expérience
Indices de condition	Diminution de l'embonpoint (K)	Indice hépatosomatique	K peut varier avec la disponibilité en nourriture
Transmission synaptique	Augmentation de l'activité de l'AcHé		Visible qu'après 28 jours
Système de détoxication		Métallothionéines	
Dommages histologiques		Formation d'agrégats macrophagiques dans le rein	
Susceptibilité à un stress biologique (LPS)	Diminution de la réponse phagocytaire aux LPS et déficit du GSH → augmentation de la susceptibilité au stress biologique	Autres réponses au stress biologique (apoptose, TBARS, CAT)	Diminution de la GST liée à la diminution du GSH

En plus de ces deux objectifs, ces travaux ont permis d'appuyer l'intérêt de certains procédés lors d'études écotoxicologiques par biosurveillance active.

2. L'intérêt d'une approche multi-biomarqueurs

L'approche multi-biomarqueurs a été utilisée afin d'obtenir une vision globale des effets d'un mélange métallique sur l'épinoche. Lors de ces travaux, cette approche a permis d'observer une concordance entre plusieurs biomarqueurs mesurés, appuyant l'effet du stress chimique ou biologique exercé sur les épinoches. Ceci est d'autant plus important car, comme précédemment mentionné, les biomarqueurs analysés ne sont pas spécifiques d'une contamination, et réagissent à de nombreux facteurs abiotiques et biotiques. A cause de ces facteurs confondants, la conclusion sur les variations d'un seul biomarqueur peut être délicate, alors que l'utilisation d'une approche multi-biomarqueurs peut permettre d'appuyer des résultats (si les variations de plusieurs biomarqueurs complémentaires débouchent sur la même conclusion).

Cet avantage est argumenté avec le stress oxydant, induit par l'exposition aux métaux, qui a été observé sur plusieurs catégories de biomarqueurs, analysés sur plusieurs organes (marqueur immunitaire via la production d'ERO par les leucocytes de la rate ; modifications du système antioxydant et peroxydation lipidique observées au niveau hépatique). Bien que ce ne fût pas le cas pour d'autres effets/réponses, ce même stress oxydant a été rapporté au niveau de plusieurs départements, et sur deux années consécutives, fait assez rare lors d'études *in situ*. Ces deux biomarqueurs paraissent donc assez robustes pour des études de surveillance *in situ*. Cette approche a aussi permis de souligner les modifications de la susceptibilité des épinoches au stress biologique dues à la contamination polymétallique sur deux biomarqueurs : la capacité de phagocytose et la concentration en glutathion.

3. L'intérêt de l'analyse de l'immunotoxicité

Comme précédemment consigné, deux marqueurs immunitaires ont pu mettre en avant des effets de la contamination polymétallique sur l'épinoche à trois épines ou sur sa susceptibilité envers un stress biologique : l'activité oxydative basale ainsi que la phagocytose. Les marqueurs du système immunitaire, marqueurs indispensables lors d'un stress pathogénique, ont aussi permis de mettre en place le stress biologique via l'injection de LPS.

L'évaluation du système immunitaire présente aussi des avantages analytiques lors d'études *in situ*. En effet, les organes peuvent être prélevés directement sur le terrain et être préparés pour l'analyse de ces biomarqueurs, contrairement à d'autres, nécessitant par exemple un milieu stérile.

Cependant, un approfondissement des connaissances sur les variabilités inter-individuelles lors d'expériences *in situ* est nécessaire pour certains immunomarqueurs, tels que l'activité oxydative stimulée par le PMA, ou encore l'intégrité de la membrane lysosomale, évaluées par cytométrie en flux.

4. L'intérêt de l'épinoche

L'intérêt de l'épinoche en tant que modèle biologique a déjà été discuté dans le chapitre 3, partie 2. Néanmoins, les observations réalisées pendant les expériences au Cantal et en Haute-Vienne ont justifié le choix de ce modèle lors d'encagement. En effet, une très faible mortalité des épinoches pendant l'encagement a été rapportée : seulement quatre épinoches sont mortes sur les 585 encagées dans les étangs de la Haute-Vienne, du Cantal et dans le ruisseau de l'Evêque. Lors de la première expérience, des œufs ont même été retrouvés à l'intérieur d'une des cages de l'étang de Saint-Pierre. En plus de sa petite taille, sa gamme de température est très intéressante pour l'encagement dans les étangs du centre de la France. De plus, l'élevage de l'INERIS et le nombre important d'analyses déjà mises au point facilitent le choix de l'épinoche comme modèle pour des études environnementales.

5. Questions laissées en suspens

5.1. Une acclimatation à la contamination polymétallique est-elle possible ?

Le but de l'expérience réalisée en septembre 2014 était de savoir si une exposition plus longue au stress chimique (3 mois au lieu de 2 semaines) avait les mêmes effets sur les réponses des épinoches au stress biologique. Le temps de prélèvement intermédiaire (D14) a été effectué sans stress biologique, qui devait se réaliser quatre jours avant la fin de la manipulation. Cependant, cette expérience n'a pas pu aboutir à cause d'un curage de l'étang de Pontabrier effectué durant l'exposition des épinoches, changeant alors toute la chimie de l'eau et ne nous permettant pas de réitérer cette expérience ultérieurement.

Cette augmentation de la durée de l'exposition à la contamination polymétallique aurait peut-être permis aux épinoches de s'acclimater à cette pollution chimique. Des phénomènes d'acclimatation chez les poissons ont déjà été observés après une exposition chronique à des métaux. Des modifications cellulaires (leucopénie et diminution des érythrocytes) dans le sang de la truite arc-en-ciel ont été observées après une exposition aiguë (24 h) à du cuivre, mais ces modifications n'ont plus été rapportées lors de l'exposition chronique (16 semaines) (Dick et Dixon, 1985). Similairement, l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*) a accumulé dans sept organes le cadmium présent dans son milieu avec des concentrations qui augmentaient les deux premières semaines d'exposition, pour ensuite diminuer au bout de 8 et 16 semaines jusqu'aux valeurs de référence (Gill et al., 1992).

Si les épinoches peuvent s'acclimater à la contamination polymétallique présente dans les étangs soumis aux rejets miniers, leurs réponses envers un stress biologique soudain seraient-elles les mêmes ?

5.2. Que se passe-t-il pendant le temps de latence entre injection et dissection ?

Une autre hypothèse existe pour expliquer les différences de la réponse phagocytaire aux LPS en fonction des étangs. Cette hypothèse repose sur le temps de latence entre les injections de PBS/LPS et les dissections/analyses (un temps de 4 jours utilisé dans nos études).

Il se pourrait que la phagocytose des épinoches encagées dans les deux étangs qui possèdent les plus fortes concentrations métalliques ait été stimulée par ces métaux. La réponse phagocytaire aux LPS aurait été plus rapide que celle des épinoches encagées dans l'étang de la Jonchère Saint-Maurice. Cette augmentation de la phagocytose aurait pu se dérouler pendant les quatre jours entre injections et dissections, puis revenir à des niveaux observés avec le PBS lors des dissections et analyses. Inversement, les épinoches encagées dans l'étang le moins contaminé auraient pu mettre plus de temps à répondre aux LPS par la capacité de phagocytose, qui aurait été observée quatre jours après les injections. La Figure 28 schématise cette hypothèse, avec des valeurs de phagocytose purement théoriques.

Pour affirmer ou rejeter cette hypothèse, sur le terrain, des analyses de la capacité de phagocytose pourraient être entreprises pendant le temps de latence, soit à 1 et 2 jours après les injections, comme précédemment réalisées au laboratoire. Des témoins injection et sédation devraient être pris en compte afin de connaître leur impact sur ce biomarqueur. Cependant, la distance entre le laboratoire et les étangs et le fait de devoir travailler avec du matériel biologique frais ne permettent pas d'effectuer ces analyses avec un intervalle aussi court. Du fait que la contamination polymétallique retrouvée en Haute-Vienne soit complexe, des expériences auraient pu être réalisées au laboratoire, non pas en essayant de recréer la contamination, mais en ramenant de l'eau des différents étangs. Sans trajet, ces analyses pendant le temps de latence auraient pu être réalisées et l'hypothèse confirmée ou rejetée.

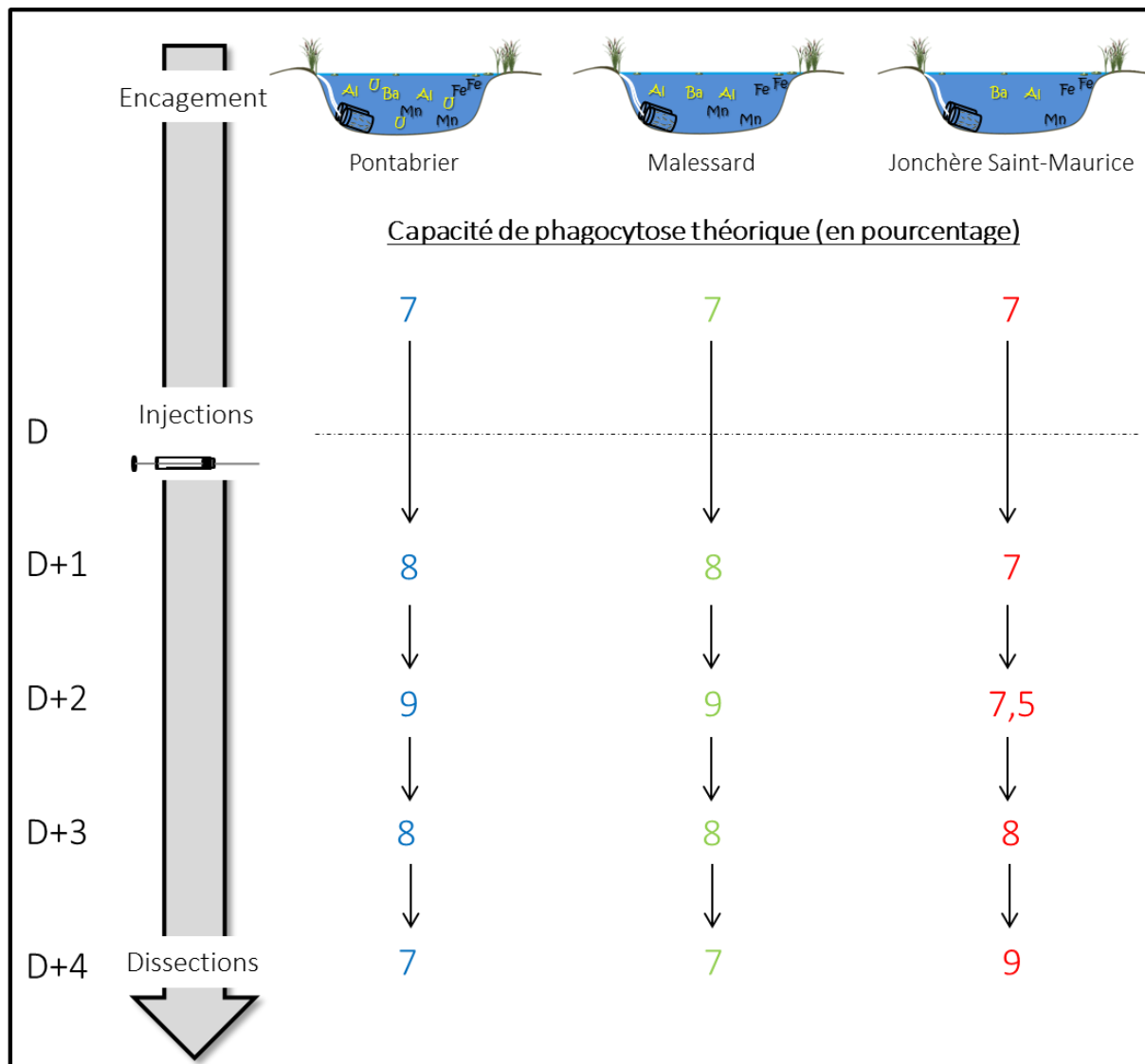


Figure 28 : Variations hypothétiques de pourcentage de phagocytose entre les injections de LPS et les dissections.

