
Ecole doctorale ABIES
UFR
Université de Reims Champagne-Ardenne

Thèse présentée par :
Audrey CATTEAU

soutenue le 20 décembre 2019

en vue de l'obtention du grade de **Docteur de l'Université de Reims Champagne-Ardenne**

Discipline : Ecotoxicologie

**Pertinence d'une approche multibiomarqueurs en
biosurveillance active avec l'épinoche à trois épines
(*Gasterosteus aculeatus*)**

Composition du jury

Président du jury :

M. **Jean Prygiel**, Professeur, AEAP

Directeur de thèse :

M. **Jean-Marc Porcher**, Directeur de Recherche, INERIS

Rapporteurs :

Mme **Béatrice Gagnaire**, Chargée de Recherche HDR, IRSN

M. **Jehan-Hervé Lignot**, Professeur, UMR MARBEC

Examineurs :

Mme. **Marielle Thomas**, Maître de Conférence HDR, UR AFPA

M. **Alain Geffard**, Professeur, UMR Sebio

« Reste toi-même, aime ton métier. Tâche d'y réussir brillamment. Mais n'en éprouve aucune vanité. Une seule chose compte, une seule chose est belle : l'effort »

(René Barjavel, « Ravage », 1943)

Remerciements

Je souhaite en premier lieu remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail. Merci donc à madame **Béatrice Gagnaire** et monsieur **Jehan-Hervé Lignot** en qualité de rapporteurs et à madame **Marielle Thomas** et monsieur **Jean Prygiel** en tant qu'examineurs.

Durant ces trois années de thèse, j'ai rencontré et côtoyé de nombreuses personnes qui ont contribué à mon épanouissement personnel et professionnel. A travers ces quelques mots, je souhaiterais les remercier de leur aide et de leur soutien.

Merci à mon directeur de thèse, **Jean-Marc Porcher** de m'avoir donné ma chance, de m'avoir guidé et de m'avoir permis d'aller au bout de cette aventure. Merci aussi à **Alain Geffard** et à **Antoine Le Guernic** pour leurs conseils et leurs encouragements tout au long de mon travail. Merci également à **Wilfried Sanchez**, **Rachid Amara** et **Olivier Perceval**, membres de mon comité de suivi de thèse pour leurs conseils et leur disponibilité.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe ECOT de m'avoir accueillie et entourée pendant ces trois ans.

En particulier, merci mille fois à **Anne** pour tous nos échanges scientifiques, pour ta disponibilité, ta patience. Plus encore, merci pour ton soutien, tes encouragements, les heures passées à me remonter le moral et les tonnes de chocolats que tu as sacrifiées dans ce but. Merci à **Cyril** pour ton soutien technique, tes conseils avisés sur de nombreux sujets. Merci également pour ton écoute, ton soutien et tes encouragements. Sans vous deux, mon travail aurait pu être beaucoup plus pénible et compliqué.

Merci à **Olivier**, qui m'a appris à maîtriser l'art de la biochimie. Merci pour ta disponibilité et ta patience (il en a fallu !), et pour tes conseils touristiques en Picardie, qui m'ont aidé à aimer cette région. Un grand merci à **Sandrine** qui, même si elle n'a pas directement participé à mon travail de thèse, a grandement contribué à ma réussite. Merci pour tous les fous rires, les discussions infinies sur le fonctionnement du monde, de la société. Merci pour ta bonne humeur qui fait du bien, et qui a souvent su me remonter le moral !

La thèse, c'est une longue et difficile aventure dans laquelle on se retrouve souvent seul face à soi-même. Heureusement, j'ai eu la chance de pouvoir compter sur vous dans les moments difficiles. Merci à vous tous pour tous ces moments passés ensemble. Merci pour vos expériences, que vous avez acceptées de partager avec moi, qui m'ont énormément aidées et qui, j'en suis persuadé, m'aideront encore dans le futur.

Merci également au reste de l'équipe. J'ai appris beaucoup de choses à vos côtés, et ce, dans tous les domaines. Merci à **Manu, Edith, Nathalie, Benjamin, François** et **Sélim** pour toutes les discussions et les débats sur les sciences, la cuisine, le cinéma, la politique et bien d'autres sujets encore.

Un grand merci également à **Rémy** et **Cleo**, de l'équipe METO, pour leur aide précieuse en statistiques et dans l'utilisation de R.

Je tiens à également remercier tous les doctorants et stagiaires que j'ai rencontrés durant ma thèse, et avec qui j'ai pu partager des moments qui m'ont marqués et qui ont largement contribué à mon épanouissement.

Merci donc à **Adrien**, mon co-bureau pendant 2 années complètes. Merci de m'avoir supporté tout ce temps, avec mes changements d'humeurs, mes accès d'énergie ou de déprime. Merci de n'avoir pas (trop) râlé quand je parlais toute seule (de toute façon tu fais pareil 😊). Merci pour toutes les soirées, pour tous les souvenirs. Un grand merci à **Younes** (Youyouuuuu !!!), tu as toujours compris mieux que personne mes doutes et mes craintes durant ma thèse. Tu m'as encouragé, soutenu et conseillé, même bien après ton départ de l'INERIS. Merci aussi à **Hélène**, pour m'avoir introduite dans le club des doctorants, pour avoir essayé de mettre un peu de vie dans le monde étudiant de Creil et alentours. Ce n'était pas évident, et heureusement que tu étais là, pour rendre les premiers mois moins difficiles. Merci pour tous les souvenirs, et pour ton énergie débordante ! Enfin, merci à **Clémentine** (ma Clem Clem !) pour ta présence et ta douceur. Je suis heureuse d'avoir pu partager quelques souvenir avec toi. Tu es une des lumières de mes souvenirs de ces trois ans, et j'espère que tu illumineras encore un peu les années qui viennent ☺

D'abord stagiaire, puis intérimaire, puis enfin doctorant, merci à **Alex** pour ces nombreuses soirées (autours d'un Welsh, d'une raclette ou juste d'une bière !), pour ces discussions interminables sur la politique et la société, pour ta générosité et ton besoin de partage, qui font honneur à tes origines nordistes 😊. Merci à **Camille** pour ton énergie, ta spontanéité, ta bonne humeur qui sont contagieux. Merci aussi à tous les autres, **Pierre, Quentin, Grazia, Arnaud, Deep, Valentin**, pour tous les bons moments passés ensemble.

Je souhaiterai également remercier **Nina**, stagiaire lors de ma troisième année de thèse, pour son travail et ses efforts, qui m'ont énormément aidé. Cependant, au-delà du travail, je te remercie pour les soirées, les vacances, la découverte de Paris et les moments partagés autour d'un bon jeu de plateau ! Merci pour ton énergie débordante et ta bonne humeur communicative !

A propos des jeux de plateau... merci à tous les membres du club ludothèque de l'INERIS pour les midis passés à perde face à Cthulhu ou à se perdre dans le labyrinthe de Room25. Merci à tous de m'avoir fait découvrir cet univers que je continuerai d'explorer en pensant à ces premières parties avec vous !

Merci aussi à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer en Picardie, ou ailleurs, et avec qui j'ai partagé des moments éphémères, qui m'ont fait découvrir d'autres univers, d'autres façons de vivre et qui m'ont fait comprendre à quel point le monde est riche et vaste, au-delà de mon petit univers. Cette ouverture d'esprit est un trésor que j'ai l'intention de développer tout au long de ma vie. Pour cet enrichissement personnel, je vous dis un grand merci.

Pour terminer, je souhaiterai remercier du fond du cœur mes proches. Merci à mes parents, ma marraine et ma grand-mère pour leur soutien sans limite depuis l'enfance. Vous m'avez toujours poussée à me dépasser, à faire mieux, à travailler dur. Aujourd'hui, tous ces efforts sont payants, et je suis heureuse de partager ma réussite avec vous.

Je dédie mes derniers mots de remerciement à celui qui partage ma vie. Merci pour ta patience et ton soutien, pendant toute cette dernière année qui a été éprouvante pour nous deux. Un grand merci pour avoir été à mes côtés durant ces derniers mois de travail qui aujourd'hui arrive à son terme !

TABLE DES MATIERES

Liste des figures	13
Liste des tableaux	15
Liste des abréviations	17
Liste des travaux	19
Introduction générale	21
Chapitre 1 : Synthèse bibliographique	27
1. Contexte historique et réglementaire de la gestion de l'eau en Europe	29
1.1. Prise de conscience environnementale et naissance de l'écotoxicologie.....	29
1.2. Grandes évolutions de la réglementation sur les milieux aquatiques en France et en Europe	31
1.3. La directive cadre sur l'eau (DCE) : texte fondateur de la politique européenne pour la gestion de l'eau.....	32
1.3.1. Evaluation de l'état chimique des masses d'eau.....	33
1.3.2. Evaluation de l'état écologique des masses d'eau.....	33
1.3.3. Définition d'outils complémentaires à ces approches	34
2. La biosurveillance des milieux aquatiques	35
2.1. Les outils de la biosurveillance : généralités	35
2.2. Les différentes approches en biosurveillance	36
2.2.1. La biosurveillance passive.....	36
2.2.2. La biosurveillance active	38
2.3. Les biomarqueurs en tant qu'outils de la biosurveillance.....	40
2.3.1. Définition	40
2.3.2. Intérêt de ces outils	43
2.3.3. Limites d'utilisation	43
2.4. L'approche multibiomarqueurs et les outils de synthèse.....	47
3. Utilisation de l'épinoche à trois épines en biosurveillance	50
3.1. Une espèce modèle : l'épinoche à trois épines	50
3.2. Biomarqueurs d'intérêt chez l'épinoche.....	53
3.2.1. Les indices morphologiques	54
3.2.2. Le système immunitaire inné.....	54
3.2.3. Les enzymes de biotransformation	55
3.2.4. Le stress oxydant	55
3.2.5. La reproduction.....	58

3.2.6. Les paramètres neuromusculaires	59
4. Les stations de traitement des eaux usées (STEU).....	60
4.1. Composition des eaux résiduaires urbaines.....	60
4.2. Quelques éléments de réglementation	61
4.3. Processus d'assainissement des eaux urbaines dans les stations de traitement des eaux usées (STEU).....	62
4.3.1. Le pré-traitement (ou traitement primaire).....	63
4.3.2. Le traitement secondaire	64
4.3.3. Le traitement tertiaire.....	66
4.4. Les stations d'épuration comme source d'émission de micropolluants	67
4.5. Impacts des effluents de station d'épuration sur les poissons	69
 Chapitre 2 : Aspects méthodologiques	 73
1. Caractérisation des effets directs et indirects de l'encagement sur la batterie de biomarqueurs	75
1.1. Contexte et objectifs.....	75
1.2. Matériel et méthodes.....	76
1.3. Synthèse des principaux résultats	76
 Article 1: Impact of confinement and food access restriction on the three-spined stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>, L.) during caging: a multi-biomarker approach.....	 78
2. Optimisation des cages	104
3. Impacts de certains facteurs confondants sur les niveaux de base des biomarqueurs.....	105
3.1. Exploration des données historiques du laboratoire	105
3.2. Impacts du sexe, de la taille et de la saison sur les valeurs basales des biomarqueurs.....	111
3.3. Calcul de valeurs de références en automne et en hiver	113
3.4. Comparaison des valeurs de références avec de nouvelles données.....	116
 Chapitre 3 : Applications in situ.....	 121
1. Utilisation de l'approche multibiomarqueurs pour évaluer l'efficacité d'une zone humide tampon en aval d'une station de traitement des eaux usées.....	123
1.1. Contexte et objectifs.....	123
1.2. Matériel et méthodes.....	123
1.3. Synthèse des principaux résultats	125
 Article 2: An active biomonitoring approach using three-spined stickleback (<i>Gasterosteus aculeatus</i>, L.) to assess the efficiency of a constructed wetland as tertiary treatment of wastewater.....	 127

1.4. Expérimentation complémentaire : variabilité interannuelle de la réponse aux effluents de STEU	155
2. Application des outils sur la Meuse et trois de ses affluents	160
2.1. Contexte et objectifs.....	160
2.2. Matériel et méthodes.....	160
2.3. Synthèse des principaux résultats.....	161
Article 3: Application of a multibiomarker approach to assess the water quality using caged three-spined stickleback: a proof of concept.	163
Chapitre 4 : Discussion générale et perspectives	191
1. L'encagement : une technique maîtrisée avec l'épinoche à trois épines	194
2. L'approche multibiomarqueurs chez l'épinoche.....	196
2.1. Pertinence dans l'évaluation de la qualité des milieux en aval d'effluents de STEU	196
2.2. Pertinence dans la discrimination des différents sites d'étude.....	198
2.3. Une batterie de biomarqueurs à compléter	199
3. L'IBR comme outil de synthèse des résultats	201
4. Les valeurs de référence : un enjeu pour la biosurveillance	203
Références bibliographiques	207

LISTE DES FIGURES

Manuscrit de thèse

- Figure 1** : Schéma des rôles respectifs des différents éléments de qualités biologiques, physico-chimiques et hydromorphologiques dans la classification de l'état écologique (d'après le Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer (2016))34
- Figure 2** : Relation entre sensibilité et pertinence écologique des réponses biologiques à différents niveaux d'organisation. Modifié d'après Adams et al. (1989).....44
- Figure 3** : La batterie de biomarqueurs développée et utilisée en routine chez l'épinoche à trois épines à l'INERIS.....53
- Figure 4** : Mode d'action et lien entre les composants antioxydants étudiés dans le cadre de la thèse.58
- Figure 5** : Schéma des trois étapes obligatoires de pré-traitement des eaux usées après leur entrée dans la station de traitement.....63
- Figure 6** : Schéma du procédé d'épuration secondaire par « boues activées ».....64
- Figure 7** : Schéma des procédés d'élimination supplémentaire de l'azote lors du traitement par boues activées : (A) Processus d'élimination par RECIRCULATION, (B) Processus d'élimination par ALTERNANCE.....65
- Figure 8** : Pourcentage d'élimination de quelques micropolluants par les STEU (d'après Luo et al. 2014).68
- Figure 9** : Modulations des biomarqueurs mesurés en fonction du stress testé (confinement, restriction alimentaire, combinaison des deux stress) lors des deux expériences réalisées dans cette étude77
- Figure 10** : Caractéristiques des différentes cages utilisées en biosurveillance active chez l'épinoche à trois épines.104
- Figure 11** : Comparaison des valeurs de référence théoriques calculées sur les données de 2016 avec les valeurs de biomarqueurs mesurés en laboratoire en 2017 et dans les bassins en 2018 durant le mois d'octobre.119
- Figure 12** : Comparaison des valeurs de référence théoriques calculées sur les données de 2016 avec les valeurs de biomarqueurs mesurés dans les bassins durant l'hiver 2019.120
- Figure 13** : Schéma de la zone humide tampon (ZHT) et de ses environs.124
- Figure 14** : Réponses des biomarqueurs associés à la condition générale des individus, à la transmission synaptique et à la reproduction après 21 jours d'encagement sur les différents sites en 2018 et 2019.157
- Figure 15** : Réponses des biomarqueurs associés à l'immunité innée après 21 jours d'encagement sur les différents sites en 2018 et 2019.158
- Figure 16** : Réponses des biomarqueurs associés aux défenses antioxydantes et à la biotransformation après 21 jours d'encagement sur les différents sites en 2018 et 2019....159

Article 1

Fig. 1: Experimental design applied in April and in October83

Article 2

Fig. 1: Drawing of the constructed wetland of Sacy-le-Grand and surroundings..... 133

Fig. 2: Results of PCA analysis. 139

Fig. 3: Result of IBR calculations and star plot of deviation index from Ladrancourt station.
..... 142

Article 3

Fig. 1: Localization of studied sites in France and Belgium along the Meuse basin..... 167

Fig. 2: Results of the principal component analysis (PCA). 173

Fig. 3: Results of the hierarchical agglomerative clustering (HAC). 173

Fig. 4: Result of IBR calculations and star plot of deviation index from the population reference.
..... 174

LISTE DES TABLEAUX

Manuscrit de thèse

Tableau 1 : Liste des avantages et limites de la biosurveillance active et passive (modifiée d'après Oikari (2006) et Besse et al. (2012))	39
Tableau 2 : Quelques exemples de biomarqueurs pouvant être utilisés en biosurveillance chez le poisson.....	41
Tableau 3 : Les facteurs confondants les plus étudiés dans la littérature chez le poisson....	46
Tableau 4 : Classification de l'épinoche à trois épines	50
Tableau 5 : Description biologique de l'épinoche à trois épines (<i>Gasterosteus aculeatus</i> L.). Modifié d'après Sanchez (2007).	52
Tableau 6 : Composition physico-chimique et pathogénique des eaux ménagères.....	61
Tableau 7 : Niveaux des biomarqueurs chez des épinoches à trois épines maintenues en condition de référence à l'INERIS.....	108
Tableau 8 : Résultats des ANOVA hiérarchiques appliquées à chaque biomarqueur pour l'ensemble des données.....	112
Tableau 9 : Résultats des analyses de partitionnement de la variance (%).	112
Tableau 10 : Résultats des ANOVA hiérarchiques appliquées à chaque biomarqueur en octobre et février pour des poissons de taille comprise entre 38mm et 48mm.....	114
Tableau 11 : Valeurs basales des biomarqueurs calculées à partir des données de février et octobre en laboratoire et dans les bassins en conditions écosystémiques pour des poissons de taille comprise entre 38mm et 48 mm (stress oxydant, détoxification métabolique et neurotoxicité).....	115
Tableau 12 : Exemples de facteurs d'induction ou d'inhibition des biomarqueurs dans des foies de poissons adultes après exposition à certains xénobiotiques.	118
Tableau 13 : Caractéristiques des 4 sites étudiés dans le cadre du programme Interreg DIADeM.....	160

Article 1

Table 1 : Water physical parameters for caging experiments:	83
Table 2 : Biomarker responses in three-spined sticklebacks according to caging and food condition in Spring.....	89
Table 3 : Biomarker responses in three-spined sticklebacks according to caging and food condition in Autumn.....	90

Article 2

Table 1: Physical and chemical parameters of studied sites.....	138
Table 2: Contribution of each biomarker to the construction of the two main components (%).	139
Table 3: Biomarker responses in three-spined stickleback caged in the three sites.	141

Article 3

Table 1: Physico-chemical parameters of studied sites.....	168
Table 2: List of measured biomarkers in three-spined stickleback and references used for each method.	169
Table 3: Results of upstream/downstream difference in biomarker responses for each site.	172
Table 4: Compositions of clusters. Results are presented in percentage of individuals in each site which are included in the corresponding cluster.....	176
Table 5: The contribution of each biomarker to the building of the clusters in the AHC.	177
Supp. data 1: Results of the comparisons between the stickleback's morphometric parameters at T0 and T21.....	182
Supp. data 2: Description to the clusters obtained with AHC analysis according to the biomarker responses of each biomarker.....	183
Supp. data 3: Biomarker responses in caged three-spined stickleback.	185