5.3. Et si le stress biologique était infectieux ?

Bien que les LPS soient les facteurs bactériens les plus virulents et pouvant mener à de fâcheuses conséquences chez les vertébrés (Swain et al., 2008), ceux injectés dans le muscle des épinoches ne vont entraîner qu'une inflammation sans causer d'infection. Plusieurs études ont montré que le stress infectieux engendrait des réponses différentes, et souvent plus importantes que le stress inflammatoire. Par exemple, des LPS et la bactérie *Aeromonas salmonicida* active ont des effets significatifs sur les niveaux de pentraxine du sérum du saumon (Lund et Olafsen, 1999). Cependant, les LPS induisent une augmentation de cette protéine après 2 jours d'exposition, tandis que la bactérie induit une diminution au bout de 4 et 5 jours. MacKenzie et al. (2008) ont observé chez la truite arc-en-ciel que l'inflammation causée par des LPS entraîne six fois moins de modification d'expression de gènes qu'une infection. Néanmoins, cette infection était causée par un virus.

Il n'est pas possible d'utiliser des bactéries virulentes sur le terrain, mais il serait intéressant de savoir si et comment l'exposition en laboratoire à la contamination polymétallique impacte la susceptibilité des épinoches à un stress biologique infectieux.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Abba E, BELGHYTI D, Benabid M, El Ibaoui H, (2010).** Relation taille-poids et coefficient de condition de la truite commune (*Salmo trutta macrostigma* Dumeril. 1858) de l'Oued Sidi Rachid (Moyen Atlas) Maroc. *Afrique SCIENCE* 6, 60-70.
- Acro, (2007).** Evaluation radiologique aux abords de trois anciennes mines d'extraction d'uranium du département de la Creuse, année 2007. *Association pour le Contrôle de la Radioactivité dans l'Ouest*, 1-13.
- Akcha F, Leday G, Pfohl-Leszkowicz A, (2004).** Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 552, 197-207.
- Aksnes A, Njaa LR, (1981).** Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 69, 893-896.
- Allen J, Wootton R, (1982).** The effect of ration and temperature on the growth of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* L. *Journal of Fish Biology* 20, 409-422.
- Allen LH, Aderem A, (1996).** Mechanisms of phagocytosis. *Current Opinion in Immunology* 8, 36-40.
- Allin CJ, Wilson RW, (1999).** Behavioural and metabolic effects of chronic exposure to sublethal aluminum in acidic soft water in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 670-678.
- Alloway BJ, (2013).** Heavy metals in soils. Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability. *Springer*.
- Amara R, Meziane 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.
- Amiard J-C, Amiard Triquet C, (2008).** Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. *Lavoisier*.
- Amiard J-C, (2011).** Les risques chimiques environnementaux: méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. *Lavoisier*.

- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Barka S, Pellerin J, Rainbow PS, (2006).** Metallothioneins in aquatic invertebrates: their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat Toxicol* 76, 160-202.
- Andersson C, Katsiadaki I, Lundstedt-Enkel K, Örberg J, (2007).** Effects of 17 α -ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic toxicology* 83, 33-42.
- Andrade T, Afonso A, Pérez-Jiménez A, Oliva-Teles A, de las Heras V, Mancera JM, Serradeiro R, Costas B, (2015).** Evaluation of different stocking densities in a Senegalese sole (*Solea senegalensis*) farm: Implications for growth, humoral immune parameters and oxidative status. *Aquaculture* 438, 6-11.
- Ángeles Esteban M, Cuesta A, Rodríguez A, Meseguer J, (2006).** Effect of photoperiod on the fish innate immune system: a link between fish pineal gland and the immune system. *Journal of pineal research* 41, 261-266.
- Antunes SC, de Figueiredo DR, Marques SM, Castro BB, Pereira R, Goncalves F, (2007).** Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Sci Total Environ* 374, 252-259.
- Anwar MA, Choi S, (2014).** Gram-negative marine bacteria: structural features of lipopolysaccharides and their relevance for economically important diseases. *Marine drugs* 12, 2485-2514.
- Archambault V, Dumont B, (2010).** L'indice biologique global normalisé (IBGN): principes et évolution dans le cadre de la directive cadre européenne sur l'eau.
- Areva NC, (2004).** Etablissement de Bessines: Bilan décennal environnemental 1994-2003. *COGEMA Bessines, CESAAM*.
- Ates B, Orun I, Talas ZS, Durmaz G, Yilmaz I, (2008).** Effects of sodium selenite on some biochemical and hematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792) exposed to Pb²⁺ and Cu²⁺. *Fish Physiol Biochem* 34, 53-59.
- Atli G, Canli M, (2008).** Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environ Toxicol Pharmacol* 25, 33-38.
- Auffret M, Rousseau S, Boutet I, Tanguy A, Baron J, Moraga D, Duchemin M, (2006).** A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicol Environ Saf* 63, 393-405.

B

- Baba A, (2009).** Apoptosis and necrosis. *XLII*.
- Bacchetta C, Rossi A, Ale A, Campana M, Parma MJ, Cazenave J, (2014).** Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecological Indicators* 36, 532-538.
- Bado-Nilles A, Quentel C, Mazurais D, Zambonino-Infante JL, Auffret M, Thomas-Guyon H, Le Floch S, (2011).** *In vivo* effects of the soluble fraction of light cycle oil on immune functions in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linne). *Ecotoxicol Environ Saf* 74, 1896-1904.
- Bado-Nilles A, Betoulle S, Geffard A, Porcher JM, Gagnaire B, Sanchez W, (2013).** Flow cytometry detection of lysosomal presence and lysosomal membrane integrity in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) immune cells: applications in environmental aquatic immunotoxicology. *Environ Sci Pollut Res Int* 20, 2692-2704.

Bado-Nilles A, Jolly S, Porcher JM, Palluel O, Geffard A, Gagnaire B, Betoulle S, Sanchez W, (2014a). Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus sp.* *Environ Pollut* 184, 9-17.

Bado-Nilles A, Techer R, Porcher JM, Geffard A, Gagnaire B, Betoulle S, Sanchez W, (2014b). Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Environ Toxicol Pharmacol* 38, 672-683.

Bado-Nilles A, Jolly S, Lamand F, Geffard A, Gagnaire B, Turies C, Porcher J-M, Sanchez W, Betoulle S, (2015a). Involvement of fish immunomarkers in environmental biomonitoring approach: Urban and agri-viticultural context. *Ecotoxicol Environ Saf* 120, 35-40.

Bado-Nilles A, Villeret M, Geffard A, Palluel O, Blanchard C, Le Rohic C, Besson S, Porcher J-M, Minier C, Sanchez W, (2015b). Recommendations to design environmental monitoring in the European bullhead, *Cottus sp.*, based on reproductive cycle and immunomarker measurement. *Mar Pollut Bull* 95, 576-581.

Baird DJ, Burton GA, Culp JM, Maltby L, (2007). Summary and recommendations from a SETAC pellston workshop on in situ measures of ecological effects. *Integrated environmental assessment and management* 3, 275-278.

Barillet S, Buet A, Adam C, Devaux A, Devaux A, (2005). Does uranium exposure induce genotoxicity in the teleostean *Danio rerio*? First experimental results. *Radioprotection* 40, S175-S181.

Barillet S, (2007). Toxicocinétique, toxicité chimique et radiologique de l'uranium chez le poisson zèbre (*Danio rerio*).

Barillet S, Adam C, Palluel O, Devaux A, (2007). Bioaccumulation, oxidative stress, and neurotoxicity in *Danio rerio* exposed to different isotopic compositions of uranium. *Environmental toxicology and chemistry* 26, 497-505.

Barillet S, Larno V, Floriani M, Devaux A, Adam-Guillermin C, (2010). Ultrastructural effects on gill, muscle, and gonadal tissues induced in zebrafish (*Danio rerio*) by a waterborne uranium exposure. *Aquat Toxicol* 100, 295-302.

Barillet S, Adam-Guillermin C, Palluel O, Porcher JM, Devaux A, (2011). Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. *Environ Pollut* 159, 495-502.

Baudrimont M, Lemaire-Gony S, Ribeyre F, Métivaud J, Boudou A, (1997). Seasonal variations of metallothionein concentrations in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 118, 361-367.

Baudrimont M, Andres S, Durrieu G, Boudou A, (2003). The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. *Aquatic toxicology* 63, 89-102.

Baykan U, Atli G, Canli M, (2007). The effects of temperature and metal exposures on the profiles of metallothionein-like proteins in *Oreochromis niloticus*. *Environ Toxicol Pharmacol* 23, 33-38.

Bayne CJ, Gerwick L, (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 725-743.

Beauvais SL, Cole KJ, Atchison GJ, Coffey M, (2002). Factors affecting brain cholinesterase activity in bluegill (*Lepomis macrochirus*). *Water, Air, and Soil Pollution* 135, 249-264.

- Béguel JP, (2012).** Etude de la capacité antioxydante en lien avec la reproduction chez l'huître creuse *Crassostrea gigas*, Ecole doctorale des sciences de la mer. *Université de Bretagne occidentale*.
- Bell MA, Foster SA, (1994).** The evolutionary biology of the threespine stickleback. *Oxford University Press*.
- Bennett PM, Janz DM, (2007).** Bioenergetics and growth of young-of-the-year northern pike (*Esox lucius*) and burbot (*Lota lota*) exposed to metal mining effluent. *Ecotoxicol Environ Saf* 68, 1-12.
- Berntssen MH, Aspholm OØ, Hylland K, Bonga SEW, Lundebye A-K, (2001).** Tissue metallothionein, apoptosis and cell proliferation responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr fed elevated dietary cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128, 299-310.
- Besse J-P, Geffard O, Coquery M, (2011).** Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales. *Partenariat 2011 – Domaine substances polluantes ; Action 20 – Surveillance des substances prioritaires dans le biote*.
- Birge WJ, Black JA, Westerman AG, Short TM, Taylor SB, Bruser DM, Wallingford ED, (1985).** Recommendations on numerical values for regulating iron and chloride concentrations for the purpose of protecting warmwater species of aquatic life in the Commonwealth of Kentucky. *Memorandum of Agreement* 5429.
- BKH, (1995).** Mises à jour des données de toxicité pour quatre substances dans le cadre de MILBOWA. *Versiemaart*.
- Bleise A, Danesi PR, Burkart W, (2003).** Properties, use and health effects of depleted uranium (DU): a general overview. *J Environ Radioact* 64, 93-112.
- Blom S, Andersson TB, Förlin L, (2000).** Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17 α -hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquatic toxicology* 48, 265-274.
- Bocquené G, Galgani F, Walker C, (1997).** Les cholinestérases, biomarqueurs de neurotoxicité. *Collection Écologie, Masson, Paris*, 209-240.
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE, (2001).** Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 853-873.
- Bonga SEW, van der Meij CJM, (1989).** Degeneration and death, by apoptosis and necrosis, of the pavement and chloride cells in the gills of the teleost *Oreochromis mossambicus*. *Cell and Tissue Research* 255, 235-243.
- Bonga SW, (1997).** The stress response in fish. *Physiological reviews* 77, 591-625.
- Bony S, Gillet C, Bouchez A, Margoum C, Devaux A, (2008).** Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: field and mesocosm surveys. *Aquatic toxicology* 89, 197-203.
- Bowden TJ, (2008).** Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish Shellfish Immunol* 25, 373-383.
- Bracewell P, Cowx IG, Uglow RF, (2004).** Effects of handling and electrofishing on plasma glucose and whole blood lactate of *Leuciscus cephalus*. *Journal of Fish Biology* 64, 65-71.
- Brousseau P, Dunier M, Deschaux P, De Guise S, Krzystyniak K, Fournier M, (1997).** Marqueurs immunologiques. *L. Lagadic et al*, 287-315.
- Brydges NM, Boulcott P, Ellis T, Braithwaite VA, (2009).** Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *Applied Animal Behaviour Science* 116, 295-301.

Buckler DR, Cleveland L, Little EE, Brumbaugh WG, (1995). Survival, sublethal responses, and tissue residues of Atlantic salmon exposed to acidic pH and aluminum. *Aquatic toxicology* 31, 203-216.

Buet A, Barillet S, Camilleri V, (2005). Changes in oxidative stress parameters in fish as response to direct uranium exposure. *Radioprotection* 40, S151-S155.

Buja L, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH, (1993). Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Archives of pathology & laboratory medicine* 117, 1208-1214.

Burgeot T, Bessineton C, (1999). Des organismes sous stress. *Editions Quae*.

Burk RF, Lawrence RA, Correia MA, (1980). Sex differences in biochemical manifestations of selenium deficiency in rat liver with special reference to heme metabolism. *Biochemical pharmacology* 29, 39-42.

C

Cai L, Satoh M, Tohyama C, Cherian MG, (1999). Metallothionein in radiation exposure: its induction and protective role. *Toxicology* 132, 85-98.

Caldwell CA, Hinshaw J, (1994). Physiological and haematological responses in rainbow trout subjected to supplemental dissolved oxygen in fish culture. *Aquaculture* 126, 183-193.

Campos M, de Azevedo H, Nascimento M, Roque C, Rodgher S, (2011). Environmental assessment of water from a uranium mine (Caldas, Minas Gerais State, Brazil) in a decommissioning operation. *Environmental Earth Sciences* 62, 857-863.

Caquet T, Lagadic L, Jonot O, Baturo W, Kilanda M, Simon P, Le Bras S, Echaubard M, Ramade F, (1996). Outdoor Experimental Ponds (Mesocosms) Designed for Long-Term Ecotoxicological Studies in Aquatic Environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 34, 125-133.

Caquet T, Lagadic L, Sheffield S, (2000). Mesocosms in Ecotoxicology (1): Outdoor Aquatic Systems, in: *Ware G (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, 1-38.

Carballo M, Munoz M, (1991). Effect of sublethal concentrations of four chemicals on susceptibility of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to saprolegniosis. *Applied and environmental microbiology* 57, 1813-1816.

Carlberg I, Mannervik B, (1975). Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry* 250, 5475-5480.

CDE, (2014). Réserves d'uranium naturel dans le monde in: *énergies FdeAplcd (Ed.), Connaissance des énergies*.

Černe M, Smodiš B, Štok M, Benedik L, (2012). Radiation impact assessment on wildlife from an uranium mine area. *Nuclear engineering and design* 246, 203-209.

Chapman PM, (2007). Determining when contamination is pollution—weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environ Int* 33, 492-501.

Charissou AM, Cossu-Leguille C, Vasseur P, (2004). Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Sci Total Environ* 322, 109-122.

Chassagnard-Pinet S, (2011). Droit et normalité: appréhension et évaluation des comportements anormaux. *Vidéosurveillance et détection automatique des comportements anormaux: enjeux techniques et politiques* 1274, 119.

- Chen CY, Stemberger RS, Klaue B, Blum JD, Pickhardt PC, Folt CL, (2000).** Accumulation of heavy metals in food web components across a gradient of lakes. *Limnology and Oceanography* 45, 1525-1536.
- Chezian A, Senthamilselvan D, Suresh E, Ezhilmathy R, (2012).** Toxic effects of heavy metals (cadmium plus mercury) on haematological parameters and DNA damage in *Lates calcarifer*. *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences* 4, 156-161.
- Chilmonczyk S, Monge D, (1999).** Flow cytometry as a tool for assessment of the fish cellular immune response to pathogens. *Fish Shellfish Immunol* 9, 319-333.
- Chou H-Y, Peng T-Y, Chang S-J, Hsu Y-L, Wu J-L, (1999).** Effect of heavy metal stressors and salinity shock on the susceptibility of grouper (*Epinephelus* sp.) to infectious pancreatic necrosis virus. *Virus Research* 63, 121-129.
- Coad BW, (1981).** A bibliography of the sticklebacks (Gasterosteidae: Osteichthyes). *National Museum of Natural Sciences, National Museums of Canada*.
- Company R, Felícia H, Serafim A, Almeida A, Biscoito M, Bebianno M, (2010).** Metal concentrations and metallothionein-like protein levels in deep-sea fishes captured near hydrothermal vents in the Mid-Atlantic Ridge off Azores. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers* 57, 893-908.
- Cooley HM, Evans RE, Klaverkamp JF, (2000).** Toxicology of dietary uranium in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Aquatic toxicology* 48, 495-515.
- Cooper RU, Clough LM, Farwell MA, West TL, (2002).** Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 279, 1-20.
- Coppage DL, Matthews E, Cook GH, Knight J, (1975).** Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion, O,O-dimethyl S-(1,2-dicarbethoxyethyl) phosphorodithioate. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 5, 536-542.
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Babut M, Exinger A, Vasseur P, (1997).** Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies. *Ecotoxicol Environ Saf* 38, 122-131.
- Cotelle S, Ferard JF, (1999).** Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34, 246-255.
- Cuenco ML, Stickney RR, Grant WE, (1985).** Fish bioenergetics and growth in aquaculture ponds: II. Effects of interactions among, size, temperature, dissolved oxygen, unionized ammonia and food on growth of individual fish. *Ecological Modelling* 27, 191-206.

D

- Dalmo R, Seljelid R, (1995).** The immunomodulatory effect of LPS, laminaran and sulphated laminaran [β (1, 3)-D-glucan] on Atlantic salmon, *Salmo salar* L., macrophages *in vitro*. *Journal of Fish Diseases* 18, 175-185.
- Dalzell DJB, Macfarlane NAA, (1999).** The toxicity of iron to brown trout and effects on the gills: a comparison of two grades of iron sulphate. *Journal of Fish Biology* 55, 301-315.
- Dautremepuits C, Betoulle S, Vernet G, (2002).** Antioxidant response modulated by copper in healthy or parasitized carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1573, 4-8.

- Dautremepuits C, Paris-Palacios S, Betoulle S, Vernet G, (2004).** Modulation in hepatic and head kidney parameters of carp (*Cyprinus carpio* L.) induced by copper and chitosan. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 137, 325-333.
- Dave G, Xiu R, (1991).** Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 21, 126-134.
- De Andrade VM, da Silva J, da Silva FR, Heuser VD, Dias JF, Yoneama ML, de Freitas TRO, (2004).** Fish as bioindicators to assess the effects of pollution in two southern Brazilian rivers using the Comet assay and micronucleus test. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 44, 459-468.
- De Boeck G, Ngo TTH, Van Campenhout K, Blust R, (2003).** Differential metallothionein induction patterns in three freshwater fish during sublethal copper exposure. *Aquatic toxicology* 65, 413-424.
- De Kermoyan G, Joachim S, Baudoin P, Lonjaret M, Tebby C, Lesaulnier F, Lestremau F, Chatellier C, Akrouz Z, Pheron E, Porcher J-M, Péry ARR, Beaudouin R, (2013).** Effects of bisphenol A on different trophic levels in a lotic experimental ecosystem. *Aquatic toxicology* 144–145, 186-198.
- De la Torre FR, Salibian A, Ferrari L, (2007).** Assessment of the pollution impact on biomarkers of effect of a freshwater fish. *Chemosphere* 68, 1582-1590.
- De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan H, (2000).** Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic toxicology* 50, 51-71.
- Debnath M, Saha RK, Kamilya D, Saikia D, Saha H, (2012).** Effects of water borne iron on spawn of Indian major carps (*Catla catla* (Ham.), *Labeo rohita* (Ham.) and *Cirrhinus mrigala* (Ham.)). *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 89, 1170-1174.
- Devaux A, Flammarion P, Bernardon V, Garric J, Monod G, (1998).** Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Mar Environ Res* 46, 257-262.
- Dexiang C, Ainsworth AJ, (1991).** Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*)—II. Adaptation of anterior kidney phagocytes to 10 C. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 100, 913-918.
- Díaz-Resendiz KJG, Toledo-Ibarra GA, Girón-Pérez MI, (2015).** Modulation of Immune Response by Organophosphorus Pesticides: Fishes as a Potential Model in Immunotoxicology. *Journal of immunology research* 2015.
- Dick PT, Dixon DG, (1985).** Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *Journal of Fish Biology* 26, 475-481.
- Dorts J, Bauwin A, Kestemont P, Jolly S, Sanchez W, Silvestre F, (2012).** Proteasome and antioxidant responses in *Cottus gobio* during a combined exposure to heat stress and cadmium. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 155, 318-324.
- Dos Santos Carvalho C, de Araujo HS, Fernandes MN, (2004).** Hepatic metallothionein in a teleost (*Prochilodus scrofa*) exposed to copper at pH 4.5 and pH 8.0. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 137, 225-234.
- Dotson T, (1982).** Mortalities in trout caused by gear type and angler-induced stress. *North American Journal of Fisheries Management* 2, 60-65.
- Dunier M, Siwicki AK, Demaël A, (1991).** Effects of organophosphorus insecticides: Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*): III. *In vitro*

effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and *in vivo* effects on humoral response. *Ecotoxicol Environ Saf* 22, 79-87.

Dunier M, (1996). Water pollution and immunosuppression of freshwater fish. *Italian Journal of Zoology* 63, 303-309.

E

Eastman A, (1993). Apoptosis: a product of programmed and unprogrammed cell death. *Toxicol Appl Pharmacol* 121, 160-164.

Eaton JG, McKim JM, Holcombe GW, (1978). Metal toxicity to embryos and larvae of seven freshwater fish species—I. Cadmium. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 19, 95-103.

Echaubard M, (1995). Les animaux comme indicateurs biologiques de pollution. *Annales ANPP (France)*.

El-Boshy M, Taha R, (2011). Effects of mercuric chloride on the immunological, hematological, biochemical parameters and diseases resistance of Nile Tilapia challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Nat Sci* 9, 7-15.

El Azzouzi B, Tsangaris GT, Pellegrini O, Manuel Y, Benveniste J, Thomas Y, (1994). Cadmium induced apoptosis in a human T cell line. *Toxicology* 88, 127-139.

Ellman GL, Courtney KD, Featherstone RM, (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology* 7, 88-95.

Elsasser M, Roberson B, Hetrick F, (1986). Effects of metals on the chemiluminescent response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) phagocytes. *Vet Immunol Immunopathol* 12, 243-250.

Engel DW, Brouwer M, (1989). Metallothionein and metallothionein-like proteins: physiological importance, *Advances in Comparative and environmental Physiology*. Springer, 53-75.

Engelsma MY, Hougee S, Nap D, Hofenk M, Rombout JH, van Muiswinkel WB, Lidy Verburg-van Kemenade B, (2003). Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish Shellfish Immunol* 15, 397-410.

Esteve C, Alcaide E, Ureña R, (2012). The effect of metals on condition and pathologies of European eel (*Anguilla anguilla*): *In situ* and laboratory experiments. *Aquatic toxicology* 109, 176-184.

European-Commission, (2003). Technical guidance document on risk assessment, part II. *European Communities*, 1-337.

Eyckmans M, Celis N, Horemans N, Blust R, De Boeck G, (2011). Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species. *Aquat Toxicol* 103, 112-120.

F

Falfushynska HI, Gnatyshyna LL, Stoliar OB, Nam YK, (2011). Various responses to copper and manganese exposure of *Carassius auratus gibelio* from two populations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 154, 242-253.

Farina M, Avila DS, da Rocha JBT, Aschner M, (2013). Metals, oxidative stress and neurodegeneration: a focus on iron, manganese and mercury. *Neurochemistry international* 62, 575-594.

- Favier A, (2003). Le stress oxydant. *L'actualité chimique*, 108-115.
- Fernandez-Davila ML, Razo-Estrada AC, Garcia-Medina S, Gomez-Olivan LM, Pinon-Lopez MJ, Ibarra RG, Galar-Martinez M, (2012). Aluminum-induced oxidative stress and neurotoxicity in grass carp (Cyprinidae-*Ctenopharingodon idella*). *Ecotoxicol Environ Saf* 76, 87-92.
- Ferreira M, Antunes P, Gil O, Vale C, Reis-Henriques MA, (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, 347-357.
- Ferreira M, Caetano M, Costa J, Pousao-Ferreira P, Vale C, Reis-Henriques MA, (2008). Metal accumulation and oxidative stress responses in, cultured and wild, white seabream from Northwest Atlantic. *Sci Total Environ* 407, 638-646.
- Filipović V, Raspur B, (2003). Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea. *Water research* 37, 3253-3262.
- Fischer BB, Pomati F, Eggen RI, (2013). The toxicity of chemical pollutants in dynamic natural systems: the challenge of integrating environmental factors and biological complexity. *Sci Total Environ* 449, 253-259.
- Fitzgerald JP, (1992). Comparative analysis of superoxide dismutase activitiw in a range of temperate and tropical teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 101, 111-114.
- Flammarion P, Devaux A, Garric J, (2001). Marqueurs biochimiques de pollution dans les ecosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*, 209-226.
- Flaten TP, Wakayama I, Sturm MJ, Kretser W, Capone S, Dudones T, Bath DW, Gallagher J, Moore W, Garruto RM, (1993). Natural models of aluminium toxicity in fish from acid-rain lakes. *Advances in the biosciences - Oxford* 87, 253-253.
- Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM, (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Science of the Total Environment* 317, 207-233.
- Forbes VE, Forbes TL, (1997). Ecotoxicologie: théorie et applications. *Editions Quae*.
- Forbes VE, Palmqvist A, Bach L, (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental toxicology and chemistry* 25, 272-280.
- Förstner U, Wittmann GTW, (2012). Metal pollution in the aquatic environment. *Springer Science & Business Media*.
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P, (2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist* 40, 412-420.
- Fulton MH, Key PB, (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental toxicology and chemistry* 20, 37-45.
- Fulton TW, (1902). Rate of growth of sea fishes. *Neill & Company*.