LISTE DES ABREVIATIONS

AChE	Acétylcholinestérase	HAI	Health assessment index
ADN	Acide désoxyribonucléique	HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
BAI	Bioeffect assessment index	HSI	Hepatosomatic index
BIOMAR	Biological markers of environmental contamination in marine ecosystem	HSI	Health statut index
BNF	Beta-naphtoflavone	HSP	Heat shot protein
BRI	Biomarker Response index	I2M2	Indice invertébré multimétrique
CAT	Catalase	IBD	Indice biologique diatomées
CE	Commission européenne	IBMR	Indice biologique macrophytiques en rivière
CEA	Charge énergétique en adénylates	IBR	Integrated biomarker response
CEE	Communauté économique européenne	IFREMER	Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
COT	Carbone organique total	INERIS	Institut nationale de l'environnement et des risques
CRI	Sub-cellular response index	IPR	Indice poisson rivières
CS	Citrate synthase	K	Indice de condition de fulton
CV	Coefficient de variation	IBI	Integrative biomarker index
Cyp1A1	Cytochrome P450 1A	LDH	Lactate deshydrogenase
DBO5	Demande biologique en oxygène	LEMA	Loi sur l'eau et les milieux aquatiques
DCE	Directive cadre sur l'eau	LMP	Présence en lysosomes
DCO5	Demande chimique en oxygène	MDH	Malate déshydrogénase
DDD	Dichlorodiphényldichloroéthane	MES	Matière en suspension
DDE	Dichlorodiphényldichloroéthylène	MP	Micropolluant
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane	MPI	Multimarker pollution index
DIADeM	Diagnostic des eaux de la Meuse	MRI	Metabolic Responses Index
DRI	Disease response index	NAWQA	National Water-Quality Assessment
EDA	Effect directed analysis	NGL	Azote global
EH	Equivalent habitant	NQE	Normes de Qualités Environnementales
EHCC	Ecosystem health condition chart	NRC	National research council
ERO	Espèce réactive de l'oxygène	OSPAR	Convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est
EROD	Ethoxyrésorufine-O-dééthylase		
GPx	Glutathion peroxydase		
GR	Glutathion réductase		
GSH	Glutathion total		
GSI	Gonadosomatic index		
GST	Glutathion-S-transférase		

PCB	Polychlorobiphényle	PK	Pyruvate kinase
PIREN-Seine	Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'eau et l'environnement du bassin de la Seine	PT	Phosphore total
PVC	Ploychlorure de vinyle	SOD	Superoxyde dismutase
Rinbio	Réseau intégrateurs biologiques	SPG	Spiggin
ROCCH	Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral	SRI	Systemic response index
SAGE	Schémas d'aménagement et de gestion des eaux	STEU	Station de traitement des eaux usées
SDAGE	Schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux	TAS	Status total en antioxydants
SDH	Succinate déshydrogénase	TBARS	Susbstances réactives aux acides thiobarbituriques
SDS	Sodium dodecyl sulfate	TOS	Status total en oxydants
		VTG	Vitellogénine
		ZHT	Zone humide tampon

LISTE DES TRAVAUX

Publications scientifiques

- Acceptées / Publiées :

Catteau, A., Le Guernic, A., Marchand, A., Hani, Y.M.I., Palluel, O., Turiès, C., Bado-Nilles, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Porcher, J.-M., 2019. Impact of confinement and food access restriction on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) during caging: a multi-biomarker approach. *Fish Physiology and Biochemistry*. 45(4):1261-1276. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00670-1>

Marchand, A., Tebby, C., Beaudouin, R., **Catteau, A.**, Porcher, J.-M., Turiès, C., Bado-Nilles, A., 2020. Reliability evaluation of biomarker reference ranges for mesocosm and field conditions: Cellular innate immunomarkers in *Gasterosteus aculeatus*. *Science of The Total Environment*. 1;698:134333. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134333>

Catteau, A., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Joachim, S., Palluel, O., Turiès, C., Galet, C., Geffard, A., Porcher, J.-M., 2020. An active biomonitoring approach using three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to assess the efficiency of a constructed wetland as tertiary treatment of wastewater. *Ecological Indicator*. (Acceptée le 19 février 2020).

- En préparation :

Catteau, A., Bado-Nilles, A., Beaudouin, R., Tebby, C., Palluel, O., Turiès, C., Chrétien, N., Geffard, A., Porcher, J.-M. Application of a multibiomarker approach to assess the water quality using caged three-spined stickleback: a proof of concept.

David, V., **Catteau, A.**, Joachim, S., Nott, K., Robert, R., Gillart, N., Bado-Nilles, A., Chadili, E., Julian, N., Castiglione, J., Beaudouin, R. Effects of chronic exposure to a pharmaceutical mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) population dynamics in lotic mesocosms.

Communications orales

Catteau, A., Bado-Nilles, A., Porcher, J-M. Intérêt de la réponse immunitaire dans une analyse multibiomarqueurs : cas des effluents de station d'épuration. Assemblée générale de l'UMR I-02 Sebio, Reims, France, 3 juillet 2019.

Catteau, A., Porcher, J-M. Pertinence d'une approche de biosurveillance active avec l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) dans l'évaluation d'une contamination aux effluents de station d'épuration. Journée des doctorants, INERIS, Verneuil-en-Halatte, 12 juin 2019.

Catteau, A., Le Guernic, A., Marchand, A., Hani, Y.M.I., Palluel, O., Turiès, C., Galet, C., Bado-Nilles, A., Porcher, J.-M. La biosurveillance active basée sur l'épinoche à trois épines : optimisation et étude de cas. Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Montpellier, France, 27-28 juin 2018.

Catteau, A., Porcher, J-M. Optimisation d'une approche d'évaluation des impacts environnementaux basée sur la mesure de biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines. Assemblée générale de l'UMR I-02 Sebio, INERIS, Verneuil-en-Halatte, France, 7 juillet 2017.

Communications affichées

Catteau A., Le Guernic A., Marchand A., Hani M.I. Y., Turies C., Palluel O., Bado-Nilles A., Porcher J-M. Optimization of an active biomonitoring approach using three-spined sticklebacks. 9th International Conference on Stickleback Behavior and Evolution, Kyoto, Japan, 3 – 7 July 2018.

Catteau A., Le Guernic A., Marchand A., Hani M.I.Y., Palluel O., Turies C., Porcher J-M. Évaluation de l'impact de l'encagement sur la physiologie et le métabolisme de l'épinoche à trois épines : approche multibiomarqueurs. Colloque de la Société Française d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Lille, France, 29-30 juin 2017.

Catteau A., Porcher J-M. Optimisation d'une approche d'évaluation des impacts environnementaux basée sur la mesure de biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). Journée des doctorants de l'INERIS, Verneuil-en-Halatte, 28 juin 2017.

INTRODUCTION GENERALE



Les révolutions industrielles des XIX^{ème} et XX^{ème} siècles et l'avènement des nouvelles technologies ont engendré une forte augmentation de la production et du rejet de substances chimiques dans l'environnement. A ce jour, plus de 130 millions de substances chimiques sont connues et répertoriées (CAS 2017) et les activités anthropiques sont responsables de la dispersion d'un grand nombre de contaminants dans les écosystèmes. Le compartiment aquatique constitue le réceptacle final pour toutes ces substances. On y retrouve ainsi un cocktail de molécules issues (i) de l'utilisation de produits phytosanitaires et de leurs produits de dégradation, (ii) d'une utilisation de produits domestiques (détergents), (iii) du développement de l'industrie et des transports (hydrocarbures, éléments traces métalliques) et (iv) des pratiques médicales (notamment médicaments, produits de dégradation, hormones) (Schwarzenbach et al. 2010; Luo et al. 2014; Dwivedi 2017). Cet état de fait constitue un problème sanitaire majeur. Certaines études estiment en effet que 80 % de la population mondiale serait impactée par une forte dégradation de la qualité des réserves en eau (Vörösmarty et al. 2010). Outre ces réserves en eau potable, les milieux aquatiques constituent également une importante source d'alimentation, de loisirs et de biodiversité. Les perturbations anthropiques constituent une véritable menace pour ces ressources, pourtant vitales pour l'Homme.

Pour lutter contre la dégradation de l'état des milieux aquatiques, certains gouvernements ont décidé de mettre en place une réglementation. A l'Echelle européenne, la Directive Cadre sur l'Eau (EU Commission 2000), qui s'applique depuis le 22 octobre 2000, définit des règles communes pour mettre fin à la détérioration de la qualité des eaux et atteindre, d'ici 2027, un bon état général de l'ensemble des eaux de surface (rivières, lacs, eaux côtières) et souterraines, d'un point de vue chimique et écologique. L'état écologique est caractérisé par un suivi régulier de la faune et de la flore à l'aide de différents indices de qualité tandis que l'état chimique est évalué à travers l'analyse de 45 substances définies comme « prioritaires » dans le cadre de la DCE. Cette démarche législative pour la reconquête de la qualité de l'eau est une grande première en Europe et doit, à ce titre, être saluée. Cependant, la double évaluation chimique et écologique possède plusieurs limites. Les analyses chimiques réalisées ne se concentrent que sur les 45 substances prioritaires définies dans le cadre de la DCE (EU Commission 2013). Ces analyses ne sont donc pas exhaustives et de nombreux composés, notamment les substances émergentes, ne sont pas pris en compte. De plus, les analyses chimiques ne renseignent pas sur l'exposition réelle des organismes à ces molécules. En effet, le comportement des composés chimiques dans l'environnement varie en fonction de leur nature mais aussi de la physico-chimie du milieu, ce qui peut les rendre plus ou moins biodisponibles pour les organismes. Cette notion de biodisponibilité n'est pas prise

en compte par la DCE malgré l'incertitude qu'elle peut induire dans l'évaluation du risque encouru (Pont and Garric 2010). Une autre limite des outils préconisés par la DCE repose sur le manque de prédictivité des données biocénétiques lors de l'évaluation de l'état écologique des milieux.

Dans un double objectif d'obtenir des indicateurs plus prédictifs et intégrateurs de l'action des molécules chimiques sur les organismes vivants, les biomarqueurs apparaissent comme des outils pertinents pour compléter la démarche imposée dans la DCE. Ces réponses biologiques permettent d'appréhender les mécanismes d'action à l'origine des perturbations individuelles. Ces outils trouvent leur intérêt lors de contrôles d'enquêtes afin de déterminer l'origine du mauvais état d'une masse d'eau ou encore pour déterminer l'ampleur et l'incidence d'une pollution. La notion de contrôle d'enquête peut également être étendue à l'étude des impacts environnementaux d'une installation ou d'un rejet local (Sanchez et al. 2012). De nombreuses études amont/aval montrent ainsi l'intérêt de l'utilisation des biomarqueurs pour caractériser la toxicité d'effluents industriels, miniers ou de station de traitement des eaux (Sanchez et al. 2011, 2012; Kim and Jung 2016; Palas et al. 2018; Blanco et al. 2019).

Le principal avantage de ces outils repose sur leur sensibilité et leur précocité de réponse qui en font des signaux d'alarme d'une perturbation susceptible d'engendrer des effets négatifs à un niveau supérieur d'organisation (population, communauté). Contrairement aux analyses chimiques, la mesure des réponses physiologiques présente l'avantage de prendre en compte la biodisponibilité des contaminants chimiques en permettant une évaluation intégrée de l'état de santé des individus. Cependant même dans ce contexte, l'utilisation des biomarqueurs reste encore restreinte, et ce, pour plusieurs raisons. De nombreux paramètres individuels (âge, statut reproducteur, adaptations génétiques etc...) sont impliqués dans la modulation des réponses biologiques des organismes et induisent une forte variabilité interindividuelle qui peut masquer l'effet des xénobiotiques. A cette variabilité importante s'ajoute le manque de spécificité de la réponse des biomarqueurs, qui peut être modulée par de nombreux types de contaminants. La variabilité et le manque de spécificité induisent des difficultés dans l'interprétation des réponses, en particulier lors d'études *in situ*, durant lesquelles les individus sont exposés à un mélange de substances chimiques pas toujours identifiées dans des conditions non contrôlées. De plus, la disparition de l'espèce sentinelle en cas de contamination ou l'absence d'une espèce d'intérêt en écotoxicologie sur le site d'étude limitent encore l'utilisation de ces outils. La biosurveillance active, c'est-à-dire l'encagement d'individus provenant d'un élevage, apparaît alors comme une alternative pertinente pour étudier une contamination environnementale (Sanchez et al. 2012).

L'encagement permet d'exposer à une pollution environnementale des organismes dont les antécédents sont bien connus et donc de s'affranchir de la variabilité engendrée par les adaptations génétiques des populations. L'encagement permet également de standardiser plusieurs paramètres biotiques (taille, sexe, âge, etc...) et abiotiques (nombre d'individus, temps d'exposition, distance par rapport à la source, etc...) (Oikari 2006) ce qui peut permettre de diminuer la variabilité des réponses mesurées. De plus, dans le contexte actuel de préservation des milieux et de maintien de la biodiversité, l'encagement permet de ne pas prélever d'individus dans les populations naturelles et ainsi de limiter l'impact écologique de la biosurveillance. Cette technique est de plus en plus utilisée sur différents types d'organismes tels que les bivalves (Cappello et al. 2013; Turja et al. 2015), les crustacés (Lacaze et al. 2011; Besse et al. 2013) et les poissons (Le Guernic et al. 2016a; Dey et al. 2016). Cependant, cette approche peut induire un stress chez les individus lié au transport, à l'encagement ou encore à la restriction d'accès à la nourriture qu'il convient de caractériser préalablement afin de limiter les biais liés à l'interprétation des résultats (Oikari 2006; Le Guernic et al. 2016b).

Chez les poissons, parmi les espèces sentinelles pouvant être utilisées en biosurveillance active, la biologie, le comportement et l'écologie de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) sont particulièrement bien documentés (Wootton 1976, 1985, 1994; Bell and Foster 1994). C'est une espèce euryhaline assez ubiquiste, avec des populations établies dans de nombreux milieux européens (littoral, estuaire, rivières, lacs). Sa petite taille (4 à 8 cm à l'âge adulte), sa facilité de manipulation et d'élevage (Pottinger et al. 2002) ainsi que sa résistance aux contaminants environnementaux (Le Guernic et al. 2016a) en font une espèce d'intérêt en biosurveillance.

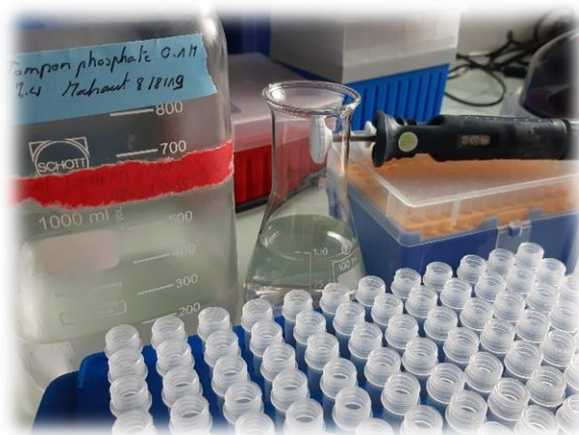
Ces travaux de thèse ont pour objectif d'évaluer la pertinence de l'utilisation d'une approche de biosurveillance active avec l'épinoche à trois épines, en particulier dans le cas de contaminations par des effluents de station d'épuration des eaux usées (STEU).

Le manuscrit de thèse a été structuré en 4 parties :

- Le chapitre 1 est consacré à la synthèse bibliographique sur l'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, l'apport des biomarqueurs comme outils prédictifs en écotoxicologie ainsi que leurs limites d'utilisation. Des éléments d'informations sont également apportés concernant la biologie de l'espèce modèle choisie : l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). Les biomarqueurs développés chez cette espèce et utilisés durant l'ensemble de la thèse seront présentés dans ce chapitre, qui se terminera par une description des stations de traitement des eaux usées (STEU) et des impacts des effluents sur les organismes vivants, en particulier sur les poissons.

- Le chapitre 2 est consacré aux aspects méthodologiques, avec en particulier la caractérisation des impacts du confinement et de la restriction d'accès à l'alimentation sur les biomarqueurs de l'épinoche à trois épines (**Article 1**). Les travaux réalisés pour déterminer l'impact de certains facteurs confondants sur les biomarqueurs et tenter de définir des valeurs de référence y sont également présentés.
- Le chapitre 3 présente les résultats des applications *in situ* de la démarche, avec une première application sur une zone humide tampon dans les Marais de Sacy (**Article 2**) et une seconde à une plus large échelle sur le bassin de la Meuse dans le cadre du programme Interreg DIADeM (**Article 3**).
- Le 4^{ème} et dernier chapitre replace l'ensemble des travaux réalisés dans un contexte de gestion des milieux aquatiques. Ce chapitre apporte un regard critique sur l'approche déployée, en mettant en avant la pertinence de l'approche et des biomarqueurs choisis et en proposant des perspectives d'améliorations pour une utilisation optimale de ces outils en biosurveillance.

CHAPITRE 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE



1. CONTEXTE HISTORIQUE ET REGLEMENTAIRE DE LA GESTION DE L'EAU EN EUROPE

1.1. Prise de conscience environnementale et naissance de l'écotoxicologie

Les révolutions industrielles du XIX^{ème} siècle et le développement des activités humaines pendant le XX^{ème} siècle ont induit la création et le rejet de milliers de substances polluantes dans les environnements naturels. Cependant, à cette époque, peu de personnes s'intéressaient à cette problématique. La croyance profonde selon laquelle la dilution de la pollution dans les milieux serait suffisante pour éviter ses effets (« paradigme de dilution ») était bien ancrée dans la société. Ce paradigme a été aujourd'hui remplacé par l'idée que tout ce qui est rejeté dans la nature aura des conséquences un jour ou l'autre (« paradigme du boomerang ») (Berg et al. 2009). Ce changement de paradigme s'est essentiellement opéré au milieu du XX^{ème} siècle avec la médiatisation de plusieurs affaires de santé publique.

Une des premières affaires connues est l'intoxication massive des habitants de la préfecture de Toyama (Japon) suite au rejet de cadmium d'une exploitation minière dans la rivière Jinzu (dès 1912). L'eau de cette rivière était en effet utilisée par les habitants pour l'irrigation des cultures de riz. Une concentration en cadmium très importante avait été retrouvée dans le riz et une forte mortalité des poissons avait été observée. D'un point de vue physiologique, le cadmium remplace les complexes protéiques d'autres métaux essentiels (i.e. cuivre, zinc) et induit une cytotoxicité liée à une réduction de l'absorption du calcium. Cette maladie provoque ainsi des violentes douleurs à la colonne vertébrale et aux articulations, donnant ainsi à cette maladie le nom de « maladie Itaïtaï » (en français « aïe aïe ») (Gillet 2018). Une seconde affaire très connue est l'apparition de la maladie dite de « Minamata ». A partir de 1932, les rejets de dérivés mercuriels dans la baie de Minamata (Japon) par la société pétrochimique Shin Nippon Chisso ont induit une importante contamination de l'eau et des organismes (poissons, coquillages). Ces composés ont été méthylés en méthylmercure qui s'est bioaccumulé le long de la chaîne trophique. La contamination des pêcheurs et de leurs familles a été massive, avec 2000 cas officiellement référencés, même si 10 000 personnes auraient été touchées (Gillet 2018). Cette maladie se caractérise par des dysfonctionnements nerveux et des malformations chez les nouveaux nés.

Un certain nombre d'accidents industriels ont également provoqué une prise de conscience concernant les risques liés à l'industrie, avec, par exemple, la pollution massive de certains milieux (exemple du lac Erié dans les années 1970), les grandes marées noires du Torrey

Canyon (1967) ou de l'Amoco Cadiz (1978), les catastrophes de Seveso (1976), Bhopal (1984), Tchernobyl (1986) ou plus récemment Fukushima (2011). Parallèlement à cette prise de conscience des risques industriels, la prise de conscience environnementale se fait progressivement et au fil des découvertes des effets néfastes des activités humaines sur les écosystèmes.

Un des évènements initiateurs de cette prise de conscience environnementale est la publication en 1962 de l'ouvrage « Le printemps silencieux » de Rachel Carson (« Silent Spring »). Cet ouvrage traite notamment des effets négatifs liés à l'utilisation des pesticides (comme le dichlorodiphényltrichloroéthane, « DDT ») sur les oiseaux, et dénonce la désinformation et le lobbying exercés par les industries chimiques sur ce sujet. Cet ouvrage a reçu un écho important dans la société américaine, avec notamment le premier « jour de la Terre » (Earth Day) qui a réuni 20 millions de personnes (Locher and Quenet 2009) et qui a marqué la naissance du mouvement environnemental le plus important de la planète. Cet ouvrage a également encouragé les études scientifiques portant sur le DDT et ses dérivés, le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE) et le dichlorodiphényldichloroéthane (DDD) qui ont petit à petit conduit à l'interdiction de l'utilisation de cet insecticide (en 1972 en France), même s'il est encore aujourd'hui utilisé dans les pays tropicaux pour lutter contre les moustiques vecteurs du paludisme (Roberts et al. 1997). Le DDT et ses métabolites ont notamment été montrés comme étant les agents responsables de la diminution des peuplements d'oiseaux piscivores et des oiseaux de proie suite à leur bioconcentration le long de la chaîne trophique. Le DDT a induit un amincissement de la coquille des œufs des oiseaux contaminés, qui étaient alors cassés lors de la couvée (Peakall et al. 1975). Ces travaux figurent parmi les premiers qui s'intéressent aux effets indirects d'une exposition aux polluants chimiques, via une exposition à travers la chaîne trophique.

Ainsi, de la toxicologie est né l'écotoxicologie. Ce mot est apparu initialement en 1971, sous les plumes de Jean-Michel Jouany et Jean-Marie Pelt, respectivement toxicologue et botaniste français qui définissaient alors l'écotoxicologie comme « l'étude de l'influence des nuisances sur les relations entre les individus et leur environnement » (Jouany 1971; Férard 2013). Un peu plus tard en 1975, René Truhaut définit la discipline comme « la branche de la toxicologie qui étudie les effets toxiques, induits par des polluants naturels ou synthétiques, sur les constituants des écosystèmes (animaux, végétaux, microbiote) dans leur globalité » (Truhaut 1975).

L'écotoxicologie est donc une science multidisciplinaire nouvelle qui combine écologie et toxicologie pour évaluer les dangers d'une pollution chimique sur les diverses composantes de l'environnement. Comme décrit dans ce paragraphe, la création de cette discipline a été

progressive et peut être considérée comme un aboutissement de la prise de conscience environnementale qui a eu lieu tout au long du XX^{ème} siècle.

Les scandales médiatisés qui ont permis cette prise de conscience avaient tous un point commun : la diffusion de la contamination dans les chaînes trophiques à partir d'une contamination chimique de l'eau. L'eau constitue en effet le réceptacle final de tous les polluants et le lien ultime entre toutes les espèces vivantes sur Terre (y compris l'Homme), c'est pourquoi la pollution de ce compartiment est un point de vigilance particulier qui est l'objet de législations depuis plusieurs décennies. De la même façon que l'histoire environnementale brièvement décrite ci-dessus, la réglementation sur l'eau et les milieux aquatique a évolué au fil des siècles pour intégrer une dimension plus écosystémique et écologique.

1.2. Grandes évolutions de la réglementation sur les milieux aquatiques en France et en Europe

Les premiers textes de loi en France concernant le droit et les usages de l'eau sont les codes napoléoniens. Ces textes ont surtout pour objectif de définir précisément les régimes de propriété des plans d'eau, des sources et des cours d'eau. Aucun aspect sanitaire ou écologique n'entre encore en considération (Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse; Vie publique 2017).

C'est avec la loi du 8 avril 1898 qu'apparaissent les premières mentions de salubrité de l'eau. En effet, suite au développement industriel qui a largement contribué à la multiplication des usages de l'eau, la salubrité des eaux publiques destinées à la consommation humaine devient un enjeu majeur. La loi vise alors à réglementer les différents usages de l'eau afin de veiller au maintien de sa potabilité mais également au maintien de l'accès à cette ressource pour le secteur agricole. L'état crée alors l'équivalent d'une « police des eaux », qui est chargée de faire respecter la loi.

Les premiers éléments législatifs liés aux préoccupations environnementales de la qualité des masses d'eau apparaissent avec la loi du 16 décembre 1964 (Loi n°64-1245). Cette loi marque un tournant dans la réglementation de l'eau en France car elle organise les réseaux hydrographiques autour des bassins versants et crée les organismes associés à ces bassins versants, à savoir les agences de l'eau et les comités de bassin. Elle marque également l'apparition du principe de « pollueur-payeur ». Ainsi, le premier article de cette loi énonce clairement la lutte contre la pollution des eaux comme étant son objectif principal, dans le but de concilier toutes les exigences d'alimentation en eau potable, d'utilisations agricole et industrielle, de conservation de la vie biologique et de conservation de l'écoulement des eaux. Cette loi inspirera la future directive européenne.

A partir de 1980, une politique commune européenne pour la gestion des ressources en eau commence à apparaître, notamment à travers les directives 80/778/CEE du 15 juillet 1980, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (EU Commission 1980) et 91/271/CEE du 21 mai 1991, relative au traitement des eaux usées urbaines (EU Commission 1991). La directive 80/778/CEE est transcrite dans la loi française à travers le décret n°89-3 du 3 janvier 1989.

L'année 1992 marque un nouveau tournant dans l'histoire française de la gestion de l'eau : à travers la loi du 3 janvier (Loi n° 92-3 du 3 janvier 1992), dite « loi sur l'eau », l'eau est reconnue en tant que « patrimoine commun de la nation ». Ce texte met en place un nouveau système de gestion de la ressource en eau à travers les schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux (SDAGE) et les schémas d'aménagement et de gestion des eaux (SAGE). Ce type de fonctionnement par schéma directeur va être repris par la directive cadre sur l'eau (Directive 2000/60/CE), principale politique européenne sur la gestion de l'eau, qui sera retranscrite dans le droit français à travers la loi sur l'eau et les milieux aquatiques (LEMA) du 30 décembre 2006 (Loi n° 2006-1772).

1.3. La directive cadre sur l'eau (DCE) : texte fondateur de la politique européenne pour la gestion de l'eau

La Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2000/60/CE complétée par la directive fille n°2013/39/UE) a été adoptée le 23 octobre 2000 dans l'objectif de mettre fin à la détérioration des milieux aquatiques au sein des pays membres de l'Union Européenne mais également de parvenir au retour à un « bon état » écologique et chimique de ces masses d'eau d'ici 2027 (EU Commission 2000, 2013). Elle est constituée de trois cycles de gestion de six années : 2010-2015, 2016-2021, 2022-2027 (Reyjol et al. 2013). Chaque cycle se découpe lui-même en trois étapes, à savoir un état des lieux qui se termine par la rédaction des schémas directeurs d'aménagement et de gestion des eaux (SDAGE) puis par la mise en place d'un programme de mesures.

En juillet 2018, au milieu du deuxième cycle de la DCE, est paru un rapport de l'agence européenne pour l'environnement dans lequel est fait état de l'avancement des objectifs de la directive cadre. Ainsi, une part importante des masses d'eau européennes n'a toujours pas atteint un bon état écologique et chimique. Plus spécifiquement pour les eaux de surface, seulement 40 % d'entre elles auraient atteint un bon état écologique et 38 % un bon état chimique. Ce rapport note également une faible amélioration par rapport au SDAGE du cycle précédent. Cependant, la proportion de masse d'eau non évaluée a diminué, ce qui est un point encourageant vers l'atteinte des objectifs (Kristensen et al. 2018).

La DCE préconise ainsi une approche écosystémique, intégrant à la fois une évaluation chimique mais également écologique des eaux de surface et souterraines.

1.3.1. Evaluation de l'état chimique des masses d'eau

Le « bon état chimique » des masses d'eau est atteint lorsque les concentrations en substances chimiques présentes dans les milieux ne dépassent pas les Normes de Qualités Environnementales (NQE) préconisées. La mise en place de ces NQE s'effectue à travers une méthodologie proposée par la commission européenne qui intègre (i) les effets directs de la substance considérée sur les organismes vivant dans la colonne d'eau et sur les organismes benthiques ainsi que (ii) les effets indirects sur leurs prédateurs et sur la santé humaine (via la consommation d'eau ou des produits de pêche). Ces NQE ne sont établies que pour une liste de substances chimiques considérées comme « prioritaires », c'est-à-dire représentant un risque majeur pour l'environnement ou l'Homme. Initialement, 33 substances ou familles de substances avaient été définies comme prioritaires. Cette liste a été complétée en 2013 par 12 nouvelles molécules, ce qui porte actuellement à 45 le nombre de substances à surveiller (EE Commission 2013).

La classification de l'état chimique d'une masse d'eau s'effectue à travers le principe du paramètre « déclassant » : il suffit qu'une seule des 45 substances présente une concentration supérieure à sa NQE pour que le milieu soit qualifié en « mauvais état ». Cette liste de molécules ainsi que leurs NQE sont révisées tous les six ans, afin d'intégrer au mieux les nouvelles connaissances scientifiques et de garantir un niveau de protection appropriée (EU Commission 2013).

1.3.2. Evaluation de l'état écologique des masses d'eau

L'état écologique est caractérisé par un suivi régulier de la faune et de la flore à l'aide de différents indices de qualité. Ainsi en France, pour l'étude des eaux de rivière et lacustres, quatre indices apportant des informations complémentaires sont utilisés : l'indice biologique diatomées (IBD), l'indice biologique macrophytiques en rivière (IBMR), l'indice poisson rivières (IPR) et l'indice invertébrés multimétrique (I2M2). Les caractéristiques physico-chimiques (i.e. température, oxygène dissous, matière en suspension) et hydromorphologiques du milieu (i.e. profondeur, courant) viennent compléter les évaluations biocénotiques. Pour chaque indice, une note est calculée correspondant à un écart par rapport à une condition dite « de référence ». L'état écologique est ainsi défini en fonction de la distance de ces indices par rapport à cette référence. Cinq classes ont été définies (très bon – bon – moyen – médiocre - mauvais) et, comme pour l'état chimique, c'est le principe de l'élément déclassant qui est appliqué (figure 1).

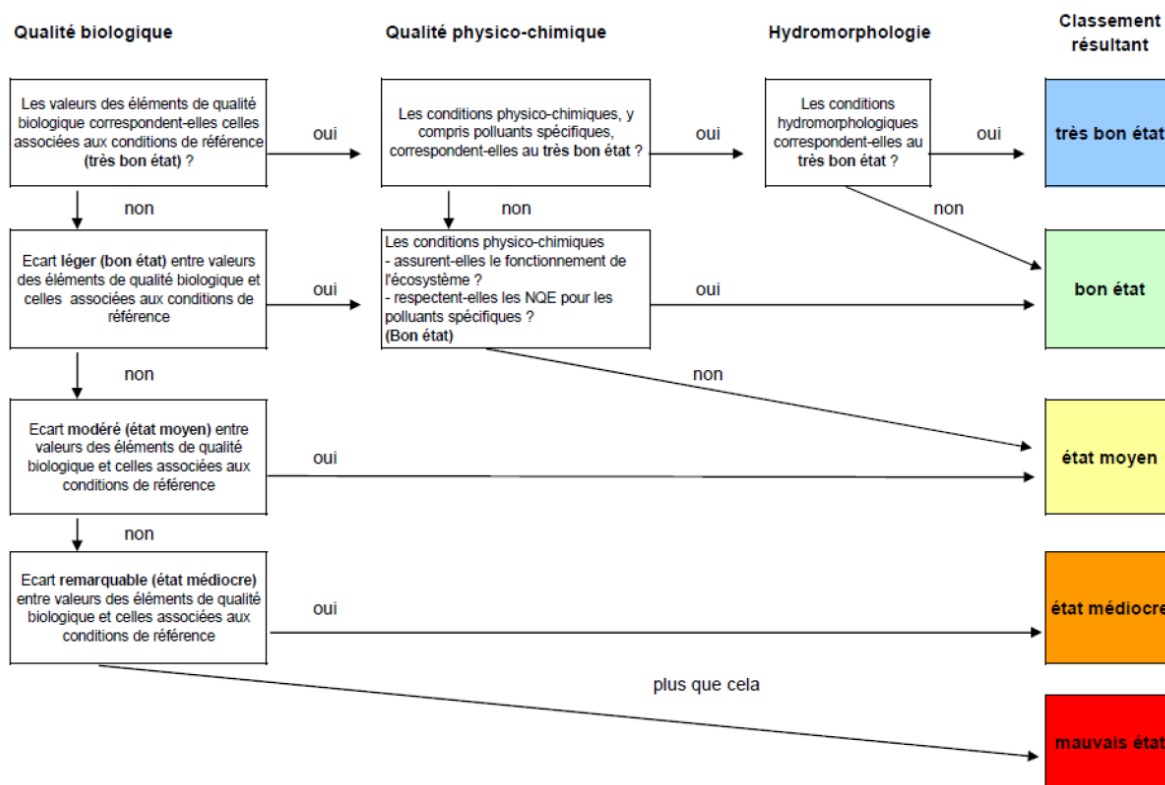


Figure 1 : Schéma des rôles respectifs des différents éléments de qualités biologiques, physico-chimiques et hydromorphologiques dans la classification de l'état écologique (d'après le Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer (2016))

1.3.3. Définition d'outils complémentaires à ces approches

Même si l'approche préconisée par la DCE a apporté de nombreuses améliorations aux lois déjà existantes, notamment par la prise en compte des écosystèmes, plusieurs limites doivent être soulevées.

La DCE propose en effet d'évaluer la qualité d'un milieu en comparaison avec des conditions dites « de référence », en définissant un état de référence par l'absence ou la quasi-absence de perturbations anthropiques. Ce concept de « condition de référence » soulève de nombreuses questions et critiques, tant d'un point de vue écologique que sociologique (Bouleau and Pont 2014). Deux principales critiques sont émises, l'une portant sur les définitions de « milieu de référence » et de « bon état » qui sont très variables suivant les pays, et l'autre interrogeant la significativité écologique de la notion de milieu « non perturbé ». En effet, les modifications de l'environnement par l'Homme sont importantes, et il existe aujourd'hui très peu de milieux exempts de toute contamination chimique ou altération physique (Amiard 2011).

L'approche chimique présente l'avantage d'être rapide et sensible mais elle nécessite des connaissances *a priori* sur les substances à surveiller et à mesurer. Pour des raisons évidentes

de faisabilité et de coût, il est ainsi impossible d'évaluer les substances présentes dans l'environnement de façon exhaustive. De plus, certaines substances présentes à des concentrations très faibles (inférieures au ng/L) et susceptibles d'induire des effets sur les populations sont difficiles à détecter et quantifier. A ce manque d'exhaustivité s'ajoute la non prise en compte de la biodisponibilité des substances ainsi que de leurs métabolites et produits de dégradation (Besse et al. 2011).

A travers les différents indicateurs biologiques qu'elle met en œuvre l'approche écologique informe sur la présence ou l'absence de certaines espèces bioindicatrices dans les écosystèmes étudiés. Cette approche présente une grande pertinence écologique. Cependant, l'absence de taxons sensibles bioindicateurs sur un site est constatée *a posteriori*, ce qui ne permet pas d'anticiper et d'éviter cette disparition. Ainsi, pour compléter les approches imposées par la DCE et permettre la réalisation de diagnostics plus fiables du risque environnemental, de nouveaux outils de biosurveillance ont été proposés.

2. LA BIOSURVEILLANCE DES MILIEUX AQUATIQUES

2.1. Les outils de la biosurveillance : généralités

La biosurveillance est définie comme un ensemble de méthodes permettant de détecter des polluants dans les compartiments biologiques des milieux et d'évaluer leurs effets sur le vivant (Forbes and Forbes 1997). Parmi les approches utilisées en biosurveillance, les bioessais, la bioaccumulation et l'étude des réponses physiologiques chez des organismes bioindicateurs sont les méthodes les plus employées et les mieux décrites.

Les **bioessais** sont des méthodes biologiques *in vivo* ou *in vitro* qui permettent de mesurer la toxicité d'un polluant, d'un mélange de polluants ou encore d'échantillons environnementaux aux échelles cellulaires ou individuelles. Les bioessais *in vitro*, largement utilisés pour mesurer des effets toxiques subcellulaires (i.e. activation de récepteurs, dommages à l'ADN) (Connon et al. 2012), sont de plus en plus utilisés pour des raisons éthiques car ils présentent un avantage certain dans la réduction de l'utilisation d'animaux lors de campagnes de biosurveillance. Ils permettent également l'analyse d'une multitude de matrices différentes (i.e. échantillons environnementaux, extraits de capteurs passifs) et ne nécessitent qu'une faible quantité d'échantillon. Ces tests sont considérés comme très sensibles et sont mesurés à un très faible niveau d'organisation. Ils sont particulièrement utilisés en complément des analyses chimiques pour détecter par exemple des activités dans les milieux (i.e. oestrogène, androgène, dioxin-like). Ils peuvent également être utilisés dans des approches en « analyse dirigée par l'effet » (EDA, « Effect Directed Analysis ») afin d'identifier les fractions toxiques

des échantillons (Wernersson et al. 2015). Les bioessais *in vivo* sont des tests de toxicité qui utilisent des organismes vivants entiers. La mortalité, l'immobilisation, le taux de fécondation, le succès d'éclosion, le développement embryonnaire, la croissance ou l'activité de nage figurent parmi les effets toxiques les plus étudiés. Tout ces bioessais (*in vivo* et *in vitro*) permettent de comparer la toxicité relative de produits chimiques ou d'échantillons environnementaux spécifiques.

La **bioaccumulation** consiste à mesurer les concentrations de molécules chimiques ciblées dans des tissus biologiques d'une espèce exposée à une contamination ambiante. Cette approche présente l'avantage de prendre en compte la disponibilité réelle des contaminants dans le compartiment biologique. Cependant, aucune information ne peut être déduite quant au réel impact de ces molécules sur les individus. De plus, des mécanismes de détoxification existent au sein des organismes et permettent l'élimination de certains types de substances chimiques non bioaccumulables. Des organismes peuvent ainsi avoir été exposés à des molécules (et avoir subi des effets associés à cette exposition) sans pour autant que la substance ne soit retrouvée dans les tissus biologiques.

L'étude des réponses physiologiques (« **biomarqueurs** ») d'une espèce modèle constitue quant à elle une réponse directe de l'organisme face à un xénobiotique. Les biomarqueurs ont été suggérés comme des outils pertinents pour faire le lien entre l'exposition aux xénobiotiques et les effets biologiques observés lors des études sur des bioessais (Depledge and Fossi 1994; Van der Oost et al. 2003). Ces deux approches (bioaccumulation et étude des biomarqueurs) peuvent être utilisées au travers d'approches passives ou actives qui vont être développées plus longuement dans les paragraphes suivants.

2.2. Les différentes approches en biosurveillance

La biosurveillance est divisée en deux types d'approches : la biosurveillance passive, basée sur des analyses issues d'organismes autochtones, et la biosurveillance active basée sur la transplantation de l'espèce d'intérêt sur le site d'étude, via par exemple, des dispositifs d'encagement. Les organismes peuvent être utilisées en biosurveillance pour évaluer (i) l'accumulation des molécules chimiques dans les tissus (bioaccumulation) et (ii) les niveaux de réponses des biomarqueurs. Ces deux types d'analyses permettent respectivement de déterminer leur niveau d'exposition et leur état de santé.

2.2.1. La biosurveillance passive

Cette approche a été utilisée dans le cadre de vastes programmes de suivi de l'état des eaux côtières, essentiellement sur des mollusques. Aux Etats-Unis depuis 1986, le programme

« US Mussel Watch » réalise le suivi annuel de 300 sites côtiers à travers l'analyse de 100 molécules organiques et inorganiques dans les sédiments et les tissus biologiques de plusieurs espèces de bivalves (Besse et al. 2012). De façon similaire en France, l'IFREMER a initié en 1974 un programme de surveillance du littoral qui assure un suivi de la concentration en plusieurs métaux, HAP, dioxines et PCB sur trois matrices, à savoir l'eau, les sédiments et plusieurs bivalves (le ROCCH, pour « Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du littoral ») (Ifremer 2018). Ces programmes de surveillance à grande échelle sont rendus possibles par l'omniprésence des mollusques dans l'environnement marin, ce qui permet une inter-comparaison des sites étudiés. Ce type d'étude est beaucoup plus difficile à mettre en œuvre dans les milieux aquatiques continentaux, qui présentent de nombreux hydrosystèmes différents et une multitude d'espèces spécifiques des milieux considérés (Besse et al. 2012). Quelques programmes existent cependant, tels que le programme NAWQA aux Etats-Unis (« National Water-Quality Assessment ») démarré en 1993 et qui vise à réaliser le suivi d'une sélection de micropolluants par une approche multi-espèces combinant bivalves, insectes, poissons et plantes (Nowell et al. 2018; Shoda et al. 2019).