_ G _

- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, Renault T, (2006). Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry. *Cell biology and toxicology* 22, 1-14.

- Gagnaire B, Bado-Nilles A, Sanchez W, (2014).** Depleted uranium disturbs Immune parameters in zebrafish, *Danio rerio*: an *ex vivo/in vivo* experiment. *Archives of environmental contamination and toxicology* 67, 426-435.
- Gagnaire B, Bado-Nilles A, Betoulle S, Amara R, Camilleri V, Cavalié I, Chadili E, Delahaut L, Kerambrun E, Orjollet D, Palluel O, Sanchez W, (2015).** Former uranium mine-induced effects in caged roach: a multiparametric approach for the evaluation of *in situ* metal toxicity. *Ecotoxicology* 24, 215-231.
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH, (2004).** Ecosystem management bioindicators: the ECOMAN project – a multi-biomarker approach to ecosystem management. *Mar Environ Res* 58, 233-237.
- Garcia-Medina S, Razo-Estrada C, Galar-Martinez M, Cortez-Barberena E, Gomez-Olivan LM, Alvarez-Gonzalez I, Madrigal-Bujaidar E, (2011).** Genotoxic and cytotoxic effects induced by aluminum in the lymphocytes of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 153, 113-118.
- Garnier-Laplace J, Colle C, Morello M, (2001).** Fiche radionucléide environnement. Uranium naturel et environnement, IRSN.
- Geffard O, Ferrari B, Chaumot A, Montuelle B, (2010).** Les expérimentations *in situ*: principes et perspectives. *Sciences Eaux & Territoires*, 20-25.
- GEP, (2010).** Recommandations pour la gestion des anciens sites miniers d'uranium en France. Des sites du Limousin aux autres sites du court aux moyen et long termes, in: Limousin Gdeplmdud (Ed.).
- Gerwick L, Steinhauer R, Lapatra S, Sandell T, Ortuno J, Hajiseyedjavadi N, Bayne CJ, (2002).** The acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma proteins to viral, bacterial and fungal inflammatory agents. *Fish Shellfish Immunol* 12, 229-242.
- Ghanmi Z, Rouabhia M, Alifuddin M, Troutaud D, Deschaux P, (1990).** Modulatory effect of metal ions on the immune response of fish: *In vivo* and *in vitro* influence of $MnCl_2$ on NK activity of carp pronephros cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 20, 241-245.
- Gill TS, Bianchi CP, Epple A, (1992).** Trace metal (Cu and Zn) adaptation of organ systems of the American eel, *Anguilla rostrata*, to external concentrations of cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 102, 361-371.
- Goyer RA, Clarkson TW, (1996).** Toxic effects of metals. *Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons, Fifth Edition, Klaassen, CD [Ed]. McGraw-Hill Health Professions Division, ISBN 71054766.*
- GrapLimousin, (2007).** Mesures des pesticides en Limousin. Bilan du suivi 2007.
- Grue CE, Gardner SC, Gibert PL, (2002).** On the significance of pollutant-induced alterations in the behaviour of fish and wildlife. *Chichester: John Wiley & Sons.*
- Grundy MM, Moore MN, Howell SM, Ratcliffe NA, (1996).** Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons, in haemocytes of *Mytilus edulis*. *Aquatic toxicology* 34, 273-290.
- Guedri H, (2010).** Mise au point de biocapteurs basés sur la mesure d'activités enzymatiques de cellules algales pour la surveillance des milieux aquatiques. *Thèse de doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon.*
- Gustaveson AW, Wydoski RS, Wedemeyer GA, (1991).** Physiological response of largemouth bass to angling stress. *Transactions of the American Fisheries Society* 120, 629-636.

H

- Halliwell B, (1994).** Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews* 52, 253-265.
- Hang BT, Milla S, Gillardin V, Phuong NT, Kestemont P, (2013).** *In vivo* effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish Shellfish Immunol* 34, 339-347.
- Hardie LJ, Fletcher TC, Secombes CJ, (1994).** Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Developmental & Comparative Immunology* 18, 57-66.
- Harford AJ, O'Halloran K, Wright PF, (2006).** Flow cytometric analysis and optimisation for measuring phagocytosis in three Australian freshwater fish. *Fish Shellfish Immunol* 20, 562-573.
- Hart P, Gill A, (1994).** Evolution of foraging behaviour in the threespine stickleback. *The evolutionary biology of the threespine stickleback*, 207-239.
- Hayet A, Deram A, Couffignal B, (2009).** Évaluation des risques écologiques (ERE): vers une harmonisation des méthodes et des outils à l'échelle européenne. *Environnement, Risques & Santé* 8, 137-147.
- Hedayati A, Hoseini SM, Ghelichpour M, (2014).** Acute toxicity of waterborne manganese to *Rutilus caspicus* (Yakovlev, 1870)–gill histopathology, immune indices, oxidative condition, and saltwater resistance. *Toxicological & Environmental Chemistry* 96, 1535-1545.
- Heier LS, Teien HC, Oughton D, Tollefsen KE, Olsvik PA, Rosseland BO, Lind OC, Farmen E, Skipperud L, Salbu B, (2013).** Sublethal effects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to mixtures of copper, aluminium and gamma radiation. *J Environ Radioact* 121, 33-42.
- Herlory O, Bonzom JM, Gilbin R, Frelon S, Fayolle S, Delmas F, Coste M, (2013).** Use of diatom assemblages as biomonitor of the impact of treated uranium mining effluent discharge on a stream: case study of the Ritord watershed (Center-West France). *Ecotoxicology* 22, 1186-1199.
- Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB, (1998).** Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 120, 437-448.
- Hinck JE, Blazer VS, Denslow ND, Echols KR, Gale RW, Wieser C, May TW, Ellersieck M, Coyle JJ, Tillitt DE, (2008).** Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from rivers in the Southeastern United States. *Sci Total Environ* 390, 538-557.
- Hoffman DJ, (2002).** Role of selenium toxicity and oxidative stress in aquatic birds. *Aquatic toxicology* 57, 11-26.
- Holdway D, (1992).** Uranium toxicity to two species of Australian tropical fish. *Science of the Total Environment* 125, 137-158.
- Holm G, Lundström J, Andersson T, Norrgren L, (1994).** Influences of halogenated organic substances on ovarian development and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquatic toxicology* 29, 241-256.
- Holsapple M, (2002).** Developmental immunotoxicology and risk assessment: a workshop summary. *Human & experimental toxicology* 21, 473-478.
- Holtzman E, (2013).** Lysosomes. *Springer Science & Business Media*.

- Honda K, Sahrul M, Hidaka H, Tatsukawa R, (1983).** Organ and tissue distribution of heavy metals, and their growth-related changes in Antarctic fish, *Pagothenia borchgrevinki*. *Agricultural and Biological Chemistry* 47, 2521-2532.
- Hong J-R, Lin T-L, Hsu Y-L, Wu J-L, (1998).** Apoptosis precedes necrosis of fish cell line with infectious pancreatic necrosis virus infection. *Virology* 250, 76-84.
- Hoole D, Lewis J, Schuwerack P, Chakravarthy C, Shrive A, Greenhough T, Cartwright J, (2003).** Inflammatory interactions in fish exposed to pollutants and parasites: a role for apoptosis and C reactive protein. *Parasitology* 126, S71-S85.
- Hopkin S, (1993).** *In situ* biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. *Handbook of ecotoxicology*, 397-427.
- Horns F, Hood ME, (2012).** The evolution of disease resistance and tolerance in spatially structured populations. *Ecology and evolution* 2, 1705-1711.
- Hubert-Vincent F, (2007).** Diversité génétique et adaptation des espèces aquatiques en milieu anthropisé.
- Hudcova H, Badurova J, Rozkosny M, Sova J, Funkova R, Svobodova J, (2013).** Quality and mutagenicity of water and sediment of the streams impacted by the former uranium mine area Olsi-Drahonin (Czech Republic). *J Environ Radioact* 116, 159-165.
- Huggett RJ, Kimerle RA, Mehrle Jr PM, Bergman HL, (1992).** Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. *Lewis Publishers Boca Raton, FL*.
- Hulbert A, Pamplona R, Buffenstein R, Buttemer W, (2007).** Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological reviews* 87, 1175-1213.
- Hulbert AJ, Faulks SC, Buffenstein R, (2006).** Oxidation-Resistant Membrane Phospholipids Can Explain Longevity Differences Among the Longest-Living Rodents and Similarly-Sized Mice. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* 61, 1009-1018.
- Huntingford FA, Chellappa S, Taylor AC, Strang RHC, (2001).** Energy reserves and reproductive investment in male three-spined sticklebacks, *Gasterosteus aculeatus*. *Ecology of Freshwater Fish* 10, 111-117.

I

- Imre I, McLaughlin R, Noakes D, (2002).** Phenotypic plasticity in brook charr: changes in caudal fin induced by water flow. *Journal of Fish Biology* 61, 1171-1181.
- IRSN, (2007a).** Expertise globale du bilan décennal environnemental d'AREVA NC. 2^{ème} partie : Impact environnemental à l'échelle des bassins versants et évaluation de la surveillance. *Direction de l'environnement et de l'intervention DEI/SARG/2007-042*.
- IRSN, (2007b).** Inventaire national des sites miniers d'uranium v2. *Mémoire et Impact des Mines d'urAniUm : Synthèse et Archives (programme MIMAUSA)*.
- IRSN, (2009).** Fiche n°1 : l'extraction de l'uranium en France : données et chiffres clés. *L'exploitation du minerai d'uranium en France métropolitaine : impact environnemental et risque pour la population*.

J

- Janero DR, (1990).** Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9, 515-540.

- Johansson A-C, Appelqvist H, Nilsson C, Kågedal K, Roberg K, Öllinger K, (2010). Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis* 15, 527-540.
- Jolly S, Bado-Nilles A, Lamand F, Turies C, Chadili E, Porcher JM, Betoulle S, Sanchez W, (2012). Multi-biomarker approach in wild European bullhead, *Cottus* sp., exposed to agricultural and urban environmental pressures: practical recommendations for experimental design. *Chemosphere* 87, 675-683.
- Jolly S, Jaffal A, Delahaut L, Palluel O, Porcher J-M, Geffard A, Sanchez W, Betoulle S, (2014). Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 13103-13117.
- Jones J, Reynolds J, (1997). Effects of pollution on reproductive behaviour of fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 463-491.
- Julliard AK, Saucier D, Astic L, (1996). Time-course of apoptosis in the olfactory epithelium of rainbow trout exposed to a low copper level. *Tissue and Cell* 28, 367-377.
- Jüttner I, Peither A, Lay JP, Kettrup A, Ormerod SJ, (1995). An outdoor mesocosm study to assess ecotoxicological effects of atrazine on a natural plankton community. *Archives of environmental contamination and toxicology* 29, 435-441.

K

- Katsiadaki I, (2006). The use of the stickleback as a sentinel and model species in ecotoxicology. *Biology of the three-spined stickleback*, 319.
- Katsiadaki I, Morris S, Squires C, Hurst MR, James JD, Scott AP, (2006). Use of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) as a sensitive *in vivo* test for detection of environmental antiandrogens. *Environmental health perspectives* 114, 115.
- Kelly JM, Janz DM, (2009). Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. *Aquat Toxicol* 92, 240-249.
- Kerambrun E, Henry F, Perrichon P, Courcot L, Meziane T, Spilmont N, Amara R, (2012). Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquat Toxicol* 108, 130-140.
- 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.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR, (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26, 239.
- Khargarot BS, Rathore RS, (1999). Copper exposure reduced the resistance of the catfish *Saccobranchus fossilis* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 62, 490-495.
- Khargarot BS, Rathore RS, Tripathi DM, (1999). Effects of chromium on humoral and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in a freshwater catfish, *Saccobranchus fossilis* (Bloch). *Ecotoxicol Environ Saf* 43, 11-20.
- Klaverkamp JF, Baron CL, Fallis BW, Ranson CR, Wautier KG, Vanriel P, (2002). Metals and metallothionein in fishes and metals in sediments from lakes impacted by uranium mining and milling in northern Saskatchewan. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2420, 72p.