Tous ces exemples sont issus d'études analysant la bioaccumulation des molécules chimiques dans les tissus biologiques. Les organismes natifs du site d'étude ont l'avantage d'avoir bioaccumulé les xénobiotiques pendant une longue période, ce qui permet d'avoir une idée de la contamination sur le long terme. En revanche, la comparaison des sites entre eux est conditionnée à la présence de l'espèce étudiée sur l'ensemble des sites. Une autre limite se trouve dans l'absence d'informations sur la mobilité des individus échantillonnés, qui pourraient migrer entre des sites différemment contaminés et ainsi modifier les réponses indépendamment de la contamination du site d'étude. De cette limite en découle une autre, à savoir l'impossibilité de connaître le temps réel d'exposition. Lorsque les analyses portent sur l'étude des biomarqueurs, une autre limite à l'utilisation de l'approche passive apparaît : la mise en place de mécanismes d'adaptation lors d'une exposition chronique à des contaminants peut induire des erreurs d'interprétation et limiter la comparaison des réponses entre les sites (Gerhardt 2000; Geffard et al. 2010). Enfin, le nombre d'individus échantillonnés peut varier d'un site à l'autre suivant l'occurrence des populations, et plusieurs facteurs biotiques comme la taille, le sexe ou l'âge des individus sont difficilement contrôlables et peuvent compliquer encore l'interprétation des données et l'inter-comparaison entre les sites d'études, et ce, quelles que soient les analyses finales (Gerhardt 2000; Geffard et al. 2010) (tableau 1).

2.2.2. La biosurveillance active

L'approche active permet de s'affranchir de certaines limites induites par la biosurveillance passive. En particulier, elle permet la standardisation de plusieurs paramètres biotiques (i.e. âge, taille, sexe) et abiotiques (i.e. nombre d'individus, temps d'exposition) ce qui réduit la variabilité des réponses mesurées (Oikari 2006; Besse et al. 2012). Elle permet également d'utiliser une espèce modèle même si elle est absente du site d'étude. Les individus utilisés peuvent ainsi provenir d'un site naturel ou d'un élevage, ce qui permet de travailler avec des populations dont les antécédents sont bien connus (Oikari 2006). Un autre avantage, moins souvent évoqué, est que cette approche permet de ne pas puiser dans des populations autochtones déjà fragilisées par des perturbations du milieu (tableau 1).

Des exemples de déploiement à grande échelle de cette approche existent et se concentrent presque exclusivement sur le milieu marin. Ainsi en France, le programme Rinbio (« réseau intégrateurs biologiques) développé par l'IFREMER depuis 1996 analyse les mêmes substances que celles décrites précédemment dans le programme ROCCH sur des bivalves encagés (*Mytilus galloprovincialis*) (Ifremer 2010). Cependant, en milieu continental, peu d'études à d'aussi larges échelles existent. La majorité d'entre elles est destinée à l'évaluation de sources de contamination ponctuelles (i.e. effluent industriel, effluent de station de traitement des eaux) (Besse et al. 2012). Différents types d'organismes sont alors utilisés tels que les gammares (Lacaze et al. 2011; Besse et al. 2013), les bivalves (Cappello et al. 2013; Turja et al. 2015) ou les poissons (Le Guernic et al. 2016a; Dey et al. 2016; Vieira et al. 2017). Le pourcentage d'études qui utilisent des poissons reste cependant largement inférieur aux études utilisant les invertébrés ou les plantes (Besse et al. 2012).

La biosurveillance active présente quelques limites qui doivent être soulignées (tableau 1). La première concerne le choix de l'espèce sentinelle. En effet, toutes les espèces ne peuvent pas être encagées (i.e. comportement, taille) (Oikari 2006). Une autre limite concerne le temps d'exposition limité et fixé qui réduit le temps de bioaccumulation des molécules chimiques. Les résultats seront donc *in fine* plus faibles que chez des organismes ayant été exposés toute leur vie. Pour des molécules présentes à des concentrations extrêmement faibles dans le milieu, il est possible que le temps choisi ne soit pas suffisant pour permettre leur détection dans les tissus biologiques. Concernant l'étude des biomarqueurs, les résultats dépendront des biomarqueurs sélectionnés, selon leur sensibilité et leur cinétique d'induction et d'inhibition. La technique de biosurveillance active n'est pas standardisée ce qui constitue également une limite à l'utilisation de cette approche. L'utilisation de différentes espèces complique la mise en place d'une méthodologie unique, mais, même au sein d'une espèce, le temps d'encagement, la profondeur à laquelle sont déposés les organismes, la densité

d'individus dans les cages ou encore les modalités d'alimentation (apport extérieur ou non) sont autant de facteurs qui varient d'une étude à l'autre et qui rendent difficile la comparaison entre les études (Oikari 2006). De plus, un certain nombre de facteurs confondants liés à la technique d'encagement elle-même (densité, confinement, accès alimentaire, temps d'exposition) peuvent moduler les réponses mesurées et compliquer l'interprétation des données finales (Oikari 2006; Brydges et al. 2009; Trevisan et al. 2013; Vargas-Chacoff et al. 2014; Andrade et al. 2015). Toutes les limites évoquées doivent ainsi être prises en compte et caractérisées en amont pour s'assurer d'une interprétation correcte et robuste des données (Oikari 2006; Le Guernic et al. 2016b).

Tableau 1 : Liste des avantages et limites de la biosurveillance active et passive (modifiée d'après Oikari (2006) et Besse et al. (2012))

	Biosurveillance Passive	Biosurveillance Active
Avantages	Facilité de mise en œuvre	Facilité de l'échantillonnage
	Coût plus faible	Calibration des individus utilisés (âge, sexe, taille)
	Intégration de la contamination sur le long terme	Connaissance sur les antécédents de la population d'origine
	Existence de programmes à large échelle	Suppression des impacts liés au prélèvement dans les populations autochtones
		Standardisation possible pour une espèce modèle donnée
		Conditions d'exposition connues
Limites	Dépendant de la présence et de l'occurrence de l'espèce modèle	Mise en place chronophage (sélection taille et sexe des individus, dépôt des cages, retrait des cages)
	Incertitudes liées à la mobilité des individus et au temps réel d'exposition dans le milieu	Coûts élevés (temps, matériel)
	Impossibilité de calibrer les individus échantillonnés (âge, sexe, taille)	Choix plus limité de l'espèce modèle
	Capacité d'adaptation des individus lors d'une exposition chronique	Pas de standardisation de la technique
	Facteurs confondants (température, physico-chimie, saison, autre stress)	Facteurs confondants (température, physico-chimie, saison, autre stress)
		Facteurs confondants supplémentaires liés à l'encagement (densité, transport, confinement, restriction alimentaire)
	Absence de déploiement à large échelle dans les eaux continentales	

2.3. Les biomarqueurs en tant qu'outils de la biosurveillance

2.3.1. Définition

Bien que la définition ait fait l'objet de plusieurs discussions depuis une trentaine d'années (Roméo and Giambérini 2013; Kroon et al. 2017), un biomarqueur est le plus souvent défini comme un changement des réponses comportementales et/ou physiologiques des organismes pouvant être mesurées dans les fluides, les organes ou l'organisme entier et qui révèle une exposition ou des effets à un ou plusieurs polluants chimiques (Depledge and Fossi 1994; Peakall and Walker 1994; Van der Oost et al. 2003; Allan et al. 2006).

Plusieurs classifications des biomarqueurs ont été proposées. Le conseil national de la recherche américaine ainsi que plusieurs auteurs préconisent une classification en trois groupes : biomarqueurs d'exposition, biomarqueurs d'effet et biomarqueurs de susceptibilité (NRC 1987; Van der Oost et al. 2003; Allan et al. 2006). Forbes et al. (2006) soulignent cependant la difficulté de distinguer clairement une réponse liée à un dysfonctionnement biologique d'une réponse homéostatique, indiquant seulement l'exposition à une substance chimique. Certains auteurs ne retiennent ainsi que deux catégories, « biomarqueurs de défense » et « biomarqueurs de dommages » (De Lafontaine et al. 2000), ce qui permet de lever l'ambiguïté du mot « effet », qui peut être bénéfique ou néfaste. Ainsi, en réponse à une exposition à des xénobiotiques, l'organisme va mettre en place des mécanismes biologiques de défense (biomarqueurs de défense) qui seront dépassés en cas d'exposition prolongée et/ou d'une concentration trop élevée en polluants, induisant ainsi des effets sur les organismes détectés par la mesure des biomarqueurs de dommages (tableau 2).

Plusieurs recommandations sont venues compléter, au fil des années, la définition initialement établie des biomarqueurs (Van der Oost et al. 2003) :

- La méthode d'analyse des biomarqueurs doit être peu coûteuse, facile et rapide à mettre en œuvre, de préférence non invasive tout en étant fiable.
- La réponse biologique doit être rapide afin d'être utilisée comme indicateur précoce de contamination.
- Les niveaux de base des biomarqueurs doivent être bien définis afin de distinguer la variabilité naturelle (liée aux facteurs biotiques et abiotiques) du signal lié à un stress.
- Les mécanismes existants entre l'exposition à un polluant et la réponse du biomarqueur doivent être caractérisés.
- La significativité du biomarqueur, c'est-à-dire l'impact de sa réponse sur l'organisme entier, doit être connue.

Ces recommandations restent cependant assez peu respectées dans leur totalité. Les trois derniers points en particulier font l'objet de discussions et alimenteront la partie concernant les limites d'utilisation des biomarqueurs, détaillées plus loin dans ce chapitre.

Tableau 2 : Quelques exemples de biomarqueurs pouvant être utilisés en biosurveillance chez le poisson.

+ : réponse de type « induction », - : réponse de type « inhibition ».

BIOMARQUEURS DE DEFENSE			
Biomarqueur	Réponse	Polluant	Références
Métallothionéines	+	Métaux	Filipović and Raspor 2003 Atli and Canli 2008 Siscar et al. 2013
Protéines de stress (HSP)	+	Cadmium, HAPs, PCBs, pesticides	Sanders 1993 Jones and Candido 1999
	+	Pesticides organochlorés, DDT, HAP, PCBs	Flammarion et al. 1998 Whyte et al. 2000
Acitivité des Cyp1A1 (EROD)	-	Organophosphates, carbamates	Stien et al. 1998 Fabrzi et al. 1999 Hernandez-Moreno et al. 2011
	+	Endosulfan, glyphosate, PCB, HAP, Prochloraze	Sanchez et al. 2008b Modesto and Martinez 2010 Dong et al. 2013
Système anti-oxydant (GSH, GPx, Gr, CAT, SOD, β-carotène, α-tocophérol, TAS, TOS...)	+/-	Non spécifique*	Van der Oost et al. 2003 Sanchez et al. 2005 Valavanidis et al. 2006
Phagocytose	+/-	Non spécifique*	Harford et al. 2005 El-Boshy and Taha 2011 Kreutz et al. 2012 Guardiola et al. 2013 Morcillo et al. 2015
Flambée oxydative	+/-	Non spécifique*	Ahmad et al. 2003 Guardiola et al. 2013 Jolly et al. 2014 Xu et al. 2015 Morcillo et al. 2015

*Non spécifique : toutes sortes de substances chimiques (i.e. métaux, pesticides, HAP, PCB)

Tableau 2 : (suite)

BIOMARQUEURS DE DOMMAGES			
Biomarqueur	Réponse	Polluant	Références
Dommages à l'ADN (adduits, cassures, micronoyaux)	+	HAP, métaux, pesticides	Akcha et al. 2004 Bony et al. 2008 Marquis et al. 2009
Intégrité/stabilité de la membrane lysosomale	-	Métaux, pesticides	Khoshbavar-Rostami et al. 2007 Kreutz et al. 2012 Bado-Nilles et al. 2013
	+	HAPs	Jee and Kang 2004 Bado-Nilles et al. 2009
Apoptose et nécrose leucocytaire	+	Non spécifique*	Tellez-Bañuelos et al. 2009 Selvaraj et al. 2013 Xing et al. 2015 Morcillo et al. 2015
Peroxydation lipidique	+	Glyphosate, métaux	Modesto and Martinez 2010 Siscar et al. 2013
(acétyl)Cholinestérases	-	Malathion, glyphosate, Carbamates, organophosphates	Sturm et al. 1999 Modesto and Martinez 2010 Ghisi et al. 2016
	+	Cuivre, Cadmium, Aluminium, détergent SDS	Jifa et al. 2006 Ballesteros et al. 2017
Spiggin	+ ♀	Perturbateur endocriniens androgènes	Katsiadaki et al. 2006 Sanchez et al. 2008a Muldoon and Hogan 2016
Vitellogénine	+ ♂	Perturbateur endocriniens œstrogènes	Sanchez et al. 2011 Muldoon and Hogan 2016 Wang et al. 2017
Réserves énergétiques (glycogène, lipides, protéines)	-	Non spécifique*	Le Gal et al. 1997 Ribeiro et al. 2001 Pierron et al. 2007 Dedourge et al. 2008
Enzymes digestives (Amylase, Trypsine, cellulase, lipase...)	+/-	Non spécifique*	Le Gal et al. 1997 Dedourge et al. 2008
Métabolisme énergétique (CEA, taux de lactate, LDH, PK, CS, MDH, SDH...)	+/-	Non spécifique*	Le Gal et al. 1997 Dedourge et al. 2008
Biométrie (K, HSI, GSI)	+/-	Non spécifique*	Le Gal et al. 1997 Dedourge et al. 2008

*Non spécifique : toutes sortes de substances chimiques (i.e. métaux, pesticides, HAP, PCB)

2.3.2. Intérêt de ces outils

Plusieurs éléments viennent appuyer l'intérêt de ces outils en biosurveillance. Lorsqu'un xénobiotique entre en contact avec un organisme vivant, la réaction moléculaire de cette rencontre est rapidement détectable à travers l'étude de certains biomarqueurs. La précocité de réponse de ces paramètres présente une capacité de prévention qui n'est pas retrouvée dans d'autres méthodes de biosurveillance (chimie, étude des populations). Les impacts de ces xénobiotiques aux niveaux populationnels, communautaires et écosystémiques peuvent en effet prendre du temps pour être détectables, et sont parfois irréversibles. A l'inverse, des effets observés aux niveaux sub-individuels peuvent être utilisés comme signaux d'alarmes avant l'apparition d'effets aux échelles supérieures. Ces caractéristiques de sensibilité et de précocité de la réponse figurent parmi les principaux avantages de ces outils (figure 2).

Les biomarqueurs utilisés *in situ* en biosurveillance permettent d'identifier les effets d'un mélange de contaminants (xénobiotiques mais aussi leurs métabolites) en prenant en compte la complexité physiologique d'organismes entiers. En effet, ils intègrent à la fois les effets des systèmes de protection mais également les interactions des composés entre eux ou avec d'autres molécules endogènes (Lagadic et al. 1997). L'intérêt des biomarqueurs se trouve donc dans les informations qu'ils peuvent donner sur les effets biologiques des polluants, au lieu d'une simple quantification comme c'est le cas avec des analyses chimiques.

L'intérêt des biomarqueurs en tant qu'outils pertinents dans une démarche d'évaluation du risque a été mis en évidence par plusieurs auteurs (Amiard and Amiard-Triquet 2008; Sanchez and Porcher 2009; Sanchez et al. 2012). L'utilisation des biomarqueurs est ainsi proposée dans plusieurs conventions et directives à l'échelle européenne telles que la Convention pour la Protection de l'environnement marin de l'Atlantique nord-est depuis 1992 (Convention OSPAR) (OSPAR Commission 1992) ou la directive Cadre Stratégie pour le Milieu Marin depuis 2008 (EU Commission 2008).

2.3.3. Limites d'utilisation

Cependant, comme tous les outils existants, certaines limites à l'utilisation des biomarqueurs existent et doivent être soulignées. La première limite mise en avant par de nombreux auteurs est liée directement à leur précocité de réponse et à leur sensibilité. En effet, même si les biomarqueurs sont souvent décrits comme des signaux potentiels d'alarme avant l'apparition d'effets populationnels, la relation entre une perturbation des réponses physiologiques avec des effets aux échelles supérieures n'est pas clairement définie pour tous les paramètres (Bartell 2006; Forbes et al. 2006; Friberg et al. 2011). A titre d'exemple, une induction de biomarqueurs de défenses (i.e. enzymes de détoxification, enzymes antioxydantes) ne peut

pas facilement être reliée à des effets sur la croissance, la survie ou la reproduction des individus. Il est donc difficile de prédire des effets populationnels uniquement à partir de ces quelques paramètres. Cette faible pertinence écologique (figure 2) explique en partie pourquoi l'utilisation des biomarqueurs est encore peu répandue dans les démarches d'évaluation des risques (Amiard-Triquet et al. 2013).

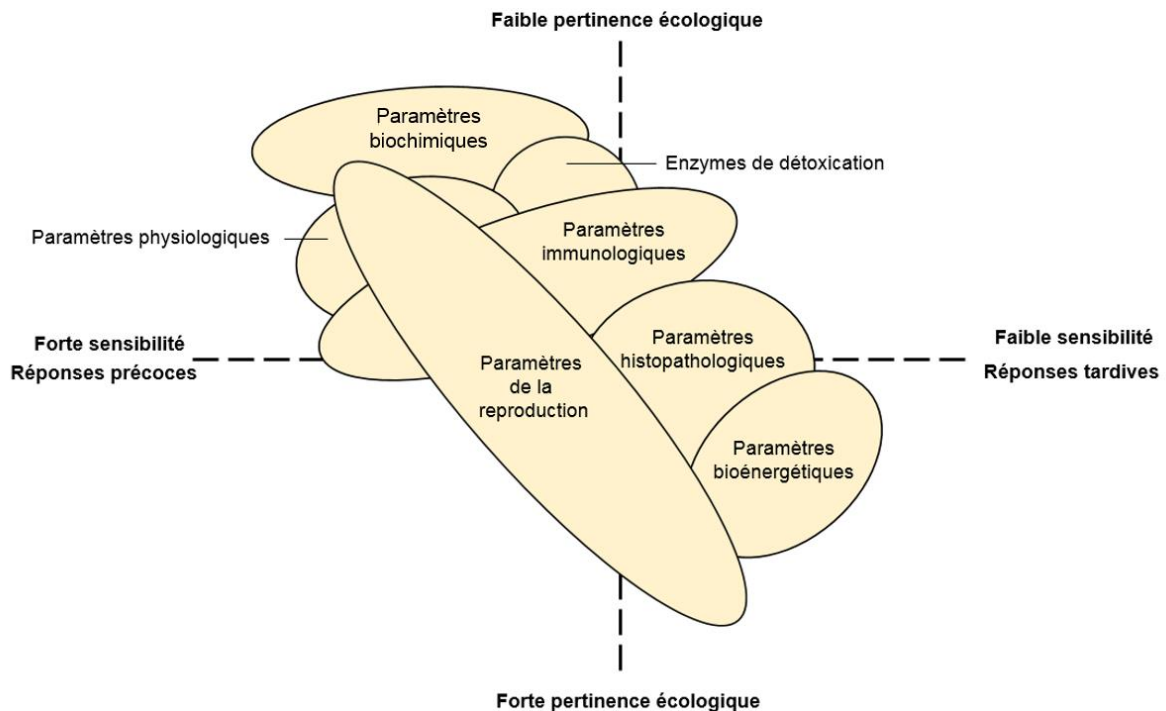


Figure 2 : Relation entre sensibilité et pertinence écologique des réponses biologiques à différents niveaux d'organisation. Modifié d'après Adams et al. (1989).