- Knittel M, (1981).** Susceptibility of steelhead trout *Salmo gairdneri* Richardson to redmouth infection *Yersinia ruckeri* following exposure to copper. *Journal of Fish Diseases* 4, 33-40.
- Kosower NS, (1978).** The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 53, 109-159.
- Kouassi É, Revillard J, Fournier M, Ayotte P, Roy R, Brousseau P, Hadji L, Gérin M, Gosselin P, Cordier S, (2003).** Système immunitaire. *Environnement et santé publique: Fondements et pratiques*.
- Kozinska A, Guz L, (2004).** The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol* 16, 437-445.
- Kraemer LD, Evans D, (2012).** Uranium bioaccumulation in a freshwater ecosystem: impact of feeding ecology. *Aquat Toxicol* 124-125, 163-170.
- Krzystyniak K, Tryphonas H, Fournier M, (1995).** Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environmental health perspectives* 103, 17.
- Kumar P, Prasad Y, Patra AK, Ranjan R, Swarup D, Patra RC, Pal S, (2009).** Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish (*Clarias batrachus*). *Science of the Total Environment* 407, 5024-5030.
- Kumar PA, Rajagopal G, (2003).** Lipid peroxidation in erythrocytes of patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian journal of clinical biochemistry* 18, 71-74.
- Kumari J, Sahoo PK, Swain T, Sahoo SK, Sahu AK, Mohanty BR, (2006).** Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. *Aquaculture* 252, 121-127.

L

- Lagadic L, Caquet T, Amiard J, (1997).** Biomarqueurs en écotoxicologie: principes et définitions. *L. Lagadic, T. Caquet, JC Amiard and F. Ramade, Editors, Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux, Masson, Paris, 1-9.*
- Lankoff A, Banasik A, Duma A, Ochniak E, Lisowska H, Kuszewski T, Gozdz S, Wojcik A, (2006).** A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicol Lett* 161, 27-36.
- 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* 21, 2705-2712.
- Larson GL, (1976).** Social behavior and feeding ability of two phenotypes of *Gasterosteus aculeatus* in relation to their spatial and trophic segregation in a temperate lake. *Canadian Journal of Zoology* 54, 107-121.
- Le Roux G, (2007).** Radionucléides naturels en France. Approche géochimique de la variabilité des radionucléides naturels d'origine tellurique (40K et chaînes U-Th) dans les sols et sédiments fluviaux. *Rapport IRSN/DEI/SESURE 2007-21.*
- Lee RF, Steinert S, (2003).** Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 43-64.
- Lemasters JJ, Nieminen A-L, Qian T, Trost LC, Elmore SP, Nishimura Y, Crowe RA, Cascio WE, Bradham CA, Brenner DA, Herman B, (1998).** The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1366, 177-196.

- Lim C, Klesius PH, (1997). Responses of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) fed iron-deficient and replete diets to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 157, 83-93.
- Lim C, Klesius PH, Li MH, Robinson EH, (2000). Interaction between dietary levels of iron and vitamin C on growth, hematology, immune response and resistance of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) to *Edwardsiella ictaluri* challenge. *Aquaculture* 185, 313-327.
- Lind D, Alto K, Chatterton S, (1978). Regional copper-nickel study: Aquatic toxicology study. *Minnesota Environmental Quality Board, St. Paul, MN, USA*.
- Lind OC, Stegnar P, Tolongutov B, Rosseland BO, Stromman G, Uralbekov B, Usubalieva A, Solomatina A, Gwynn JP, Lespukh E, Salbu B, (2013). Environmental impact assessment of radionuclide and metal contamination at the former U site at Kadji Sai, Kyrgyzstan. *J Environ Radioact* 123, 37-49.
- Linde-Arias AR, Inacio AF, Novo LA, de Albuquerque C, Moreira JC, (2008). Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraiba do Sul. *Environ Pollut* 156, 974-979.
- Ling KH, Sin YM, Lam TJ, (1993). Effect of copper sulphate on ichthyophthiriasis (white spot disease) in goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 118, 23-35.
- Lozano J, Vera Tomé F, Gómez Escobar V, Blanco Rodriguez P, (2000). Radiological characterization of a uranium mine with no mining activity. *Applied Radiation and Isotopes* 53, 337-343.
- Lund V, Olafsen JA, (1999). Changes in serum concentration of a serum amyloid P-like pentraxin in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., during infection and inflammation. *Developmental & Comparative Immunology* 23, 61-70.
- Luoma SN, (1983). Bioavailability of trace metals to aquatic organisms — A review. *Science of the Total Environment* 28, 1-22.
- Lushchak VI, Lushchak LP, Mota AA, Hermes-Lima M, (2001). Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation.
- Lushchak VI, Bagnyukova TV, Husak VV, Luzhna LI, Lushchak V, Storey KB, (2005a). Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1670-1680.
- Lushchak VI, Bagnyukova TV, Lushchak V, Storey JM, Storey KB, (2005b). Hypoxia and recovery perturb free radical processes and antioxidant potential in common carp (*Cyprinus carpio*) tissues. *The international journal of biochemistry & cell biology* 37, 1319-1330.
- Lushchak VI, Bagnyukova TV, (2007). Hypoxia induces oxidative stress in tissues of a goby, the rotan *Perccottus glenii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 148, 390-397.
- Lushchak VI, (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic toxicology* 101, 13-30.

M

- Maceda-Veiga A, Monroy M, Navarro E, Viscor G, de Sostoa A, (2013). Metal concentrations and pathological responses of wild native fish exposed to sewage discharge in a Mediterranean river. *Sci Total Environ* 449, 9-19.
- MacFarlane RD, Bullock GL, McLaughlin JJA, (1986). Effects of five metals on susceptibility of striped bass to *Flexibacter columnaris*. *Transactions of the American Fisheries Society* 115, 227-231.

- MacKenzie S, Balasch JC, Novoa B, Ribas L, Roher N, Krasnov A, Figueras A, (2008).** Comparative analysis of the acute response of the trout, *O. mykiss*, head kidney to in vivo challenge with virulent and attenuated infectious hematopoietic necrosis virus and LPS-induced inflammation. *Bmc Genomics* 9, 141.
- MacLeod JC, Pessah E, (1973).** Temperature effects on mercury accumulation, toxicity, and metabolic rate in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Board of Canada* 30, 485-492.
- Magnadottir B, (2006).** Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 20, 137-151.
- Marchi B, Burlando B, Moore MN, Viarengo A, (2004).** Mercury-and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on [Ca²⁺] i dependent phospholipase A2 activation. *Aquatic toxicology* 66, 197-204.
- Marcogliese DJ, Brambilla LG, Gagne F, Gendron AD, (2005).** Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Dis Aquat Organ* 63, 77-84.
- Margerit A, Lecomte-Pradines C, Svendsen C, Frelon S, Gomez E, Gilbin R, (2015).** Nested interactions in the combined toxicity of uranium and cadmium to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicol Environ Saf* 118, 139-148.
- Maria V, Ahmad I, Oliveira M, Serafim A, Bebianno M, Pacheco M, Santos M, (2009).** Wild juvenile *Dicentrarchus labrax* L. liver antioxidant and damage responses at Aveiro Lagoon, Portugal. *Ecotoxicol Environ Saf* 72, 1861-1870.
- Markert B, Wünschmann S, Herzig R, Quevauviller P, (2010).** Bioindicateurs et biomoniteurs: Définitions, stratégies et applications. *French Lang Technol Paris P* 4, 1-16.
- Markich SJ, Brown PL, Jeffree RA, (1996).** The use of geochemical speciation modelling to predict the impact of uranium to freshwater biota. *Radiochimica Acta* 74, 321-326.
- Marques SM, Goncalves F, Pereira R, (2008).** Effects of a uranium mine effluent in the early-life stages of *Rana perezi* Seoane. *Sci Total Environ* 402, 29-35.
- Marques SM, Chaves S, Goncalves F, Pereira R, (2013).** Evaluation of growth, biochemical and bioaccumulation parameters in *Pelophylax perezi* tadpoles, following an *in-situ* acute exposure to three different effluent ponds from a uranium mine. *Sci Total Environ* 445-446, 321-328.
- Marquis O, Miaud C, Ficetola GF, Boscher A, Mouchet F, Guittonneau S, Devaux A, (2009).** Variation in genotoxic stress tolerance among frog populations exposed to UV and pollutant gradients. *Aquat Toxicol* 95, 152-161.
- Marshall S, Elliott M, (1998).** Environmental influences on the fish assemblage of the Humber estuary, UK. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 46, 175-184.
- Martínez-Álvarez R, Morales A, Sanz A, (2005).** Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15, 75-88.
- Mathews T, Beaugelin-Seiller K, Garnier-Laplace J, Gilbin R, Adam C, Della-Vedova C, (2009).** A probabilistic assessment of the chemical and radiological risks of chronic exposure to uranium in freshwater ecosystems. *Environmental Science & Technology* 43, 6684-6690.
- Mbakwiravyo DK, (2009).** Adaptations aux facteurs écologiques, Notes d'écologie générale.
- McCairns R, Bernatchez L, (2010).** Adaptive divergence between freshwater and marine sticklebacks: insights into the role of phenotypic plasticity from an integrated analysis of candidate gene expression. *Evolution* 64, 1029-1047.
- McCarthy JF, Shugart LR, (1990).** Biomarkers of environmental contamination.
- Meister A, Anderson ME, (1983).** Glutathione. *Annual review of biochemistry* 52, 711-760.

- Mesa MG, Schreck CB, (1989).** Electrofishing mark–recapture and depletion methodologies evoke behavioral and physiological changes in cutthroat trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 118, 644-658.
- Météo-France, (2015).** Bilan climatique définitif de l'année 2014.
- Meyer JN, Di Giulio RT, (2003).** heritable adaptation and fitness costs in killfish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a polluted estuary. *Ecological Applications* 13, 490-503.
- Michiels C, Raes M, Toussaint O, Remacle J, (1994).** Importance of Se-glutathione peroxidase, catalase, and Cu/Zn-SOD for cell survival against oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine* 17, 235-248.
- Mieiro C, Pereira M, Duarte A, Pacheco M, (2011).** Brain as a critical target of mercury in environmentally exposed fish (*Dicentrarchus labrax*) - Bioaccumulation and oxidative stress profiles. *Aquatic toxicology* 103, 233-240.
- Miller GG, Sweet LI, Adams JV, Omann GM, Passino-Reader DR, Meier PG, (2002).** *In vitro* toxicity and interactions of environmental contaminants (Arochlor 1254 and mercury) and immunomodulatory agents (lipopolysaccharide and cortisol) on thymocytes from lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Fish Shellfish Immunol* 13, 11-26.
- Minéralinfo, (2013).** Minerais et métaux, in: Ministère de l'économie dliedn (Ed.).
- Mitchelmore C, Chipman J, (1998).** DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399, 135-147.
- Monaghan P, Metcalfe NB, Torres R, (2009).** Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters* 12, 75-92.
- Monette MY, McCormick SD, (2008).** Impacts of short-term acid and aluminum exposure on Atlantic salmon (*Salmo salar*) physiology: a direct comparison of parr and smolts. *Aquatic toxicology* 86, 216-226.
- Moore MN, Lowe D, Köhler A, (2004).** Biological effects of contaminants: measurement of lysosomal membrane stability. *International Council for the Exploration of the Sea*.
- Morales AE, Pérez-Jiménez A, Carmen Hidalgo M, Abellán E, Cardenete G, (2004).** Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 139, 153-161.
- Morcillo Y, Borghi V, Porte C, (1997).** Survey of organotin compounds in the Western Mediterranean using molluscs and fish as sentinel organisms. *Archives of environmental contamination and toxicology* 32, 198-203.
- Morrison DC, Duncan Jr RL, Goodman S, (1984).** *In vivo* biological activities of endotoxin. *Progress in clinical and biological research* 189, 81-99.
- Mukherjee AK, Ghosal SK, Maity CR, (1997).** Lysosomal membrane stabilization by α -tocopherol against the damaging action of *Vipera russelli* venom phospholipase A2. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 53, 152-155.
- Münzing J, (1963).** The evolution of variation and distributional patterns in European populations of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Evolution*, 320-332.

N

- Nagae M, Ogawa K, Kawahara A, Yamaguchi M, Nishimura T, Ito F, (2001).** Effect of acidification stress on endocrine and immune functions in carp, *Cyprinus carpio*. *Water, Air, and Soil Pollution* 130, 893-898.

- Nayak S, Swain P, Nanda P, Dash S, Shukla S, Meher P, Maiti N, (2008).** Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol* 24, 394-399.
- Ndong D, Chen Y-Y, Lin Y-H, Vaseeharan B, Chen J-C, (2007).** The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures. *Fish Shellfish Immunol* 22, 686-694.
- Neumann NF, Stafford JL, Barreda D, Ainsworth AJ, Belosevic M, (2001).** Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 807-825.
- Newman MC, Jagoe CH, (1994).** Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. *Bioavailability: Physical, Chemical and Biological Interactions*. CRC Press, Inc. Boca Raton, FL.
- Nieto JM, Sarmiento AM, Olías M, Canovas CR, Riba I, Kalman J, Delvalls TA, (2007).** Acid mine drainage pollution in the Tinto and Odiel rivers (Iberian Pyrite Belt, SW Spain) and bioavailability of the transported metals to the Huelva Estuary. *Environ Int* 33, 445-455.
- Nikoskelainen S, Bylund G, Lilius EM, (2004).** Effect of environmental temperature on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) innate immunity. *Dev Comp Immunol* 28, 581-592.
- Nimmo IA, (1987).** The glutathione S-transferases of fish. *Fish Physiol Biochem* 3, 163-172.
- Nordberg GF, Fowler BA, Nordberg M, (2014).** Handbook on the toxicology of metals. Academic Press.

_ O _

- OCDE, (2011).** Ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques - Essai de développement sexuel des poissons. *OCDE*.
- OECD, (2000).** Eleventh addendum to the OECD guidelines for testing of chemicals. *OECD Publishing*.
- Oikari A, (2006).** Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic toxicology* 78, 370-381.
- Oliva M, Jose Vicente J, Gravato C, Guilhermino L, Dolores Galindo-Riano M, (2012a).** Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial variation. *Ecotoxicol Environ Saf* 75, 151-162.
- Oliva M, Perales JA, Gravato C, Guilhermino L, Galindo-Riano MD, (2012b).** Biomarkers responses in muscle of Senegal sole (*Solea senegalensis*) from a heavy metals and PAHs polluted estuary. *Mar Pollut Bull* 64, 2097-2108.
- Olson D, Christensen G, (1980).** Effects of water pollutants and other chemicals on fish acetylcholinesterase (*in vitro*). *Environmental Research* 21, 327-335.
- Olsson P, (1996).** Metallothioneins in fish: induction and use in environmental monitoring, Seminar series-society for experimental biology. *Cambridge University Press*, 187-204.
- Olsvik PA, Gundersen P, Andersen RA, Zachariassen KE, (2000).** Metal accumulation and metallothionein in two populations of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to different natural water environments during a run-off episode. *Aquatic toxicology* 50, 301-316.
- Olsvik PA, Kristensen T, Waagbø R, Rosseland BO, Tollefsen KE, Baeverfjord G, Berntssen MHG, (2005).** mRNA expression of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GSH-Px) and lipid peroxidative stress in liver of Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to hyperoxic water during

smoltification. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 141, 314-323.

Orun I, Talas ZS, Ozdemir I, Alkan A, Erdogan K, (2008). Antioxidative role of selenium on some tissues of (Cd 2+, Cr 3+)-induced rainbow trout. *Ecotoxicol Environ Saf* 71, 71-75.

P

Pandey S, Parvez S, Sayeed I, Haque R, Bin-Hafeez B, Raisuddin S, (2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish Wallago attu (Bl. & Schn.). *Science of the Total Environment* 309, 105-115.

Papa S, Skulachev VP, (1997). Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 174, 305-319.

Parihar MS, Dubey AK, (1995). Lipid peroxidation and ascorbic acid status in respiratory organs of male and female freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to temperature increase. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 112, 309-313.

Parihar MS, Javeri T, Hemnani T, Dubey AK, Prakash P, (1997). Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology* 22, 151-156.

Parkhurst BR, Elder RG, Meyer JS, Sanchez DA, Pennak RW, Waller WT, (1984). An environmental hazard evaluation of uranium in a Rocky Mountain stream. *Environmental toxicology and chemistry* 3, 113-124.

Partridge GJ, Lymbery AJ, (2009). Effects of manganese on juvenile mulloway (*Argyrosomus japonicus*) cultured in water with varying salinity - Implications for inland mariculture. *Aquaculture* 290, 311-316.

Payne J, Andrews C, Fancey L, French B, Lee K, (2011). Risks to fish associated with barium in drilling fluids and produced water: A chronic toxicity study with cunner (*Tautoglabrus adspersus*), in: Lee K, Neff J (Eds.), *Produced Water*. Springer New York, 401-417.

Payne JF, Mathieu A, Melvin W, Fancey LL, (1996). Acetylcholinesterase, an old biomarker with a new future? Field trials in association with two urban rivers and a paper mill in Newfoundland. *Mar Pollut Bull* 32, 225-231.

Peakall D, (1992). Animal biomarkers as pollution indicators. *Springer Science & Business Media*.

Pearl, (2009). Contrôles inopinés - Corrèze, novembre 2009. *Pôle d'expertises et d'analyses radioactives Limousin*.

Pellerin-Massicotte J, Tremblay R, (1998). La fragilité lysosomale en tant que biomarqueur cytologique. *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, 225-242.

Pelletier E, Campbell PGC, Denizeau F, (2004). Écotoxicologie moléculaire: Principes fondamentaux et perspectives de développement. *PUQ*.

Pereira R, Pereira ML, Ribeiro R, Goncalves F, (2006). Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environ Pollut* 139, 561-575.

Picchitti S, Scapigliati G, Fanelli M, Barbato F, Canese S, Mastrolla L, Mazzini M, Abelli L, (2001). Sex-related variations of serum immunoglobulins during reproduction in gilthead sea bream

and evidence for a transfer from the female to the eggs. *Journal of Fish Biology* 59, 1503-1511.

Pickering AD, Pottinger TG, Christie P, (1982). Recovery of the brown trout, *Salmo trutta* L., from acute handling stress: a time-course study. *Journal of Fish Biology* 20, 229-244.

Piechotta G, Lacorn M, Lang T, Kammann U, Simat T, Jenke H-S, Steinhart H, (1999). Apoptosis in dab (*Limanda limanda*) as possible new biomarker for anthropogenic stress. *Ecotoxicol Environ Saf* 42, 50-56.

Pinto MMSC, Silva MMVG, Neiva AMR, (2004). Pollution of water and stream sediments associated with the Vale De Abrutiga uranium mine, Central Portugal. *Mine Water and the Environment* 23, 66-75.

Playle RC, (1998). Modelling metal interactions at fish gills. *Science of the Total Environment* 219, 147-163.

Poléo A, (1995). Aluminium polymerization—a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic toxicology* 31, 347-356.

Pottinger T, Carrick T, Yeomans W, (2002). The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish Biology* 61, 207-229.

Pottinger TG, Henrys PA, Williams RJ, Matthiessen P, (2013). The stress response of three-spined sticklebacks is modified in proportion to effluent exposure downstream of wastewater treatment works. *Aquat Toxicol* 126, 382-392.

Preston S, Coad N, Townend J, Killham K, Paton GI, (2000). Biosensing the acute toxicity of metal interactions: Are they additive, synergistic, or antagonistic? *Environmental toxicology and chemistry* 19, 775-780.

Purdey M, (2004). Chronic barium intoxication disrupts sulphated proteoglycan synthesis: a hypothesis for the origins of multiple sclerosis. *Medical hypotheses* 62, 746-754.

Pyle G, Swanson S, Lehmkuhl D, (2002). Toxicity of uranium mine receiving waters to early life stage fathead minnows (*Pimephales promelas*) in the laboratory. *Environmental Pollution* 116, 243-255.

Pyle GG, Rajotte JW, Couture P, (2005). Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicol Environ Saf* 61, 287-312.

Q

Qu R, Feng M, Wang X, Qin L, Wang C, Wang Z, Wang L, (2014). Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following *in vivo* exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat Toxicol* 150, 9-16.

R

Ramade F, (2009). *Éléments d'écologie: Ecologie fondamentale-4e édition.* Dunod.

Rana SVS, (2008). Metals and apoptosis: recent developments. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 22, 262-284.

Rand GM, Wells PG, McCarty LS, (1995). Introduction to aquatic toxicology. *Fundamentals of aquatic toxicology effects, environmental fate, and risk assessment.* Taylor and Francis Publishers, North Palm Beach, Florida, USA, 3-67.

- Regoli F, Principato G, (1995).** Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers. *Aquatic toxicology* 31, 143-164.
- Regoli F, Nigro M, Orlando E, (1998).** Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Aquatic toxicology* 40, 375-392.
- Revillard J-P, (2001).** Immunologie. *De Boeck Supérieur*.
- Ribeiro CA, Vollaire Y, Sanchez-Chardi A, Roche H, (2005).** Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquat Toxicol* 74, 53-69.
- Ribera D, Labrot F, Tisnerat G, Narbonne J-F, (1996).** Uranium in the environment: occurrence, transfer, and biological effects, *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer, 53-89.
- Ritola O, Livingstone DR, Peters LD, Lindström-Seppä P, (2002a).** Antioxidant processes are affected in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to ozone and oxygen-supersaturated water. *Aquaculture* 210, 1-19.
- Ritola O, Peters LD, Livingston DR, Lindström-Seppä P, (2002b).** Antioxidant enzymes and glutathione defense system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) red blood cells exposed to ozone and oxygen *in vitro*. *Aquacult. Res* 33, 165-175.
- Roales RR, Perlmutter A, (1977).** The effects of sub-lethal doses of methylmercury and copper, applied singly and jointly, on the immune response of the blue gourami (*Trichogaster trichopterus*) to viral and bacterial antigens. *Archives of environmental contamination and toxicology* 5, 325-331.
- Roberts MH, Sved DW, Felton SP, (1987).** Temporal changes in AHH and SOD activities in feral spot from the Elizabeth River, a polluted sub-estuary. *Mar Environ Res* 23, 89-101.
- Robohm RA, (1986).** Paradoxical effects of cadmium exposure on antibacterial antibody responses in two fish species: Inhibition in cunners (*Tautoglabrus adspersus*) and enhancement in striped bass (*Morone saxatilis*). *Vet Immunol Immunopathol* 12, 251-262.
- Roch M, McCarter JA, Matheson AT, Clark MJR, Olafson RW, (1982).** Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 39, 1596-1601.
- Rocha E, Monteiro RAF, (1999).** Histology and cytology of fish liver: a review. *Ichthyology: Recent Research Advances*, 321-344.
- Roesijadi G, (1996).** Metallothionein and its role in toxic metal regulation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 113, 117-123.
- Ross D, (1988).** Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents: Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. *Pharmacology & Therapeutics* 37, 231-249.
- Rougier F, Troutaud D, Ndoeye A, Deschaux P, (1994).** Non-specific immune response of Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) following copper and zinc exposure. *Fish Shellfish Immunol* 4, 115-127.
- Rougier F, Menudier A, Bosgiraud C, Nicolas J, (1996).** Copper and zinc exposure of zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan): effects in experimental listeria infection. *Ecotoxicol Environ Saf* 34, 134-140.
- Rouleau C, Tjälve H, Gottofrey J, Pelletier É, (1995).** Uptake, distribution and elimination of ⁵⁴Mn (II) in the brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental toxicology and chemistry* 14, 483-490.

- Roussel H, Joachim S, Lamothe S, Palluel O, Gauthier L, Bonzom JM, (2007).** A long-term copper exposure on freshwater ecosystem using lotic mesocosms: individual and population responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquat Toxicol* 82, 272-280.
- Ruane N, Wendelaar Bonga S, Balm P, (1999).** Differences between rainbow trout and brown trout in the regulation of the pituitary–interrenal axis and physiological performance during confinement. *General and comparative endocrinology* 115, 210-219.
- Ruas CB, Carvalho Cdos S, de Araujo HS, Espindola EL, Fernandes MN, (2008).** Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river. *Ecotoxicol Environ Saf* 71, 86-93.