Une autre limite régulièrement soulignée est la non-spécificité de la réponse des biomarqueurs à un type de polluant. La majorité des biomarqueurs présente en effet une réponse non spécifique aux contaminants (tableau 1), notamment lorsque les biomarqueurs étudiés sont des biomarqueurs de défenses (i.e. système antioxydant, biotransformation, immunité) (Flammarion et al. 2001). Cependant, cette non-spécificité est à nuancer. S'il n'est effectivement pas possible de caractériser précisément la molécule à l'origine d'une perturbation, les biomarqueurs répondent souvent à des types de contaminations définies et identifiables (i.e. activité acétylcholinestérase souvent inhibée par les composés organophosphorés, activité EROD souvent induite par des HAP, PCB ou des composés dioxin-like, vitellogénine et spiggin indicateurs de substances à effets perturbateurs endocriniens).

En plus de ce manque de spécificité, de nombreux biomarqueurs présentent une capacité de réponse bidirectionnelle. La plupart des biomarqueurs peuvent en effet être inhibés par

certaines molécules et induits par d'autres à travers des mécanismes d'action complexes (agonistes/antagonistes de récepteurs, actions sur les rétrocontrôles des fonctions), de sorte que l'interprétation des résultats dans un contexte d'exposition à un cocktail de substances peut se révéler ardue. Certains auteurs mettent cependant en avant l'intérêt de ces biomarqueurs comme étant des réponses « générales » à la dégradation des conditions environnementales (Amiard-Triquet et al. 2013).

L'intégration des variations temporelles de la contamination peut également être discutée. Certains marqueurs antioxydants présentent des réponses transitoires, avec une induction en début d'exposition qui disparaît après plusieurs jours (Sanchez et al. 2005). L'existence de mécanismes de réparation, en particulier pour les dommages génomiques, est également à prendre en compte. Une parfaite connaissance des mécanismes métaboliques et physiologiques sous-jacents est nécessaire pour s'assurer une bonne interprétation des résultats.

Enfin, les niveaux des biomarqueurs ne sont pas seulement dépendant de la contamination chimique du milieu. De nombreux facteurs confondants biotiques (i.e. âge, sexe, taille) ou abiotiques (i.e. température, pH, oxygène dissous) viennent influencer les réponses mesurées (tableau 3). A ces facteurs de variation naturelle s'ajoutent ceux induits par l'encagement lors d'étude en biosurveillance active. Cette variabilité générée induit un bruit de fond susceptible de masquer les modulations liées aux contaminants chimiques et conduire à des erreurs d'interprétation. Une bonne utilisation des biomarqueurs implique donc une bonne connaissance sur la physiologie des organismes utilisés et une caractérisation fine des effets de ses différents facteurs sur les niveaux des biomarqueurs étudiés (Garric et al. 2010). L'existence de ses facteurs confondants complique également la définition des valeurs basales des niveaux des biomarqueurs. Certains auteurs proposent ainsi la prise en compte de ces facteurs de variation dans la définition de plages de référence qui serviront de niveaux de base pour interpréter les réponses de biomarqueurs obtenues sur des sites d'intérêt (Marchand et al. 2019).

Tableau 3 : Les facteurs confondants les plus étudiés dans la littérature chez le poisson

	Facteurs abiotiques					Facteurs biotiques				
	Saison	Température	pH	Salinité	Oxygénation	Sexe	Taille	Âge	Nourriture	Parasitisme
Système antioxydant (GPx, GSH, CAT, SOD)	Sanchez et al. 2008c	Parihar et al. 1997 Lushchak 2011 Vinagre et al. 2012 Almeida et al. 2015	Qu et al. 2014	Martínez-Álvarez et al. 2005 Kopecka and Pempkowiak 2008	Lushchak et al. 2001 Cooper et al. 2002 Lushchak et al. 2005 Lushchak and Bagnyukova 2007 Lushchak 2011)	McFarland et al. 1999 Kopecka and Pempkowiak 2008		Viarengo et al. 1991	Mourente et al. 2002 Pascual et al. 2003 Martínez-Álvarez et al. 2005	Dautremepuits et al. 2003
Peroxydation lipidique		Vinagre et al. 2012 Almeida et al. 2015		Martínez-Álvarez et al. 2005				Viarengo et al. 1991	Mourente et al. 2002 Pascual et al. 2003 Martínez-Álvarez et al. 2005	Bello et al. 2000
Dommages à l'ADN	Kostic et al. 2017					Cachot et al. 2013	Wirzinger et al. 2007 Cachot et al. 2013 Santos et al. 2014	Cachot et al. 2013		
AChE		Hazel 1969 Durieux et al. 2011 Almeida et al. 2015					Sturm et al. 1999 Flammarion et al. 2002 Durieux et al. 2011			
EROD	Ronisz et al. 2000 Sanchez et al. 2008c	Andersson and Förlin 1992 Vinagre et al. 2012				Andersson and Förlin 1992 Flammarion and Garric 1997 Kirby et al. 2004 Kopecka and Pempkowiak 2008		Whyte et al. 2000	George and Henderson 1992 Hanson et al. 2006	
GST	Jolly et al. 2012				Oehlers et al. 2007	Jolly et al. 2012				
Biométrie	Wootton 1976 Chellappa et al. 1995 Sanchez et al. 2008c Lenhardt et al. 2009	Purchase and Brown 2001				Kopecka and Pempkowiak 2008			Zamal and Ollevier 1995	
Métabolisme énergétique	Wootton et al. 1978 Chellappa et al. 1989	Wootton et al. 1978 Chellappa et al. 1989 Amiard-Triquet et al. 2013					Kuzmina 1996		Fontaine et al. 2007	
Marqueurs histologiques		Triebskorn et al. 1997					Basmadjian et al. 2008 Stentiford et al. 2010 Cachot et al. 2013			
Marqueurs de l'immunité	Jolly et al. 2012 Bado-Nilles et al. 2015 Brown et al. 2016 Marchand et al. 2019					Jordanova et al. 2016 Marchand et al. 2019	Marchand et al. 2019	Jordanova et al. 2016		

2.4. L'approche multibiomarqueurs et les outils de synthèse

Tout comme en biologie humaine, plusieurs types d'analyses sont nécessaires afin d'effectuer un diagnostic précis de l'état de santé de l'organisme. De plus, l'utilisation d'une batterie de biomarqueurs permet de rendre compte de l'impact potentiel d'une multitude de contaminants sur le plus grand nombre possible de voies métaboliques et/ou physiologiques, augmentant ainsi la puissance de diagnostic de l'outil « biomarqueurs ». Ainsi, ces paramètres sont largement utilisés dans le cadre d'approches multibiomarqueurs qui intègrent des paramètres à plusieurs échelles (i.e. cellulaire, moléculaire) et correspondent à différentes fonctions physiologiques et métaboliques (i.e. système immunitaire, système antioxydant, détoxification métabolique, reproduction) (Galloway et al. 2004; Sanchez et al. 2007; Fonseca et al. 2011; Jolly et al. 2012; Le Guernic et al. 2016a). La quantité importante de données ainsi générées rend difficile l'interprétation des résultats (et la réserve aux spécialistes). Ainsi le besoin d'outils de synthèse s'est assez rapidement imposé de façon à rendre accessible les résultats des études multibiomarqueurs aux gestionnaires de l'environnement. Ce transfert d'outils de recherche de quelques laboratoires spécialisés vers l'opérationnel reste à l'heure actuelle le principal frein à leur utilisation dans l'évaluation de la qualité des milieux, même dans un contexte de contrôle d'enquête.

Un des premiers indicateurs d'évaluation de la santé des organismes (HAI pour « Health Assessment Index ») a été développé sur des poissons (Adams et al. 1993). Cet indice ne prend en compte que des marqueurs de lésions tissulaires. Pour chaque tissu étudié, une valeur (10, 20, 30 ou 40) est attribuée selon la gravité des dommages observés. Une valeur de HAI est alors obtenue pour chaque individu en sommant tous les HAI calculés. L'intérêt majeur mis en avant est la possibilité d'effectuer des analyses statistiques sur des observations qualitatives et de pouvoir ainsi comparer chaque site à l'aide de valeurs quantitatives. Cet indice a été repris et modifié par Broeg et al. (2005) qui ont utilisé une méthodologie similaire avec des biomarqueurs cellulaires indicatifs d'une toxicité générale chez le flet commun (*Platichthys flesus*) (stabilité de la membrane lysosomale, accumulation de lipides neutres et activité phosphatase acide). L'indicateur est ainsi appelé BAI pour « Bioeffect Assessment Index ». Ces indices n'intègrent pas la notion de niveaux de références, et les catégorisations en classe de gravité s'effectuent de façon empirique.

Au début des années 2000, Aarab et al. (2004) ont développé un indice basé sur la capacité de discrimination des biomarqueurs. Brièvement, les auteurs calculent les pouvoirs de discrimination de chaque biomarqueur utilisé (à l'aide d'une analyse discriminante) pour tous les sites. Ces pouvoirs de discrimination sont sommés pour donner un indice MPI (pour « Multimarker pollution index ») qui permettront de comparer les sites entre eux.

Un système expert a été développé par Dagnino et al. (2007). Il s'agit d'un système de décision capable d'intégrer les résultats d'une batterie de biomarqueurs chez la moule *Mytilus galloprovincialis* pour calculer un HSI (« Health Statut Index ») en prenant en compte un ensemble de règles complexes (i.e. type de réponse attendue, niveau d'organisation, interactions) pour aboutir à un diagnostic le plus précis possible. A noter que, dans ce système, les variations par rapport à la référence inférieures à 20 %, même statistiquement significatives, ne sont pas prise en compte car considérées comme biologiquement non pertinentes.

En 2008, Hagger et al. (2008) proposent un nouvel indice appelé BRI pour « Biomarker Response Index ». Quatre catégories de réponses sont définies, non pas en fonction des mesures directes des biomarqueurs, mais en fonction du niveau d'altération par rapport à une référence. De plus, les auteurs ont choisi de pondérer chaque biomarqueur en fonction du niveau d'organisation auquel il appartient. Concrètement, ils ont choisi de donner davantage de poids aux biomarqueurs physiologiques, un poids moyen aux biomarqueurs cellulaires et un poids plus faible aux biomarqueurs moléculaires. Cette pondération reflète la conviction que des modifications aux échelles les plus élevées peuvent engendrer des impacts plus graves sur les individus.

Dans les années 1990, un système d'intégration d'une batterie de biomarqueurs a également été développé sous le nom de EHCC pour « Ecosystem Health Condition Chart ». Publié initialement dans une thèse et des articles en espagnol, ce système a été utilisé dans les années 2010 pour évaluer les dommages causés par la marée noire qui a touché les côtes de Galice, du Portugal et du Sud-Ouest de la France après le naufrage du Prestige en 2002 (Marigómez et al. 2013). Ce système permet, à travers l'analyse de 8 biomarqueurs d'exposition et d'effet, de construire une échelle de couleurs pour chaque biomarqueur en fonction de leur degré de modification. Les valeurs de référence et les valeurs seuils utilisées sont issues des données disponibles dans la littérature. Les biomarqueurs sélectionnés pour ce système sont également utilisés pour la construction de l'IBI (« Integrative Biomarker Index »), qui peut être considéré comme une amélioration de l'EHCC. Brièvement, les biomarqueurs sont regroupés pour calculer 5 indices spécifiques à 5 échelles biologiques : le MRI (« Metabolic Responses Index »), le CRI (« sub-Cellular Response Index »), le TRI (« Tissue Responses Index »), le SRI (« Systemic Response Index ») et le DRI (« Disease Response Index »). Ces indices sont ensuite placés sur les 5 branches d'un graphique en radar et l'IBI est calculé à partir de l'aire de la forme géométrique associée (Marigómez et al. 2013).

Cependant, parmi tous les indices développés depuis une vingtaine d'années, le plus utilisé est l'IBR (« Integrated Biomarker Response ») proposé en 2002 par Beliaeff et Burgeot. C'est le programme de recherche européen BIOMAR (« Biological markers of environmental contamination in marine ecosystem ») qui a permis le développement du premier indice IBR sur la moule bleue (*Mytilus edulis*) et le flet d'Europe (*Platichthys flesus*) (Beliaeff and Burgeot 2002). Brièvement, les résultats des biomarqueurs sont normalisés et représentés sur un graphique en radar (un biomarqueur par branche). L'aire de la forme géométrique ainsi créée constitue la note d'IBR finale du site étudié. Cette représentation graphique rend possible la visualisation des différences entre les sites et facilite l'interprétation des données mais la principale limite de cet indice repose sur le fait que l'ordre de représentation des différents biomarqueurs conditionne fortement l'aire finale. Une amélioration de cet IBR a été proposée par Devin et al. (2014) en calculant les IBR générés par toutes les permutations possibles des biomarqueurs sur le graphique en radar. L'état global d'un site d'étude n'est alors plus caractérisé par une seule valeur d'IBR mais par une multitude de valeurs (dépendant du nombre de biomarqueurs étudiés) dont la distribution peut être comparée entre les sites par des analyses statistiques. Dans le même temps, Sanchez et al. (2013) ont également proposé une modification de l'IBR pour ne plus considérer une aire mais une distance par rapport à une référence. Cette modification permet également de s'affranchir du biais lié à l'ordre des biomarqueurs et présente l'avantage de prendre en compte le type de modification de la réponse des biomarqueurs (induction ou inhibition). Cet indice a été utilisé avec succès dans le cadre d'études sur le terrain (Sanchez et al. 2013; Cao et al. 2018) et en laboratoire (Sobjak et al. 2017). Une autre variante de cet IBR existe dans laquelle les auteurs attribuent un poids aux biomarqueurs, de façon arbitraire, en fonction de leur niveau biologique (3 pour les biomarqueurs indiquant une altération physiologique, 2 pour les biomarqueurs de dommages cellulaires et à l'ADN et 1 pour les biomarqueurs moléculaires comme les activités enzymatiques) (Parolini et al. 2013; Vieira et al. 2017).

Dans leur publication de 2013, Marigomez et al. comparent les résultats des indices IBR, BAI, HSI, EHCC et IBI dans l'évaluation des conséquences de la marée noire engendrée par le naufrage du Prestige, et ce, sur plusieurs années. Les auteurs concluent que pour leur étude de cas, l'EHCC, l'IBR et l'IBI sont les indices les plus pertinents car les informations apportées sont plus précises que les deux autres indices. Les auteurs soulignent également l'intérêt de l'IBR qui n'est calculé que par de simples transformations mathématiques des données, alors que les autres indices requièrent des connaissances mécanistiques importantes, notamment une connaissance sur les valeurs seuils pour l'établissement des catégories d'effet. Les auteurs ajoutent enfin qu'une meilleure maîtrise des valeurs basales, des valeurs seuils et de

la variabilité naturelle des biomarqueurs permettrait néanmoins de gagner en fiabilité dans le calcul et l'interprétation de l'ensemble des indices.

Plus récemment, la démarche du « Poids de l'évidence » (« Weight of evidence ») a été développée par Piva et al. (2011). Cette démarche présente un intérêt considérable car elle permet la création d'un indice qui intègre à la fois les résultats d'analyses chimiques, d'analyses de la biodisponibilité des contaminants chimiques, des réponses des biomarqueurs mais également des bioessais standardisés en laboratoire. Elle reste cependant assez lourde à mettre en œuvre, par le nombre important d'analyses à réaliser ainsi que par la complexité du traitement des données. Cette démarche a été appliquée avec succès dans le cadre d'un programme de suivi annuel de la qualité de la Seine en amont et en aval de Paris (programme PIREN-Seine) (Barjhoux et al. 2016).

3. UTILISATION DE L'ÉPINOCHÉ À TROIS ÉPINES EN BIOSURVEILLANCE

3.1. Une espèce modèle : l'épinoche à trois épines

L'espèce sentinelle utilisée dans le cadre de ce travail est l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) dont la classification est présentée ci-dessous.

Tableau 4 : Classification de l'épinoche à trois épines



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

L'épinoche à trois épines est une espèce initialement très utilisée dans des études comportementales et notamment pour l'étude du contrôle hormonal du comportement (Mayer et al. 2004). Cependant, depuis une dizaine d'années, on peut noter un intérêt croissant pour l'utilisation de cette espèce en écotoxicologie et plus particulièrement en biosurveillance (Pottinger et al. 2002; Sanchez 2007; Santos 2013; Le Guernic 2015).

L'épinoche présente en effet de nombreuses qualités qui la rendent particulièrement attrayante dans une approche de biosurveillance active. Sa biologie est très bien connue comme en témoignent les nombreux ouvrages publiés sur ce sujet (Wootton 1976, 1984; Bell and Foster

1994; Östlund-Nilsson et al. 2007). Les principales caractéristiques biologiques de l'épinoche sont ainsi résumées dans le tableau 5. C'est une espèce non migratrice et relativement ubiquiste qui colonise les zones tempérées de l'hémisphère nord (Asie, Amérique et Europe du nord). C'est également un poisson euryhalin dont les habitats s'étendent des eaux douces continentales jusqu'aux eaux saumâtres estuariennes, ce qui permet son utilisation au sein d'un continuum eau douce – eau salée. Ces caractéristiques ubiquiste et sédentaire font de cette espèce une très bonne candidate pour une utilisation dans des programmes de biosurveillance. Son statut d'espèce sentinelle est également justifié par sa tolérance aux polluants, qu'ils soient métalliques (Sanchez et al. 2005; Svecevičius 2006) ou organiques (Ernst and Doe 1989; Ernst et al. 1991). Sa petite taille facilite sa manipulation et son maintien en élevage (Pottinger et al. 2002; Sanchez 2007; Le Guernic 2015) et offre un avantage certain dans des approches de biosurveillance active (Le Guernic 2015). L'épinoche à trois épines présente également un régime alimentaire omnivore et varié (petits crustacés, œufs, microalgues) (Wootton 1976) ce qui permet son encagement dans divers types de milieux.

Tableau 5 : Description biologique de l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.). Modifié d'après Sanchez (2007).

Morphologie adulte	Taille	3,5 - 8 cm		
	Poids	0,4 - 1,6 g		
	Apparence	Dimorphisme sexuel marqué en période de reproduction : ventre du mâle coloré en rouge et couleur bleuté dominante sur la partie dorsale, yeux bleu irisés		
Alimentation	Pélagique, omnivore à dominance carnivore (crustacé, oligochètes, chironomes)	Wootton 1976		
Reproduction	Maturité sexuelle	1 an		
	Saison	Avril-Août		
	Support de ponte	ariadnophile	Balon 1975	
	Comportement	Mâles : construction du nid (à base de sédiments agglutinés) comportement de séduction "danse en zig-zag"	Östlund-Nilsson et al. 2007	
		aération des œufs dans le nid durant toute la période d'incubation défense du territoire		
	Femelles : Dépôt des œufs dans le nid			
Habitat	Type d'habitat	Rhéophile, Limnophile		
	Position	Pélagique		
Sensibilité à la pollution	Espèce tolérante	Sanchez et al. 2007		
Optimum physico-chimiques	Température	0 - 34,6°C *		
	Saturation en O₂	8 – 100 %	Wootton 1984	
	pH	5,6 - 11,4		

* : la température maximale critique est fonction de la température d'acclimatation. Cette valeur de 34,6°C a été obtenue après une acclimatation à 22,7°C.