S

- Saez G, Bannister W, Bannister J, (1990).** Free radicals and thiol compounds. The role of glutathione against free radical toxicity. *CRC Press Inc. Florida*, 237-254.
- Saglam D, Atli G, Canli M, (2013).** Investigations on the osmoregulation of freshwater fish (*Oreochromis niloticus*) following exposures to metals (Cd, Cu) in differing hardness. *Ecotoxicol Environ Saf* 92, 79-86.
- Salas-Leiton E, Cánovas-Conesa B, Zerolo R, López-Barea J, Cañavate JP, Alhama J, (2009).** Proteomics of juvenile Senegal sole (*Solea senegalensis*) affected by gas bubble disease in hyperoxygenated ponds. *Marine biotechnology* 11, 473-487.
- Salo HM, Hebert N, Dautremepuits C, Cejka P, Cyr DG, Fournier M, (2007).** Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 84, 406-414.
- Sanchez-Dardon J, Voccia I, Hontela A, Chilmonczyk S, Dunier M, Boermans H, Blakley B, Fournier M, (1999).** Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed *in vivo*. *Environmental toxicology and chemistry* 18, 1492-1497.
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Ait-Aissa S, (2005).** Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ Toxicol Pharmacol* 19, 177-183.
- Sanchez W, (2007).** Approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.): un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux. *Museum national d'histoire naturelle-MNHN PARIS*.
- Sanchez W, Ait-Aissa S, Palluel O, Ditche JM, Porcher JM, (2007).** Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16, 279-287.
- Sanchez W, Katsiadaki I, Piccini B, Ditche JM, Porcher JM, (2008a).** Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: a multiparametric approach. *Environ Int* 34, 490-498.
- Sanchez W, Piccini B, Ditche JM, Porcher JM, (2008b).** Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: implication for environmental biomonitoring. *Environ Int* 34, 791-798.
- 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, 150-158.

- Saurabh S, Sahoo P, (2008).** Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research* 39, 223-239.
- Sauter S, (1976).** Effects of exposure to heavy metals on selected freshwater fish: Toxicity of copper, cadmium, chromium and lead to eggs and fry of seven fish species. *Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Environmental Research Laboratory.*
- Saxena M, Gopal K, Jones W, Ray P, (1992).** Immune responses to *Aeromonas hydrophila* in cat fish (*Heteropneustis fossilis*) exposed to cadmium and hexachlorocyclohexane. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 48, 194-201.
- Sayed I, Parvez S, Pandey S, Bin-Hafeez B, Haque R, Raisuddin S, (2003).** Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicol Environ Saf* 56, 295-301.
- Scala R, (1991).** Risk assessment, *Casarett and Doull's Toxicology.* Pergamon Press Elmsford, NY, 985.
- Scharsack J, Kalbe M, Derner R, Kurtz J, Milinski M, (2004).** Modulation of granulocyte responses in three-spined sticklebacks *Gasterosteus aculeatus* infected with the tapeworm *Schistocephalus solidus*. *Diseases of Aquatic Organisms* 59, 141-150.
- Scott GR, Sloman KA, (2004).** The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic toxicology* 68, 369-392.
- Sealey WM, Lim C, Klesius PH, (1997).** Influence of the dietary level of iron from iron methionine and iron sulfate on immune response and resistance of channel catfish to *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of the World Aquaculture Society* 28, 142-149.
- Sevcikova M, Modra H, Slaninova A, Svobodova Z, (2011).** Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet Med* 56, 537-546.
- Shaw BP, Panigrahi AK, (1990).** Brain AChE activity studies in some fish species collected from a mercury contaminated estuary. *Water, Air, and Soil Pollution* 53, 327-334.
- Sheppard SC, Sheppard MI, Gallerand MO, Sanipelli B, (2005).** Derivation of ecotoxicity thresholds for uranium. *J Environ Radioact* 79, 55-83.
- Sies H, (1997).** Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology* 82, 291-295.
- Sigg L, Behra P, Stumm W, (2014).** Chimie des milieux aquatiques, 5^{ème} édition: Cours et exercices corrigés. *Dunod.*
- Simon O, Floc'h E, Geffroy B, Frelon S, (2014).** Exploring ecotoxicological fish bioassay for the evaluation of uranium reprotoxicity. *Environmental toxicology and chemistry* 33, 1817-1824.
- Sindayigaya E, Van Cauwenbergh R, Robberecht H, Deelstra H, (1994).** Copper, zinc, manganese, iron, lead, cadmium, mercury and arsenic in fish from Lake Tanganyika, Burundi. *Science of the Total Environment* 144, 103-115.
- Sinley JR, Goettl JP, Davies PH, (1974).** The effects of zinc on rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in hard and soft water. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 12, 193-201.
- Skipperud L, Stromman G, Yunusov M, Stegnar P, Uralbekov B, Tilloboev H, Zjazjev G, Heier LS, Rosseland BO, Salbu B, (2013).** Environmental impact assessment of radionuclide and metal contamination at the former U sites Taboshar and Digmai, Tajikistan. *J Environ Radioact* 123, 50-62.
- Slooff W, Van Kreijl CF, Baars AJ, (1983).** Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic toxicology* 4, 1-14.
- Smith MT, Thor H, Orrenius S, (1983).** The role of lipid peroxidation in the toxicity of foreign compounds to liver cells. *Biochemical pharmacology* 32, 763-764.

- Solem ST, Jørgensen JB, Robertsen B, (1995).** Stimulation of respiratory burst and phagocytic activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol* 5, 475-491.
- Song L, Wang L, Zhang H, Wang M, (2015).** The immune system and its modulation mechanism in scallop. *Fish Shellfish Immunol* 46, 65-78.
- Song Y, Salbu B, Heier LS, Teien HC, Lind OC, Oughton D, Petersen K, Rosseland BO, Skipperud L, Tollefsen KE, (2012).** Early stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to environmentally relevant concentrations of uranium. *Aquat Toxicol* 112-113, 62-71.
- Sorensen EMB, (1991).** Metal poisoning in fish. *CRC press*.
- Spangenberg JV, Cherr GN, (1996).** Developmental effects of barium exposure in a marine bivalve (*Mytilus californianus*). *Environmental toxicology and chemistry* 15, 1769-1774.
- Spolarics Z, Wu J-X, (1997).** Role of glutathione and catalase in H₂O₂ detoxification in LPS-activated hepatic endothelial and Kupffer cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 273, G1304-G1311.
- Spry DJ, Wiener JG, (1991).** Metal bioavailability and toxicity to fish in low-alkalinity lakes: A critical review. *Environmental Pollution* 71, 243-304.
- Stolen JS, Fletcher TC, (1994).** Modulators of Fish Immune Responses. Volume 1. Models for Environmental Toxicology/Biomarkers Immunostimulators. *DTIC Document*.
- Stubblefield WA, Brinkman SF, Davies PH, Garrison TD, Hockett JR, McIntyre MW, (1997).** Effects of water hardness on the toxicity of manganese to developing brown trout (*Salmo trutta*). *Environmental toxicology and chemistry* 16, 2082-2089.
- Sturm A, Wogram J, Hansen PD, Liess M, (1999).** Potential use of cholinesterase in monitoring low levels of organophosphates in small streams: Natural variability in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and relation to pollution. *Environmental toxicology and chemistry* 18, 194-200.
- Sturm A, Wogram J, Segner H, Liess M, (2000).** Different sensitivity to organophosphates of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase from three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Application in biomonitoring. *Environmental toxicology and chemistry* 19, 1607-1615.
- Swain P, Nayak SK, Nanda PK, Dash S, (2008).** Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: a review. *Fish Shellfish Immunol* 25, 191-201.
- Szalo IM, Taminiau B, Mainil J, (2006).** Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles, Annales de Médecine Vétérinaire. *Université de Liège*.

T

- Teodorova S, Metcheva R, Topashka-Ancheva M, (2003).** Bioaccumulation and damaging action of polymetal industrial dust on laboratory mice *Mus musculus alba*: I. Analysis of Zn, Cu, Pb, and Cd disposition and mathematical model for Zn and Cd bioaccumulations. *Environmental Research* 91, 85-94.
- Tietge JE, Johnson RD, Bergman HL, (1988).** Morphometric changes in gill secondary lamellae of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after long-term exposure to acid and aluminum. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 1643-1648.
- Trevisan R, Uliano-Silva M, Franco JL, Posser T, Hoppe R, Farina M, Bairy ACD, Dafre AL, (2013).** Confinement during field studies may jeopardize antioxidant and physiological responses of Nile tilapia to contaminants. *Mar Environ Res* 91, 97-103.

Truhaut R, (1977). Ecotoxicology: Objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf* 1, 151-173.

U

USEPA, (1998). Guidelines for ecological risk assessment, in: Agency WDUEP (Ed.). *EPA/630/R-95*.

V

Valavanidis A, Vlachogianni T, (2010). Metal pollution in ecosystems. Ecotoxicology studies and risk assessment in the marine environment. *Dept. of Chemistry, University of Athens University Campus Zografou* 15784.

Valcke M, Buteau S, Belleville D, Phaneuf D, Bourgault MH, Nantel A, (2012). Lignes directrices pour la réalisation des évaluations du risque toxicologique d'origine environnementale au Québec. *Institut national de santé publique du Québec*.

Valenzuela AE, Silva VM, Klempau AE, (2006). Qualitative and quantitative effects of constant light photoperiod on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) peripheral blood erythrocytes. *Aquaculture* 251, 596-602.

Valenzuela AE, Silva VM, Klempau AE, (2007). Some changes in the haematological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to three artificial photoperiod regimes. *Fish Physiol Biochem* 33, 35-48.

Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE, (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ Toxicol Pharmacol* 13, 57-149.

Van Leeuwen CJ, Vermeire TG, (2007). Risk assessment of chemicals: an introduction. *Springer Science & Business Media*.

Vargas-Chacoff L, Martínez D, Oyarzún R, Nualart D, Olavarría V, Yáñez A, Bertrán C, Ruiz-Jarabo I, Mancera JM, (2014). Combined effects of high stocking density and *Piscirickettsia salmonis* treatment on the immune system, metabolism and osmoregulatory responses of the Sub-Antarctic Notothenioid fish *Eleginops maclovinus*. *Fish Shellfish Immunol* 40, 424-434.

Vasseur P, Cossu-Leguille C, (2003). Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environ Int* 28, 711-717.

Vazzana M, Cammarata M, Cooper E, Parrinello N, (2002). Confinement stress in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) depresses peritoneal leukocyte cytotoxicity. *Aquaculture* 210, 231-243.

Vega-Lopez A, Galar-Martinez M, Jimenez-Orozco FA, Garcia-Latorre E, Dominguez-Lopez ML, (2007). Gender related differences in the oxidative stress response to PCB exposure in an endangered goodeid fish (*Girardinichthys viviparus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146, 672-678.

Viarengo A, Lowe D, Bolognesi C, Fabbri E, Koehler A, (2007). The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 146, 281-300.

Vieira MC, Torronteras R, Cordoba F, Canalejo A, (2012). Acute toxicity of manganese in goldfish *Carassius auratus* is associated with oxidative stress and organ specific antioxidant responses. *Ecotoxicol Environ Saf* 78, 212-217.

Vinagre C, Madeira D, Narciso L, Cabral HN, Diniz M, (2012). Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecological Indicators* 23, 274-279.

Vindimian E, (1996). La biosurveillance, Colloque" Mesurer l'eau", 188-195.

Vinson M, (2012). The legacy of Soviet nuclear industry in Tajikistan: opportunities and challenges. *Eurasia Daily Monitor* 9.

W

Watzke J, Schirmer K, Scholz S, (2007). Bacterial lipopolysaccharides induce genes involved in the innate immune response in embryos of the zebrafish (*Danio rerio*). *Fish Shellfish Immunol* 23, 901-905.

Wedemeyer G, (1968). Uptake and distribution of Zn⁶⁵ in the coho salmon egg (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 26, 271-279.

Weinstein IL, Revuelta A, Pando RH, (2015). Catecholamines and acetylcholine are key regulators of the interaction between microbes and the immune system. *Annals of the New York Academy of Sciences*.

Welker TL, McNulty ST, Klesius PH, (2007). Effect of sublethal hypoxia on the immune response and susceptibility of channel catfish, *Ictalurus punctatus*, to enteric septicemia. *Journal of the World Aquaculture Society* 38, 12-23.

Wepener V, Van Dyk C, Bervoets L, O'Brien G, Covaci A, Cloete Y, (2011). An assessment of the influence of multiple stressors on the Vaal River, South Africa. *Physics and Chemistry of the Earth, Parts A/B/C* 36, 949-962.

Winzer K, Winston GW, Becker W, Van Noorden CJF, Köehler A, (2001). Sex-related responses to oxidative stress in primary cultured hepatocytes of European flounder (*Platichthys flesus* L.). *Aquatic toxicology* 52, 143-155.

Wirzinger G, Weltje L, Gercken J, Sordyl H, (2007). Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): a suitable biomonitoring tool? *Mutat Res* 628, 19-30.

Wootton RJ, (1976). Biology of the sticklebacks. *Academic Press*.

Wootton RJ, (1984). A functional biology of sticklebacks. *Univ of California Press*.

X

Xiang L, Shao J, Meng Z, (2000). Apoptosis induction in fish cells under stress of six heavy metal ions. *Sheng wu hua xue yu sheng wu wu li jin zhan* 28, 866-869.

Y

Yang X, Baumann PC, (2006). Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. *Ecological Indicators* 6, 567-574.

Z

- Zarros A, Kalopita K, Tsakiris S, Baillie GS, (2013).** Can acetylcholinesterase activity be considered as a reliable biomarker for the assessment of cadmium-induced neurotoxicity? *Food Chem Toxicol* 56, 406-410.
- Zelikoff JT, (1993).** Metal pollution-induced immunomodulation in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 3, 305-325.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ, (2002).** Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine* 33, 337-349.
- Zhang L, Wang WX, (2005).** Effects of Zn pre-exposure on Cd and Zn bioaccumulation and metallothionein levels in two species of marine fish. *Aquat Toxicol* 73, 353-369.

ANNEXES

<http://www.ureka.fr>



Urêka !
Entrez dans
l'aventure de
l'uranium...

URÊKA
le musée interactif
de la mine.

Urêka !
Entrez dans
l'aventure de
l'uranium...

L'épopée française de l'uranium a commencé en Limousin en 1948. Aujourd'hui encore, l'aventure continue...

Durant plus de 60 ans, des hommes ont œuvré jour après jour dans des conditions extrêmes, au cœur des mines sur lesquelles se trouve désormais Urêka. C'est à ces pionniers et à leur activité que le site rend hommage, en retraçant de manière ludique et pédagogique l'histoire de l'exploitation de cette ressource naturelle, contenue dans le sol limousin depuis plus de 200 millions d'années.

◆ *Urêka! Enter into the uranium adventure...*
The French uranium epic began in the Limousin region in 1948. Today, the adventure continues... For over 60 years, men have worked day after day in some extreme conditions, at the heart of the mines where Urêka is located today. It is to those pioneers and their work that the site pays homage, by retracing the history of the exploitation of this natural resource, contained in the Limousin soil for over 200 million years, in a fun and educational way.

Annexe 1 : Liste des étangs proches d'anciens sites miniers uranifères sélectionnés lors de la prospection, et les concentrations métalliques ($\mu\text{g/L}$) dans la fraction dissoute de l'eau (moyenne \pm écart-type, $n = 3$). Les étangs en gras correspondent aux étangs choisis pour mener les études *in situ* présentées dans ce manuscrit. Les concentrations indiquées en *italique* correspondent aux valeurs obtenues par Gagnaire et al. (2015) l'année précédant la prospection. L'étang des Sauvages fut remplacé par l'étang de Malessard lors des études *in situ*. Aucun étang n'a pu être trouvé à proximité de l'ancien site minier de la Lodève. Saint-Pierre 1, 2, 3, et 4 correspondent à quatre localisations dans cet étang où les prélèvements d'eau ont été réalisés. LD : limite de détection.

Département	Etang / lac	Commune / lieu-dit	Longitude	Latitude	U ($\mu\text{g/L}$)	Al ($\mu\text{g/L}$)	Fe ($\mu\text{g/L}$)	Mn ($\mu\text{g/L}$)	Ba ($\mu\text{g/L}$)
					Moy \pm Ec	Moy \pm Ec	Moy \pm Ec	Moy \pm Ec	Moy \pm Ec
Loire	Le moulin Poyet	Moulin Saint-Priest	3°44'	45°57'30"	0,80 \pm 0,02	18,80 \pm 0,65	139,46 \pm 5,26	16,16 \pm 0,89	17,39 \pm 0,42
	Le moulin Châtel	Le moulin Châtel	3°40'26"	46°07'33"	0,28 \pm 0,01	18,06 \pm 1,96	121,53 \pm 2,40	33,32 \pm 1,41	52,60 \pm 1,05
	Etang de la goutte	La goutte	3°47'35"	45°52'	0,18 \pm 0,01	40,32 \pm 2,12	149,64 \pm 4,60	10,74 \pm 0,57	11,61 \pm 0,47
	La Font d'Aix	Chausseterre	3°47'33"	45°54'35"	0,33 \pm 0,02	40,14 \pm 3,24	92,98 \pm 15,02	8,54 \pm 1,45	12,12 \pm 0,76
Cantal	Saint-Pierre 1	Saint-Pierre	2°22'40"	45°23'	8,87 \pm 0,02	19,10 \pm 1,16	17,92 \pm 1,05	104,48 \pm 2,63	31,35 \pm 0,18
	Saint-Pierre 2	Saint-Pierre	2°22'40"	45°23'	6,52 \pm 0,09	7,26 \pm 0,20	12,16 \pm 0,26	12,83 \pm 0,31	31,18 \pm 0,41
	Saint-Pierre 3	Saint-Pierre	2°22'40"	45°23'	6,29 \pm 0,32	7,05 \pm 0,14	12,97 \pm 1,11	12,61 \pm 0,62	29,28 \pm 1,59
	Saint-Pierre 4	Saint-Pierre	2°22'40"	45°23'	0,64	86,24	71,82	2,95	12,71
	Lac de Madic	Madic	2°27'30"	45°22'20"	0,03 \pm 0,03	23,47 \pm 23,47	125,87 \pm 125,87	9,77 \pm 9,77	15,85 \pm 15,85
	Etang de chaux	Chaux	2°22'33"	45°27'41"	0,07 \pm 0,07	26,50 \pm 26,50	325,39 \pm 325,39	25,48 \pm 25,48	31,46 \pm 31,46
Haute-Vienne	Etang noir	Chabannat	2°23'38"	45°28'33"	0,11 \pm 0,11	58,17 \pm 58,17	333,77 \pm 333,77	11,95 \pm 11,95	26,19 \pm 26,19
	Maillaufargueix	Maillaufargueix	1°24'15"	46°03'53"	0,26 \pm 0,26	77,26 \pm 77,26	294,59 \pm 294,59	7,03 \pm 7,03	6,02 \pm 6,02
	Pré de Lafont	Pré de Lafont	1°25'24"	46°04'49"	0,30 \pm 0,00	64,55 \pm 0,63	130,68 \pm 4,42	18,06 \pm 0,38	34,78 \pm 1,01
	Jonchère Saint-Maurice	La Jonchère Saint-Maurice	1°28'25"	45°59'44"	0,05 \pm 0,00	14,92 \pm 0,88	320,24 \pm 4,53	15,60 \pm 0,55	25,10 \pm 1,02
	Pontabrier	Pontabrier	1°16'52"	46°00'05"	<i>20,60 \pm 0,60</i>	<i>57,20 \pm 18,70</i>	<i>274,10 \pm 10,50</i>	<i>45,40 \pm 0,70</i>	<i>21,70 \pm 0,20</i>
Hérault	Les sauvages	Saint-Sylvestre	1°23'49"	45°59'48"	<i>1,40 \pm 0,10</i>	<i>79,60 \pm 7,00</i>	<i>40,20 \pm 3,00</i>	<i>7,50 \pm 0,70</i>	< LD
		Lodève							

Annexe 2 : Liste des composés organo-volatiles (COV), hydrocarbures aromatiques et polycycliques (HAP) et polychlorobiphényles (PCB) évalués dans les trois étangs de la Haute-Vienne.

Paramètres analysés			
Catégorie	Composé	Catégorie	Composé
COV	Bromoforme	HAP	Acénaphène
COV	Chloroforme	HAP	Anthracène
COV	Dibromochlorométhane	HAP	Benzo(a) Pyrène
COV	Dichloromonobromométhane CHCl ₂ Br	HAP	Benzo(b) Fluoranthène
COV	Dichlorométhane CH ₂ CH ₂	HAP	Benzanthracène
COV	Tétrachlorure de carbone CCl ₄	HAP	Benzo(ghi) Perylène
COV	1,2-Dichloroéthane CH ₂ Cl-CH ₂ Cl	HAP	Benzo(k) Fluoranthène
COV	1,1,1-Trichloroéthane CCl ₃ -CH ₃	HAP	Chrysène
COV	Trichloroéthylène CHCl-CCl ₂	HAP	Fluoranthène
COV	1,1,2,2-Tétrachloroéthylène CCl ₂ =CCl ₂	HAP	Fluorène
COV	Chlorure de vinyl monomère	HAP	Indéno(1,2,3-cd) Pyrène
COV + HAP	Benzène	HAP	Naphtalène
COV + HAP	Ethylbenzène	HAP	Phénantrène
COV + HAP	Toluène	HAP	Pyrène
COV + HAP	Xylène total	HAP	Dibenzo(ah)anthracène
PCB	PCB28		
PCB	PCB52		
PCB	PCB101		
PCB	PCB118		
PCB	PCB138		
PCB	PCB153		
PCB	PCB 180		

Résumé

L'extraction de l'uranium a eu pour conséquence une remobilisation de cet actinide au niveau des écosystèmes avoisinants les mines. L'utilisation de sels métalliques lors de la réhabilitation des sites miniers et la présence naturelle de métaux ont accentué les niveaux de la contamination métallique dans les hydrosystèmes soumis aux rejets miniers uranifères.

Des expériences in situ ont été conduites au niveau de deux anciens sites miniers uranifères français. L'encagement de l'épinoche à trois épines a été employé pour connaître les effets sublétaux de ce mélange métallique, ainsi que sur la susceptibilité de ce poisson envers un stress biologique.

Cette pollution, caractérisée par de plus importantes concentrations métalliques (notamment en uranium), a entraîné un stress oxydant chez l'épinoche visible sur plusieurs biomarqueurs, ainsi que d'autres effets dépendants du site d'exposition.

La contamination polymétallique a occasionné une augmentation de la susceptibilité des épinoches au stress biologique, en empêchant leurs réponses phagocytaires antioxydantes à ce stress. Ces travaux ont permis de renforcer l'intérêt de la technique d'encagement lors d'une étude environnementale, et celui des immunomarqueurs au sein d'une approche multi-biomarqueurs.

Mots-clés : contamination polymétallique ; approche multi-biomarqueurs ; système immunitaire ; susceptibilité ; encagement ; épinoche à trois épines.

Sublethal effects of a metal contamination due to uranium mine tailings in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). Implication in the susceptibility to a biological stress.

Abstract

Uranium extraction has resulted in a remobilisation of this actinide into mine surrounding ecosystems. Uses of metal salts during mining site rehabilitation, and the natural presence of metals have increased the metal contamination in hydrosystems submitted to mine tailings.

In situ experiments were conducted in two former French uranium mining sites. Three-spined stickleback caging was used to determine the sublethal effects of this metal mixture on this freshwater fish, as well as its effects on fish susceptibility to a sudden biological stress.

This pollution, characterised by higher metal concentrations (especially for uranium), has led to an oxidative stress in sticklebacks visible through several biomarkers, and other effects dependent on the study site.

The polymetallic contamination has modified the stickleback responses to the biological stress, by preventing their phagocytic and antioxidant responses. This work has reinforced the interest of the caging technique during environmental studies and that of immunomarkers in a multi-biomarker approach.

Keywords: polymetallic contamination; multi-biomarker approach; immune system; susceptibility; caging; three-spined stickleback.

Discipline : Ecotoxicologie

Unités de recherche :

IRSN PRP-ENV/SERIS/LECO

Site de Cadarache

13115 Saint-Paul Lez Durance

INERIS UMR_I 02 SEBIO

Parc technologique ALATA

60550 Verneuil-en-Halatte