3.2. Biomarqueurs d'intérêt chez l'épinoche

Ce nouvel intérêt de l'épinoche comme espèce modèle en biosurveillance a induit le développement de nombreux biomarqueurs chez cette espèce. Dans le cadre de ces travaux de thèse, cinq grandes fonctions physiologiques ont été investiguées à travers la mesure d'un ou de plusieurs biomarqueurs au sein de chacune d'elles. Tous les biomarqueurs sont connus et utilisés en routine chez l'épinoche à trois épines depuis de nombreuses années. Les deux protéines en lien avec la reproduction, à savoir la vitellogénine (Sanchez et al. 2007) et la spiggin (Katsiadaki et al. 2002; Sanchez et al. 2008a), ont été parmi les premiers biomarqueurs développés chez cette espèce, ce qui la rend particulièrement intéressante pour détecter des potentiels effets perturbateurs endocriniens. Par la suite, le développement des approches multibiomarqueurs a engendré l'adaptation de nombreux biomarqueurs parmi lesquels les paramètres du stress oxydant, les enzymes de biotransformation et les paramètres neuromusculaires (Sanchez 2007). Plus récemment, des marqueurs associés à l'immunité innée, développés et utilisés dans des approches de biosurveillance, ont été mis en évidence comme des paramètres d'intérêt et ont été intégrés à la batterie de biomarqueurs mesurés en routine (Bado-Nilles et al. 2014b; Le Guernic et al. 2016a; Marchand et al. 2017) (figure 3). L'ensemble des biomarqueurs sera décrit et présenté succinctement dans les prochains paragraphes.

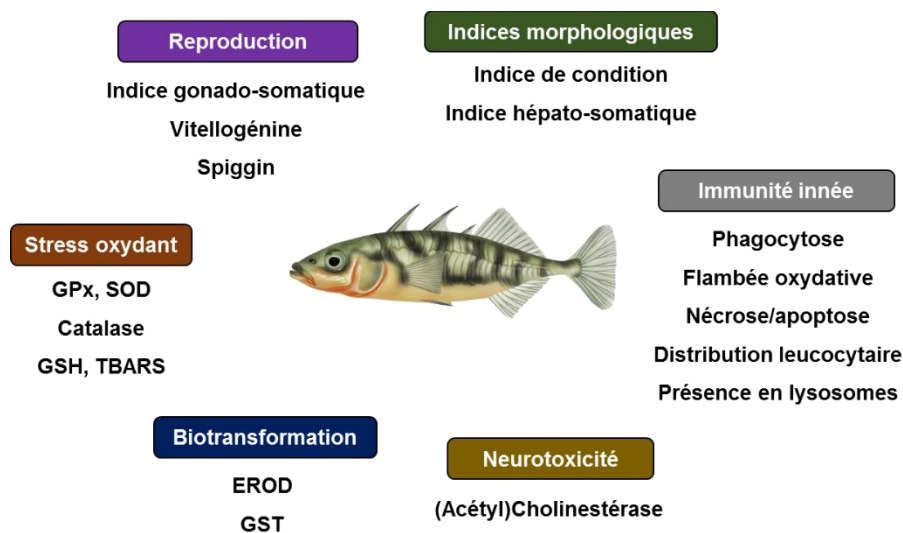


Figure 3 : La batterie de biomarqueurs développée et utilisée en routine chez l'épinoche à trois épines à l'INERIS

3.2.1. Les indices morphologiques

Les indices morphologiques sont des données biométriques permettant d'évaluer le bien être ainsi que le bon développement et la croissance des individus. Les principaux indices utilisés sont calculés à partir du rapport poids/taille des organismes (Bolger and Connolly 1989; Blackwell et al. 2000). Ces indicateurs sont faciles à acquérir et n'induisent pas la mise à mort des individus, ce qui permet d'assurer des suivis temporels. Cependant, ces paramètres sont peu précoces par rapport à d'autres biomarqueurs. Utilisés en association avec d'autres paramètres liés au métabolisme (Amara et al. 2007) ou aux réserves énergétiques (Costalago et al. 2011), ils traduisent à l'échelle individuelle des altérations aux échelles inférieures (moléculaire, cellulaire, tissulaire). Dans le cadre de cette thèse, l'indice morphologique qui a été retenu chez l'épinoche est l'indice de condition de Fulton (1902). De plus, associé à ce paramètre, le calcul d'un indice hépatosomatique permet de donner des informations plus précises quant aux réserves énergétiques disponibles dans le foie des organismes. Cet indice est également considéré comme un indicateur de la condition énergétique générale des individus mais aussi comme un possible marqueur de qualité environnementale (Hinck et al. 2006).

3.2.2. Le système immunitaire inné

Chez les vertébrés, le système immunitaire se divise en deux grandes catégories : l'immunité innée (non-spécifique) et l'immunité acquise (adaptative). Cette fonction physiologique est particulièrement vulnérable face aux pressions environnementales. De nombreux polluants chimiques sont en effet connus pour leurs rôles dans la modulation de ces réponses soit par des phénomènes d'immunostimulation induisant des maladies autoimmunes (Brousseau et al. 1997), soit à l'inverse par une immunosuppression rendant les individus plus sensibles aux tumeurs, cancers et infections pathogènes (Brousseau et al. 1997; Fournier et al. 2000; Bols et al. 2001). Les réponses des paramètres immunitaires aux xénobiotiques sont ainsi considérées comme des réponses très précoces (Fournier et al. 2000; Auffret et al. 2006). Depuis une vingtaine d'années, les biomarqueurs liés à l'immunotoxicité ont été développés et étudiés chez les poissons, et particulièrement les réponses associées à l'immunité innée (Rehberger et al. 2017). L'immunité innée constitue la principale ligne de défense des poissons et se compose des barrières physiques (épithélium, mucus, tractus digestif) ainsi que d'une défense interne humorale, cellulaire et inflammatoire (Magnadóttir 2006; Uribe et al. 2011). La phagocytose est, de loin, le mécanisme le plus étudié (Rehberger et al. 2017). Il s'agit en effet de la fonction principale d'élimination des pathogènes et des agents infectieux. Chez l'épinoche, cette fonction est investiguée à travers l'analyse de la capacité et de l'efficacité d'internalisation des éléments du « non-soi », la flambée oxydative et la présence en

lysosomes. En plus de ces biomarqueurs liés à la phagocytose, la distribution leucocytaire (pourcentage de granulocyte et de lymphocyte sur les lymphocytes totaux) et la mortalité cellulaire (apoptose et nécrose leucocytaire) permettent d'obtenir une idée précise de la structure et de l'état des leucocytes (Bado-Nilles 2008; Le Guernic 2015; Marchand 2018a).

3.2.3. Les enzymes de biotransformation

La biotransformation est un processus de détoxification permettant l'élimination des xénobiotiques hydrophobes absorbés par les organismes. Ce processus se divise en une première phase de **fonctionnalisation**, qui consiste à oxyder la molécule de manière à la rendre plus polaire, et en une seconde phase de **conjugaison** durant laquelle des molécules endogènes hydrophiles vont être fixées au métabolite produit lors de la phase I. Cette phase II permet une augmentation de l'hydrosolubilité de la molécule cible ce qui permet son excrétion par la bile ou l'urine. En raison de son importance dans l'élimination des contaminants, ce processus a été très étudié chez les poissons et plusieurs biomarqueurs impliqués dans les différentes étapes ont été développés. Parmi eux, l'EROD (ethoxy-résorufine-O-déétylase) est une enzyme catalytique des cytochromes P450, principaux acteurs de la phase de fonctionnalisation (Beliaeff and Burgeot 1997; Whyte et al. 2000). L'activité catalytique de ces cytochromes est connue pour être rapidement et fortement induite en présence de polychlorobiphényles (PCB), d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et de certains organochlorés (Whyte et al. 2000; Lee et al. 2013, 2015). D'autres composés exercent quant à eux des actions inhibitrices de l'activité EROD, tels que certains métaux lourds (Cd, Cu) (Flammarion et al. 1998; Stien et al. 1998), des organophosphorés (Flammarion et al. 1998) ou des agonistes du récepteur des œstrogènes (Anderson et al. 1996; Vaccaro et al. 2005). Les nombreuses données existantes sur cette enzyme, sur le terrain comme en laboratoire, en font un des biomarqueurs les mieux documentés, ce qui favorise son utilisation à grande échelle. En complément de l'activité EROD, représentative de la phase I de détoxification, l'activité de la glutathion-S-transférase est également régulièrement prise en compte dans les approches multibiomarqueurs. Cette enzyme catalyse la conjugaison des xénobiotiques avec le glutathion lors de la phase II, augmentant leur hydrosolubilité et permettant leur élimination (Habig et al. 1974).

3.2.4. Le stress oxydant

L'oxygène (O₂) est une molécule essentielle de nombreux systèmes métaboliques chez les organismes aérobies. Pourtant, malgré son caractère vital, l'oxygène induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Ces molécules dérivées de l'oxygène possèdent un électron non apparié, ce qui les rend particulièrement réactives. Elles peuvent ainsi engendrer

d'importants dommages sur les cellules et tissus qu'elles rencontrent. C'est le paradoxe de l'oxygène : une molécule essentielle à la vie mais potentiellement toxique pour les organismes (Davies 1995).

Ces ERO sont normalement produites en continu par les organismes, notamment par la chaîne de transport des électrons, aussi appelée « respiration mitochondriale » considérée comme le mode de production majeur de ces espèces réactives (Lushchak 2011). De nombreuses autres activités enzymatiques sont impliquées dans la formation de ces ERO, dès lors qu'elles catalysent des réactions d'oxydoréduction (monooxygénase des cytochromes P450, xanthine oxydase, tryptophane oxygénase etc.). Les ERO produites peuvent jouer un rôle positif dans l'organisme, comme lors de la phagocytose, lorsqu'ils dégradent les composés internalisés. Ils sont également importants dans la signalisation cellulaire (Thannickal and Fanburg 2000) et dans le maintien de l'homéostasie de la cellule (Ray et al. 2012). En raison de leur importance pour le fonctionnement normal de l'organisme, mais aussi pour limiter les dommages associés à une production trop importante, les organismes ont mis en place des mécanismes de défense antioxydants complexes, basés à la fois sur des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques.

Le stress oxydant est défini comme un déséquilibre entre les systèmes anti-oxydants et les systèmes pro-oxydants. Ce déséquilibre peut être lié à une surproduction d'espèce réactives de l'oxygène (ERO), à une altération des fonctions antioxydantes ou une combinaison de ces deux facteurs. Ce stress oxydant peut être causé par de nombreuses substances telles que les pesticides (Slaninova et al. 2009; Lushchak 2016), les métaux (Farombi et al. 2007; Sevcikova et al. 2011; Lushchak 2016), les composés organiques (Jifa et al. 2006; Zheng et al. 2016) ou les médicaments (Stancova et al. 2017). De nombreux biomarqueurs ont été étudiés au cours de ces 30 dernières années, de la mesure de l'activité des systèmes antioxydants jusqu'à l'évaluation des dommages cellulaires et moléculaires (protéine, ADN) (Stoliar and Lushchak 2012). En raison de leur modulation par une grande variété de xénobiotiques et de leur précocité de réponse, les paramètres associés au stress oxydant sont fréquemment utilisés comme biomarqueurs aussi bien lors d'études en laboratoire que sur le terrain (Van der Oost et al. 2003). Cependant, les réponses obtenues sont parfois difficiles à interpréter d'un point de vue mécanistique, en raison de la complexité des mécanismes mis en œuvre dans la régulation du stress oxydant et du nombre important de molécules chimiques pouvant interférer avec ces mécanismes. Le caractère aspécifique de la réponse des biomarqueurs peut malgré tout constituer un avantage dans un contexte de contamination multiple des écosystèmes.

Parmi tous les biomarqueurs existants, cinq d'entre eux, étudiés chez l'épinoche depuis les années 2000 ont été intégrés à la batterie de biomarqueurs :

- L'activité des superoxydes dismutases (SOD) : les superoxydes dismutases sont des métalloenzymes capables de dismuter l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en oxygène (O_2) et en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (figure 4). L'anion superoxyde est une espèce réactive qui ne peut pas facilement franchir les barrières biologiques, il doit donc être éliminé dans son compartiment de production. Ainsi, différents types de SOD existent dans les différents compartiments cellulaires afin de détoxifier le $O_2^{\bullet-}$ où il est présent : les CuZn-SOD sont majoritairement retrouvées dans le cytosol mais également dans les peroxysomes, le noyau et les lysosomes alors que les Mn-SOD sont essentiellement présentes dans les mitochondries (Orbea et al. 2000).
- L'activité glutathion peroxydase (GPx) : la GPx, de son nom complet la Se-GPx (glutathion peroxydase sélénium-dépendante), est une métalloenzyme tétramérique dont chaque sous-unité contient un atome de sélénium. Elle catalyse la dégradation glutathion-dépendante de nombreux peroxydes, du peroxyde d'hydrogène jusqu'aux peroxydes organiques, en leurs alcools correspondants (figure 4).
- L'activité de la catalase (CAT) : la catalase est une hémoprotéine tétramérique avec un atome de fer par sous-unité. Cette enzyme catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) en eau (H_2O) et en oxygène moléculaire (O_2) (figure 4).
- Le glutathion : en plus d'être le cofacteur de la GST et de la GPx, le glutathion est l'antioxydant non enzymatique majeur des cellules animales. C'est un tripeptide nucléophile qui agit comme donneur d'électron, ce qui lui permet de réagir avec les ERO pour former le radical thiyl (GS^{\bullet}) qui va lui-même former le glutathion oxydé ($GS-SH$) ainsi qu'un anion superoxyde qui sera pris en charge par la SOD (figure 4).

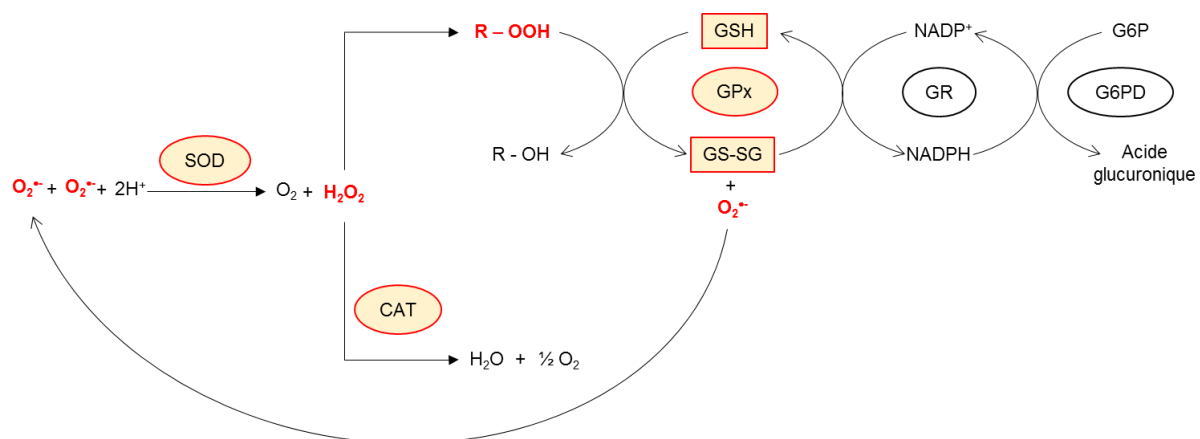


Figure 4 : Mode d'action et lien entre les composants antioxydants étudiés dans le cadre de la thèse. $O_2^{\bullet-}$: anion superoxyde ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; R – OOH : peroxyde ; R – OH : alcool ; GSH : glutathion réduit ; GS-SG : glutathion oxydé ; G6P : glucose-6-phosphate ; G6PD : glucose-6-phosphate déshydrogénase ; SOD : superoxyde dismutase ; CAT : catalase ; GPx ; glutathion peroxydase ; GR : glutathion réductase.

- La Lipoperoxydation : lorsque les défenses antioxydantes sont dépassées (diminution de l'activité des systèmes antioxydants ou surproduction d'ERO), des dommages oxydatifs peuvent apparaître au niveau des protéines, des lipides membranaires et des acides nucléiques. Les dommages oxydatifs sont le plus souvent évalués au niveau des lipides car la plupart des radicaux libres sont lipophiles et attaquent davantage les lipides que les autres composés. De plus, comparés aux autres acides gras (insaturés ou monosaturés), les acides gras polyinsaturés sont les cibles privilégiées de ces ERO (Lushchak 2011). En effet, la peroxydation lipidique est le résultat de la fixation de l'oxygène singulet (1O_2) sur les doubles liaisons carbone-carbone des acides gras ce qui induit la production d'hydroperoxydes. Les acides gras polyinsaturés possèdent plusieurs doubles liaisons, ce qui les rend particulièrement sensibles à l'oxydation. Or ces acides gras polyinsaturés sont beaucoup plus présents dans les membranes cellulaires des organismes aquatiques que terrestres, ce qui favorise l'utilisation des marqueurs de lipoperoxydation chez ces organismes (Lushchak 2011). La lipoperoxydation peut être mesurée grâce au dosage des substances réactives à l'acide thiobarbiturique (TBARS) (Ohkawa et al. 1979).

3.2.5. La reproduction

La reproduction des organismes est une fonction physiologique cruciale dans le maintien des populations dans un écosystème donné. Or, les mécanismes de régulation de cette fonction sont fragiles et peuvent être modifiés en particulier par des substances à effet « perturbateurs endocriniens ». Ces perturbateurs endocriniens, massivement retrouvés dans

l'environnement, sont des molécules qui interfèrent avec la synthèse, la sécrétion, la liaison, l'action ou l'élimination des hormones sur lesquelles reposent les processus en lien avec la reproduction (Kavlock et al. 1996). De nombreuses substances à potentiels effets perturbateurs endocriniens (essentiellement oestrogéniques et anti-androgéniques) sont rejetées dans les milieux aquatiques par les stations de traitement des eaux qui ne sont pas conçues pour les éliminer (Jobling et al. 2009; Chang et al. 2011). Le lessivage des sols et le ruissellement sont également un point d'entrée d'autres substances telles que les pesticides ou les HAP qui peuvent présenter des impacts sur la reproduction des organismes. Ainsi, il apparaît essentiel d'inclure dans une approche multibiomarqueurs des paramètres pouvant mettre en lumière des impacts sur le système reproducteur.

L'épinoche est une espèce modèle connue et utilisée depuis plusieurs années pour l'étude des effets perturbateurs endocriniens (Katsiadaki et al. 2002, 2006). Deux biomarqueurs ont été particulièrement étudiés chez cette espèce : la concentration en vitellogénine et la concentration en spiggin. La vitellogénine est un précurseur des réserves nutritives de l'œuf. Elle est produite chez les femelles par le foie sous contrôle oestrogénique (Rotchell and Ostrander 2003). Ainsi, l'induction de la vitellogénine, en particulier, constitue un biomarqueur d'exposition à des substances œstrogéno-mimétiques (Andersson et al. 2007; Björkblom et al. 2009, 2011). La spiggin est une protéine très hydrophobe naturellement produite dans les reins des mâles lors de la saison de reproduction. Cette protéine permet aux individus d'agglutiner des débris végétaux afin d'assurer la construction du nid. Plusieurs contaminants environnementaux peuvent induire la production de spiggin (Blankvoort et al. 2005), en se liant aux récepteurs des androgènes, aussi bien chez les mâles que chez les femelles, ce qui fait de ce biomarqueur un paramètre d'intérêt pour détecter la présence de composés androgéniques (Katsiadaki et al. 2002, 2006).

Lors d'études *in situ*, il n'est pas possible de connaître à priori le statut reproducteur des individus utilisés. Ainsi, il apparaît difficile de distinguer les effets liés à la reproduction des effets liés à une contamination chimique lors de mesures des concentrations en spiggin chez les mâles et en vitellogénine chez les femelles. Pour s'assurer une bonne interprétation des résultats, seuls les niveaux de vitellogénine chez les mâles et les niveaux de spiggin chez les femelles ont été pris en considération durant l'ensemble de ce travail de thèse.

3.2.6. Les paramètres neuromusculaires

L'influx nerveux est transmis, au niveau des synapses, par une libération d'acétylcholine qui va se fixer sur des récepteurs cholinergiques, provoquant une dépolarisation de la membrane post-synaptique qui va alors se propager le long du nerf. Le système retrouve son état de

repos initial après l'hydrolyse de l'acétylcholine par l'acétylcholinestérase (AChE). L'inactivation de cette enzyme peut induire une accumulation d'acétylcholine au niveau des espaces synaptiques, entraînant une dépolarisation permanente de la membrane et stoppant les transmissions nerveuses. Cette enzyme peut être inhibée par de nombreuses substances, parmi lesquelles les composés organophosphorés et les carbamates (Sturm et al. 1999; Fulton and Key 2001). Le rôle central de l'acétylcholinestérase dans la transmission de l'influx nerveux fait de ce biomarqueur un paramètre largement étudié et pris en compte dans les approches multibiomarqueurs (Sanchez et al. 2007; Linde-Arias et al. 2008; Bessa et al. 2016; Rodrigues et al. 2018). De plus, certaines études mettent en évidence le lien entre une inhibition forte de l'AChE et des troubles du comportement (Rao et al. 2005; Bonansea et al. 2016). Ces perturbations comportementales induites par l'inhibition de l'AChE renforcent encore l'intérêt de ce biomarqueur comme marqueur de neurotoxicité.

4. LES STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USEES (STEU)

Dans le cadre de cette thèse, les études de cas se concentrent essentiellement dans un contexte de contamination par des effluents de stations d'épuration. Ce chapitre a donc pour objectif de présenter quelques éléments sur la réglementation associée aux stations de traitement des eaux usées, sur les principaux procédés de traitement utilisés ainsi que sur les impacts induits par les rejets de ces installations sur les poissons.

4.1. Composition des eaux résiduaires urbaines

L'eau résiduaire urbaine désigne l'eau provenant des activités domestiques normales (eaux fécales, de nettoyage, de cuisine, d'hygiène). La composition de ces eaux brutes en sortie de zone urbaine est variable en fonction des habitudes alimentaires et d'hygiène des populations, mais également de la taille de l'agglomération considérée. La caractérisation physicochimique de ses eaux brutes s'effectue essentiellement à travers l'évaluation des taux de matière en suspension (MES), de carbone organique total (COT) et d'azote, ainsi que de la demande chimique et biologique en oxygène (DBO₅ et DCO₅).

Le tableau 6 présente les valeurs moyennes de ces différents paramètres dans les eaux usées domestiques en Europe de l'Ouest et du Nord (Eme et Boutin 2015). En plus des paramètres physico-chimiques cités, les eaux usées véhiculent de nombreuses souches bactériennes, dont quelques-unes des plus couramment mesurées sont référencées dans le tableau.

Tableau 6 : Composition physico-chimique et pathogénique des eaux ménagères.

MES : Matières en suspension ; DBO₅ : Demande biologique en oxygène ; DCO : Demande chimique en oxygène ; COT : Carbone organique total ; NGL : Azote global ; N : Azote ; KN : Azote Kjeldahl ; PT : Phosphore total.

	Données recensés	Gamme de variation	
	Moyenne	Min	Max
pH	7.5	6.1	9.6
MES (mg/L)	89	20	361
DBO₅ (mgO ₂ /L)	221	20	756
DCO (mgO ₂ /L)	362	25	1583
COT (mgO ₂ /L)	99	10	600
NGL (mg/L)	14	3	75
N orga. (mg/L)	7	7	7
NH₄⁻ (mg/L)	3	1	13
NO₃ (mg/L)	3	0	10
KN (mg/L)	1	0	27
PT (mg/L)	4	0	11
PO₄ (mg/L)	12	0	101
Coliformes totaux (log/100mL) ⁽¹⁾	6.3	7.1	8.3
Coliformes fécaux (log/100mL) ⁽¹⁾	5.5	6.9	8.2
E. coli (log/100mL) ⁽¹⁾	5.9	6.5	7.3
Entérocoques (log/100mL) ⁽¹⁾	4	4.2	4.5

⁽¹⁾ D'après Brehant et al. (2002) : données pour la France uniquement

En raison de l'importante pollution générée par l'usage domestique de l'eau et véhiculée par les effluents urbains, l'eau doit être traitée avant d'être rejetée dans le milieu naturel afin de limiter les impacts sur les écosystèmes et sur la santé.

4.2. Quelques éléments de réglementation

L'assainissement des eaux usées domestiques peut être réalisé par des ouvrages d'assainissement collectifs (station de traitement des eaux) ou non collectifs (fosse septique, épandage). La collecte et le traitement des eaux usées font l'objet de nombreux textes de loi, quel que soit le type d'installation considéré (collective ou non).

A l'échelle européenne, l'assainissement collectif de l'eau est régi par la directive européenne 91/271/CEE du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires (EU Commission 1991). Cette réglementation impose aux pays membres la mise en place d'installations de collecte et de traitement secondaire des eaux pour toutes les agglomérations supérieures à 2000 équivalents habitants (EH) (à l'exception de Mayotte). Ce texte impose

également l'identification de zones sensibles dans lesquelles les obligations d'épuration sont renforcées. Le type de traitement requis est dépendant de la taille de l'agglomération ainsi que de la sensibilité des milieux récepteurs des effluents. Les zones « sensibles » décrites dans la directive correspondent aux zones à forte activité touristique (eaux de baignade), aux zones conchylicoles et aux zones de pompage des eaux d'irrigations.

En France, la réglementation nationale sur l'assainissement des eaux a évolué au fil du temps pour répondre aux nouveaux enjeux sanitaires et prendre en compte les textes européens. Dans le droit français, les principes présentés dans la directive européenne 91/271/CEE se retrouvent à travers plusieurs textes :

- Le code général des collectivités territoriales (article R.2224-6 et articles R.2224-10 à R.2224-17) : il retranscrit la directive européenne, à savoir l'obligation de collecte et de traitement des eaux usées ainsi que l'obligation de traitement plus rigoureux lors d'un rejet dans une zone dite « sensible ».
- L'arrêté du 22 juin 2007 : il regroupe l'ensemble des règles encadrant la construction et le fonctionnement des ouvrages collectifs d'assainissement des eaux ainsi que des ouvrages non collectifs recevant une charge brute de pollution organique supérieure à 1,2kg/j de DBO₅.
- L'arrêté du 21 juillet 2015 : entré en vigueur au 1^{er} janvier 2016, il modifie l'arrêté du 22 juin 2007, notamment en précisant certains éléments liés à la gestion et au suivi des boues d'épuration, en introduisant la gestion des eaux pluviales, le suivi des micropolluants et la prise en compte des coûts et bénéfices lors du choix des solutions techniques utilisées. En annexe de cet arrêté se retrouve également la retranscription de la directive européenne concernant les recommandations sur les performances minimales que doivent atteindre les installations d'assainissement pour les paramètres précédemment cités.

4.3. Processus d'assainissement des eaux urbaines dans les stations de traitement des eaux usées (STEU)

Pour atteindre les rendements d'assainissement des eaux usées préconisés dans la directive européenne, l'eau entrante dans les STEU passe par plusieurs étapes de traitement : un **pré-traitement** ou **traitement primaire** (obligatoire) pour retirer les solides et les graisses flottantes en surface, un **traitement secondaire** (obligatoire depuis la directive européenne de 1991) d'élimination des matières minérales et organiques en solution dans l'eau et un

traitement tertiaire (facultatif, sauf pour les zones « sensibles ») le plus souvent de désinfection de l'eau. Chaque étape de traitement peut s'effectuer par des méthodes différentes qui seront choisies en fonction de la taille de l'installation et du rapport coût/bénéfice. Les paragraphes suivants décrivent les processus de traitement les plus fréquemment utilisés.

4.3.1. Le pré-traitement (ou traitement primaire)

Toutes les stations d'assainissement des eaux usées assurent un pré-traitement. Il s'agit de retirer mécaniquement les éléments solides les plus accessibles (Gerba and Pepper 2009). La première étape de dégrillage permet de filtrer, grâce à des grilles de différentes tailles, les objets solides les plus volumineux qui flottent en surface (déchets plastiques, bois...). Ces déchets seront envoyés en décharges ou incinérés. L'eau va ensuite passer par une seconde étape de dessablage qui va induire l'élimination des solides plus fins (sable, graviers) par sédimentation au fond du bac. Les solides récupérés à cette étape pourront être lavés et réutilisés ou envoyés en décharges. Enfin, une étape de déshuilage/dégraissage va retirer les matières grasses de la colonne d'eau et flottantes en surface. Pour favoriser la flottaison, des bulles d'air sont injectées à partir du fond du dégraisseur (figure 5).

Parfois, ce traitement primaire obligatoire s'accompagne d'une quatrième étape de décantation qui doit permettre d'éliminer les particules solides les plus fines. Cette décantation peut être naturelle ou accélérée par un mécanisme de coagulation-floculation (ajout de sels métalliques et de polymères). Cette seconde stratégie est utilisée dans un objectif d'élimination des colloïdes (particules de diamètre de 1nm à 1µm).

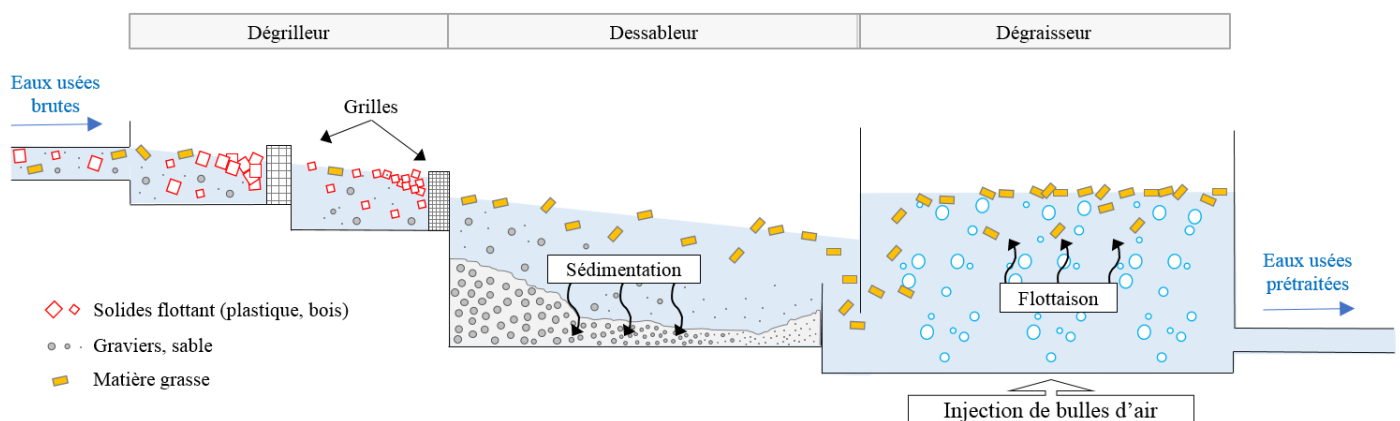


Figure 5 : Schéma des trois étapes obligatoires de pré-traitement des eaux usées après leur entrée dans la station de traitement

4.3.2. Le traitement secondaire

Le traitement secondaire consiste à dégrader biologiquement les particules organiques qui restent en suspension après le traitement primaire. Une grande variété de micro-organismes, essentiellement des bactéries, interviennent dans ces processus. Ces bactéries peuvent être fixées sur des supports en plastique, le plus souvent du PVC, ou constitués de matériaux plus naturels (pierre, céramique, houille) : il s'agit alors de « cultures fixées » par opposition aux « cultures libres » dans lesquelles les micro-organismes se développent naturellement (Gerba and Pepper 2009).

En France, le mode d'épuration le plus classiquement utilisé est le procédé à « boues activées », qui est une méthode en culture libre (Miquel 2003). Il s'agit d'un système d'épuration aérobie. Ce système se compose d'un bassin d'aération, dans lequel l'eau est brassée continuellement pour y introduire l'oxygène nécessaire au développement des bactéries. Ces bactéries transforment les composés organiques en carbone (sous forme de CO_2). Le stock de bactéries formé dans ce bassin d'aération est appelé « boues activées ». Après un temps de séjour dans le bassin d'aération, l'eau et les boues sont envoyées dans un clarificateur (ou décanteur secondaire) qui permet la séparation des phases solides et liquides. L'eau ainsi traitée peut alors subir un traitement tertiaire ou être directement rejetée dans le milieu. Les boues, quant à elles, sont envoyées dans une unité de traitement spécifique (filaire boue) en vue de leur épandage agricole ou de leur élimination. Une partie de ces boues va cependant être conservée et réinjectée au niveau du bassin d'aération afin de réinoculer le milieu (processus de recirculation des boues) (figure 6).

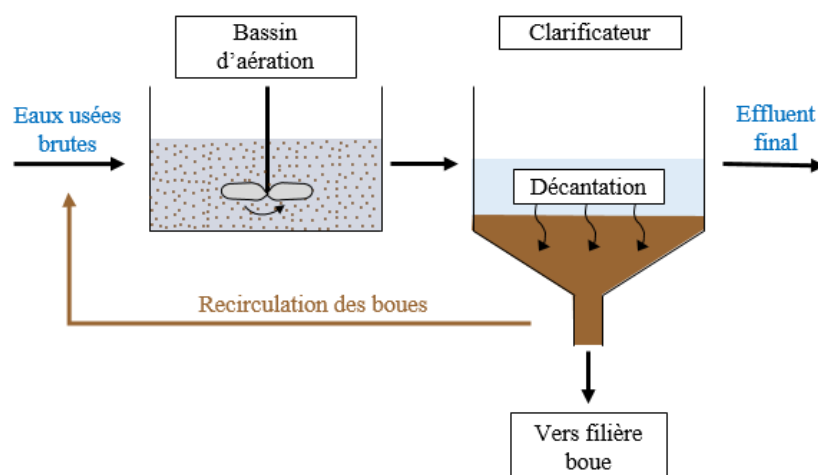


Figure 6 : Schéma du procédé d'épuration secondaire par « boues activées »

Lorsque l'effluent est rejeté dans une zone sensible à l'eutrophisation, la directive relative au traitement des eaux résiduelles urbaines préconise un traitement plus rigoureux de l'azote et

du phosphore. Différentes étapes sont alors ajoutées au procédé de traitement de base afin d'optimiser la suppression de ces nutriments. L'élimination de l'azote s'effectue grâce à l'utilisation des propriétés nitrifiantes et dénitrifiantes de certaines communautés bactériennes. En présence d'oxygène, l'ammoniac (NH_4^+) présent dans les eaux brutes est oxydé en nitrites (NO_2^-) par des bactéries du genre *Nitrosomonas* (processus de nitrification) puis ces nitrites sont oxydés en nitrates (NO_3^-) par des bactéries du genre *Nitrobacter* (processus de nitrification). En absence d'oxygène, ces nitrates sont dégradés en azote gazeux (N_2) par désoxygénation grâce à l'action de bactéries du genre *Pseudomonas*, *Achromobacter* ou *Micrococcus* : c'est la dénitrification. Ces processus de nitrification-dénitrification dans les eaux usées sont mis en place grâce à une alternance de phases aérobies et anaérobies (Bouaoun and Aoun 2004). Par rapport au procédé de base décrit précédemment, il s'agit d'ajouter un ou plusieurs bassins d'anaérobiose dans lesquels les eaux brutes doivent transiter. Le schéma d'aménagement dépend de la taille de la station de traitement ainsi que du volume d'eau à traiter. Les gestionnaires peuvent choisir de faire recirculer les eaux du bassin aéré dans un bassin en anaérobiose (traitement par « recirculation », figure 7. A), ou de faire circuler l'eau à travers plusieurs bassins aérés et non aérés (traitement par « alternance » (figure 7. B)

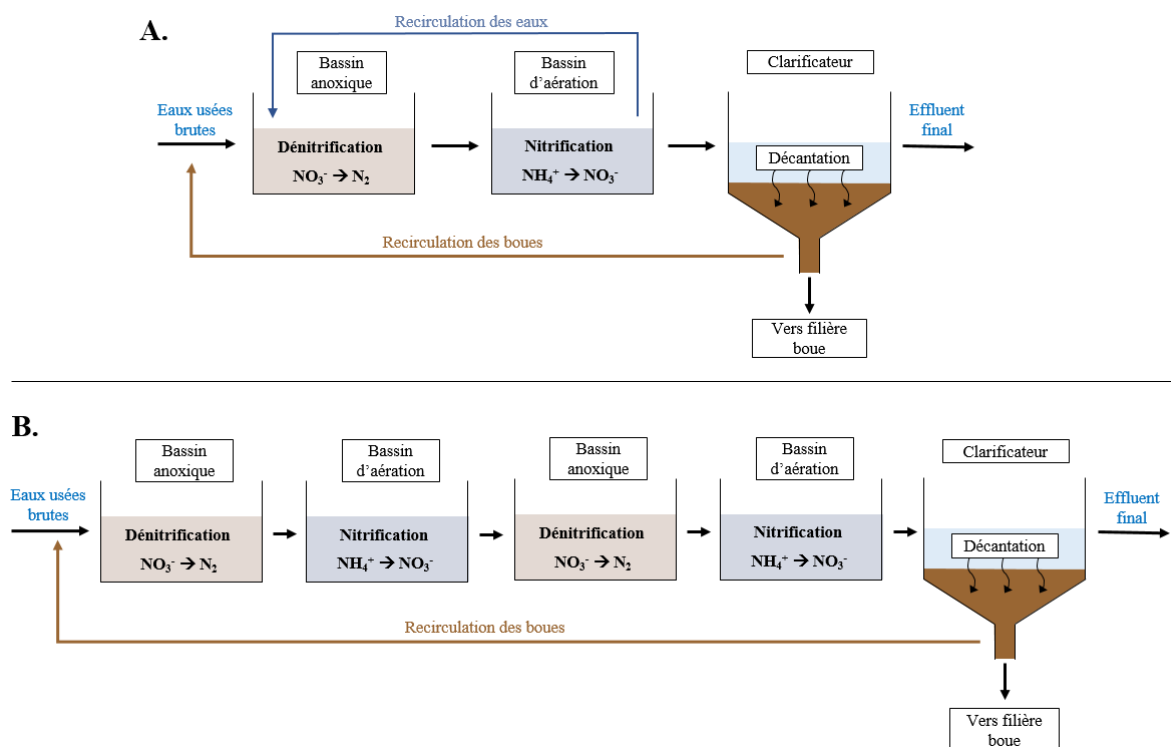


Figure 7 : Schéma des procédés d'élimination supplémentaire de l'azote lors du traitement par boues activées : (A) Processus d'élimination par RECIRCULATION, (B) Processus d'élimination par ALTERNANCE

L'élimination du phosphore peut quant à elle s'effectuer à travers un traitement biologique, un traitement chimique ou par un couplage des deux méthodes. Le traitement biologique du

phosphore s'effectue grâce à des bactéries déphosphatantes (organismes accumulateurs de phosphate) associées à une alternance de phases aérobies/anaérobies, comme pour le traitement de l'azote (Bouaoun and Aoun 2004; Deronzier and Choubert 2004). Cependant, la pluviométrie, la température et les variations journalières des concentrations de l'influent peuvent limiter l'efficacité de ce processus. C'est pourquoi, la plupart des stations de traitement des eaux usées applique une méthode chimique basée sur la coagulation en complément de ce processus biologique. Une décantation secondaire permettra alors d'éliminer ces particules.

4.3.3. Le traitement tertiaire

Les traitements tertiaires sont initialement définis comme des étapes supplémentaires permettant d'améliorer l'abattement de la matière organique, du phosphore et de l'azote mais également des pathogènes (Gerba and Pepper 2015). Cependant, en ce qui concerne le phosphore et l'azote, l'optimisation du processus de traitement par boues activées est le plus souvent considérée comme un traitement secondaire avancé. Pour la matière organique, la décantation facultative décrite dans l'étape de traitement primaire peut également être effectuée après le traitement secondaire, et sera alors considérée comme un traitement tertiaire. Cette décantation peut, dans les systèmes les plus avancés technologiquement, être accompagnée par une série de filtrations (microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration, filtration sur charbon actif) suivie par un processus d'osmose inverse, qui ne laisse passer que les molécules d'eau. Ces procédés sont cependant peu déployés dans le réseau d'assainissement collectif en France en raison de leurs coûts.

Dans la majorité des cas, les traitements tertiaires consistent essentiellement en une réduction de la charge pathogénique de l'effluent avant son rejet dans le milieu. Ces traitements ne sont pas systématiques, sauf en cas de rejet dans une zone sensible. Les techniques conventionnelles de désinfection sont la chloration, l'ozonation et l'irradiation par les UV. La chloration consiste à ajouter du chlore (hypochlorite de sodium) afin d'éliminer les bactéries et les virus. Cette méthode est la plus couramment utilisée, en raison de son faible coût, mais induit dans certains cas des problèmes de toxicité de l'effluent liés à la présence de sous-produits (Abarnou et al. 1990; Pignata et al. 2012). Le traitement par ozonation, consiste à utiliser les propriétés oxydantes de l'ozone pour dégrader la paroi bactérienne et oxyder les composants cellulaires (protéine, ADN). Cependant, ce type de traitement est très minoritaire en France puisque la seule station équipée d'une installation d'ozonation est la STEU de Sophia-Antipolis (30000 EH). Les techniques de filtration et d'osmose inverse sont également efficaces en désinfection et présentent l'avantage de ne pas former de sous-produits pouvant nuire à l'environnement (Diaz 2001).

Cependant, malgré toutes ces étapes de traitement, les effluents de station d'épuration présentent souvent une contamination chimique à divers micropolluants.

4.4. Les stations d'épuration comme source d'émission de micropolluants

Les micropolluants (MP) regroupent de nombreuses familles de molécules d'origine naturelle mais surtout anthropique ainsi que leurs métabolites. La présence de ces MP dans différentes matrices (eaux superficielles, effluents de STEU, eaux souterraines, eau potable), a été largement étudiée et mise en évidence, en particulier en ce qui concerne les composés oestrogéniques et anti-androgéniques (Byrns 2001; Murk et al. 2002; Nakada et al. 2004). Cette catégorie de molécules regroupe par exemple des œstrogènes naturels (17- β œstradiol) et de synthèse (éthynylœstradiol) ainsi que des molécules issues de l'industrie telles que le bisphénol A ou encore des alkylphenols. Des hormones stéroïdiennes comme la testostérone, l'androstènedione, la progestérone ou la dihydrotestostérone sont également fréquemment retrouvées dans les effluents de STEU (Kirk et al. 2002). Cependant, même si les composés à effets perturbateurs endocriniens sont les plus documentés en ce qui concerne les effluents, de nombreux autres micropolluants y sont également retrouvés (microplastiques, pesticides, médicaments, HAP, PCB etc.) (Deblonde et al. 2011; Metcalfe et al. 2014; Luo et al. 2014; Mason et al. 2016; Kim et al. 2016). Il apparaît ainsi que ces polluants sont largement retrouvés à travers le monde à des concentrations de l'ordre de quelques nanogrammes ou microgrammes par litre (Clara et al. 2005; Metcalfe et al. 2014; Blum et al. 2018).

Les traitements mis en place au sein des STEU ne permettent pas d'éliminer complètement ces molécules persistantes. Une grande partie d'entre elles passe à travers les différentes étapes de traitement et se retrouve rejetée avec les effluents dans l'eau. Ainsi, selon les caractéristiques des molécules (hydrophobicité, biodégradabilité, volatilité), les taux d'élimination par les STEU sont très variables et compris entre 12,5 et 100 % (Luo et al. 2014). Cette variabilité pour une substance donnée est liée au type d'installation considéré, aux conditions opérationnelles de mise en œuvre (i.e. dimensionnement) mais également aux facteurs liés à la physico-chimie de l'eau.

Il n'existe pas de traitements tertiaires spécifiques pour l'élimination des MP. Cependant, de nombreuses études existent ou sont en cours pour évaluer la capacité des traitements existant à éliminer les MP. Ainsi, l'efficacité de l'ozonation sur la dégradation de 76 micropolluants organiques et métalliques a été testée dans le cadre du projet Micropolis-Procédé sur le site de Sophia-Antipolis. Cette étude a mis en évidence la grande efficacité de ce processus de traitement dans l'élimination des molécules organiques (i.e. hormones, antibiotiques) avec un

rendement compris entre 70 et 100 %. Ce procédé ne présente cependant aucun effet sur l'abattement des métaux (Choubert et al. 2017). La filtration sur charbon actif (poudre ou grain) présente également une bonne capacité d'élimination de composés organiques avec un rendement compris entre 50 % et 90 % selon les substances (Mailler et al. 2016). Les bons résultats obtenus dans l'élimination des micropolluants par ces procédés ont encouragé la Suisse à adopter un vaste plan « anti-micropolluants » : le pays a décidé d'en équiper ses 120 installations de traitement d'ici 2035 (Roussel 2016).

Cependant, à l'exception de l'exemple Suisse, peu de STEU en France et dans le monde sont équipées d'installations de ce type, capables d'éliminer efficacement les micropolluants. En raison de leur présence généralisée en sortie de STEU, les effluents sont aujourd'hui considérés comme la source majeure d'entrée de ces micropolluants dans l'environnement (Kasprzyk-Hordern et al. 2009). De plus, au-delà de la contamination chimique, les STEU peuvent induire des modifications physicochimiques en aval des rejets (i.e. augmentation de la température, de la conductivité, diminution du taux d'oxygène) qui peuvent également avoir des effets néfastes sur les organismes et les écosystèmes.

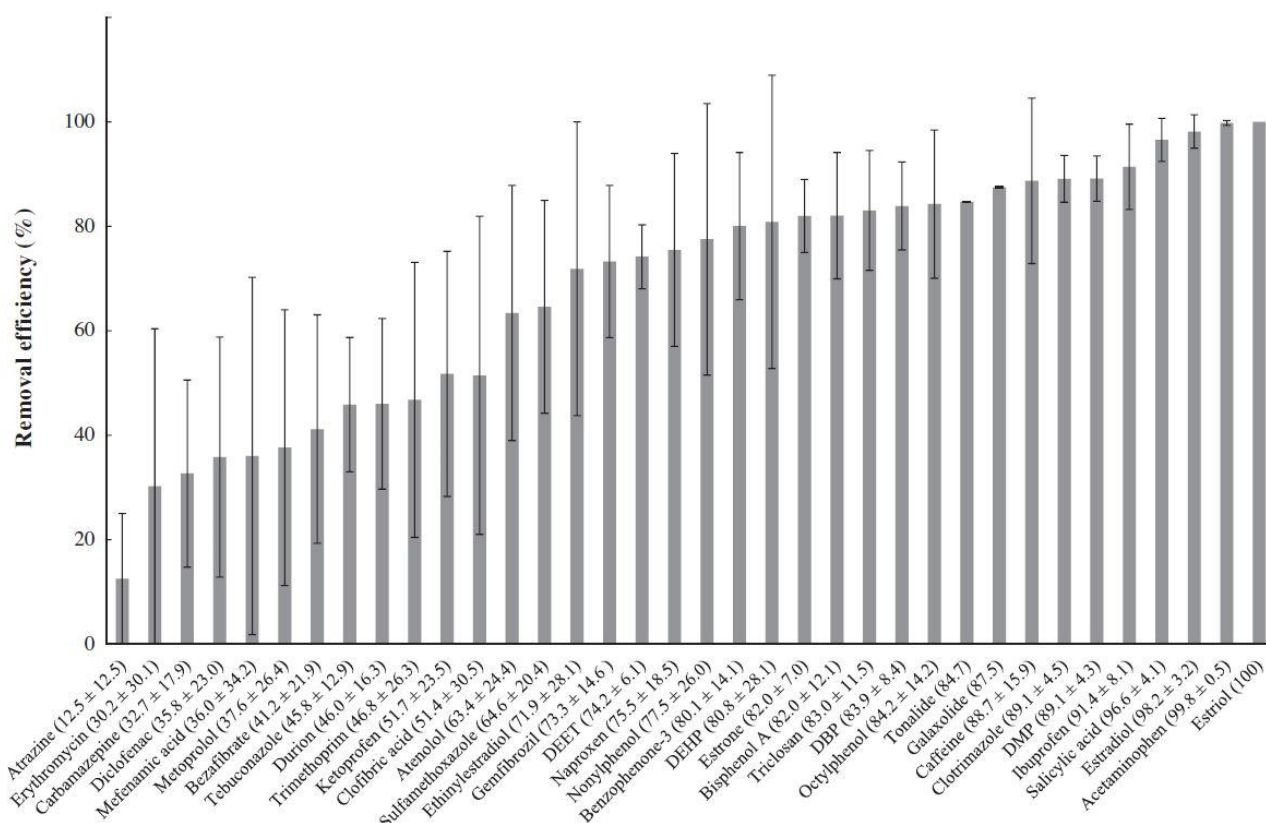


Figure 8 : Pourcentage d'élimination de quelques micropolluants par les STEU (d'après Luo et al. 2014).

4.5. Impacts des effluents de station d'épuration sur les poissons

Les impacts de la pollution induits par les effluents de stations d'épurations ont été souvent démontrés par le passé, notamment chez les poissons. En particulier, plusieurs auteurs ont mis en évidence des effets oestrogéniques à travers des augmentations de la concentration en vitellogénine chez des ombles de fontaine (*Salvelinus fontinalis*) et des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) encagées en aval de STEU (Larsson et al. 1999; McGovarin et al. 2018). Des effets anti-androgéniques ont également été mis en évidence chez des têtes de boule (*Pimephales promelas*) exposés à un effluent en laboratoire pendant 14 ou 28 jours (Vajda et al. 2011). Les auteurs ont notamment observé une diminution de l'abondance des spermatozoïdes ainsi qu'une réduction des tubercules nuptiaux associés à une augmentation de la concentration en vitellogénine après 14 jours d'exposition. Ces observations biologiques ont été complétées par des mesures chimiques qui ont confirmé la présence d'oestrogènes dans l'effluent testé. Des expositions chroniques (300 jours) de gardons juvéniles (*Rutilus rutilus*) à plusieurs dilutions d'effluents de STEU ont mis en évidence une féminisation des mâles (induction de vitellogénine et altération des gonades) associée à un développement rénal anormal ainsi qu'à une modulation de l'immunité et une génotoxicité marquée chez les individus exposés (induction du nombre de micronoyaux et des cassures simple brin dans les branchies et les cellules sanguines) (Liney et al. 2006). Enfin, de nombreux cas d'intersexualité chez les individus mâles ont été mis en évidence chez des poissons prélevés en aval de STEU au Royaume-Unis (Jobling et al. 1998, 2009), au Canada (Tetreault et al. 2011; Bahamonde et al. 2015), aux Etats-Unis (Woodling et al. 2006; Vajda et al. 2008, 2011) et même en France, où des cas d'intersexualité chez le goujon ont été mis en évidence dans des rivières très urbanisées (Aerle et al. 2001).

Outre ces effets sur les paramètres de la reproduction, une augmentation du stress oxydant en aval des effluents de STEU a souvent été mise en évidence. Par exemple, McGovarin et al. (2018) ont montré une augmentation des TBARS dans les branchies des ombles de fontaine associée à une diminution du GSH total. De la même façon, Sturve et al. (2008) ont mesuré une augmentation des activités glutathion-réductase et catalase chez la truite arc-en-ciel exposée en laboratoire à des effluents municipaux. Pérez et al. (2018) ont mis en évidence un stress oxydant dans le foie et les branchies (modification des enzymes antioxydantes et apparition de dommages lipidiques) de prochilodes rayés (*Prochilodus lineatus*) encagés 15 jours dans un effluent de STEU. Cette augmentation a été associée à une augmentation de la caspase-3 (rôle dans le déclenchement de l'apoptose cellulaire) et à une diminution de la prolifération cellulaire dans le cerveau des poissons. Les effets étaient surtout visibles chez les poissons encagés dans l'effluent, et n'étaient pas mesurables chez les poissons encagés

plus en aval, ce qui suggère une forte dilution des contaminants dans la rivière. Les biomarqueurs du stress oxydant et du stress métabolique ont ainsi été mis en évidence comme étant des biomarqueurs pertinents pour discriminer des poissons encagés en amont et en aval d'un effluent (Cazenave et al. 2014).

Des modifications des paramètres immunitaires ont également été mis en évidence en aval d'effluents de STEU, notamment avec une diminution de l'hématocrite et du taux de neutrophile associés à une augmentation du taux de monocytes chez des juvéniles de prochilodes rayés exposés directement à un effluent (Cazenave et al. 2014). Une diminution de l'activité de phagocytose (capacité et efficacité d'internalisation) a également été observée (i) chez des vairons d'eau douce (*Notropis hudsonius*) collectés en aval de Montréal (Ménard et al. 2010), (ii) chez des poissons rouges (*Carassius auratus*) exposés 30 jours en laboratoire à un effluent dilué au dixième et au vingtième (Kakuta 1997), (iii) chez des jeunes truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposées une semaine à différentes dilutions de l'effluent issu de la STEU de Montréal (Salo et al. 2007). Plusieurs auteurs ont mis en évidence une absence de réponse immunitaire des poissons en présence de pathogènes après une exposition à un effluent de STEU (Kakuta 1997; Hoeger et al. 2005).

Associés à ces effets subcellulaires, de sévères altérations histologiques ont été observées chez des truites communes (*Salmo trutta*) encagées en aval de STEU. Ces effets ont été particulièrement observés sur les branchies (i.e. fusion des lamelles secondaires, hyperplasie des cellules de l'épithélium et du mucus), le foie (i.e. hypertrophie des cellules, nécroses cellulaires) et sur les reins (i.e. présence de tissus hématopoïétiques en partie nécrosés) (Vincze et al. 2015). Ces effets ont été reliés à une importante bioaccumulation de divers HAP dans les organismes.

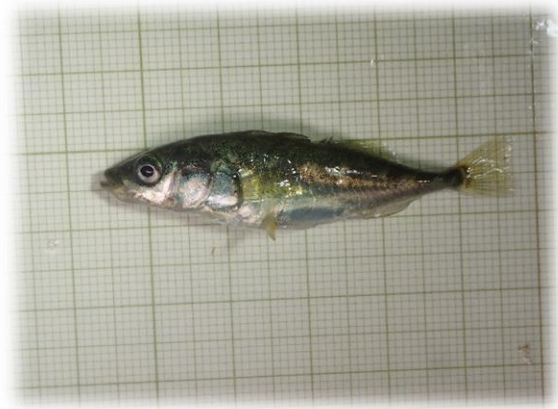
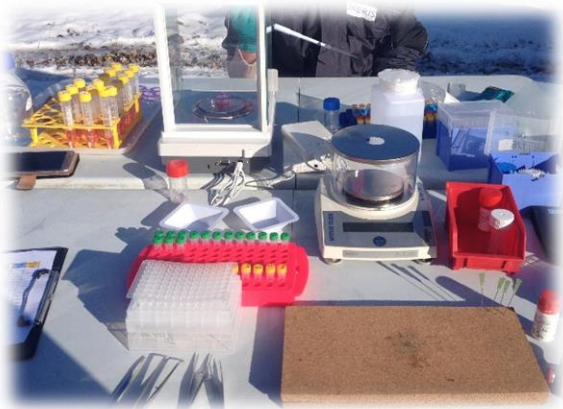
Une accélération du métabolisme général (mise en évidence par l'augmentation de la consommation d'oxygène) a été montrée chez la perche soleil (*Lepomis macrochirus*) exposée à un effluent (Du et al. 2019). Lazaro-Côté et al. (2018) ont également montré une activation du métabolisme anaérobie en aval d'un effluent chez des têtes de boule, et ont fait l'hypothèse que cette activation était liée à une augmentation de la température du milieu induite par l'effluent. Ainsi, cette étude met en lumière que les effluents de STEU, en plus d'être responsables de l'apport de contaminants chimiques, peuvent induire une modification des conditions physicochimique en aval des rejets (i.e. température, salinité, conductivité) qui peuvent également être à l'origine de modifications physiologiques chez les poissons.

Enfin, des études ont montré un stress global chez des poissons encagés en aval de STEU, notamment avec des modifications importantes dans l'expression de gènes impliqués dans la

nécrose cellulaire, le métabolisme énergétique en général, le fonctionnement des récepteurs hormonaux et le système immunitaire (Ings et al. 2011; Simmons et al. 2017).

Toutes les études présentées ci-dessus soulignent la nécessité d'étudier de nombreux paramètres afin de caractériser efficacement les potentiels effets des effluents de STEU sur les organismes. Ainsi, l'approche multibiomarqueurs déployée dans le cadre de cette thèse semble *a priori* tout à fait adaptée dans ce contexte de contamination.

CHAPITRE 2 : ASPECTS METHODOLOGIQUES



1. CARACTERISATION DES EFFETS DIRECTS ET INDIRECTS DE L'ENCAGEMENT SUR LA BATTERIE DE BIOMARQUEURS

1.1. Contexte et objectifs

L'utilisation d'espèces encagées dans un contexte de surveillance des milieux aquatiques permet en particulier de s'affranchir de certains facteurs confondants, de limiter la variabilité naturelle et de ménager les populations naturelles. Cette stratégie permet également d'utiliser une espèce modèle pour l'étude de systèmes dans lesquels elle n'est pas présente naturellement, ou dans lesquels elle est déjà menacée de disparition. Cependant, l'encagement induit également son lot de facteurs confondants pouvant influencer les réponses des biomarqueurs et dont la connaissance et la maîtrise sont absolument nécessaires à la bonne interprétation des résultats (Oikari 2006; Trevisan et al. 2013; Le Guernic et al. 2016b).

Lors d'une précédente étude, la densité maximale pour laquelle aucun effet n'est mesurable sur les paramètres physiologiques de l'épinoche a été déterminée à 2.31kg/m³ (Le Guernic et al. 2016b). De plus, cette étude avait démontré qu'un jeûne de 14 jours induisait des effets néfastes sur les paramètres du système immunitaire. Enfin, l'étude avait également mis en évidence un important stress oxydant chez les poissons subissant un stress lié au transport avant dissection. Cette étude avait ainsi permis d'émettre des recommandations quant à la densité maximale d'épinoches à placer dans les cages ainsi que sur la nécessité de ne pas transporter les poissons au laboratoire avant la dissection finale. Ces recommandations avaient cependant été émises pour une durée de 14 jours, et sur des sites contaminés. Or, dans le cadre de cette thèse, le temps d'encagement des épinoches a été fixé à 21 jours afin (i) de se placer à un temps d'exposition similaire aux expositions standardisées en laboratoire et (ii) de maximiser les chances d'observer des effets, notamment sur des paramètres comme la vitellogénine et la spiggin.

Les premiers travaux réalisés dans le cadre de cette thèse avaient pour objectif de compléter la caractérisation des facteurs confondants liés à l'encagement sur la batterie de biomarqueurs, et ce, pour une durée de 21 jours d'encagement. En particulier, l'étude visait à caractériser les effets potentiels directs (confinement) et indirects (restriction d'accès à la nourriture) d'un encagement de 21 jours. Ces effets ont été testés à deux saisons différentes : au printemps (avril), durant la saison de reproduction des épinoches, et en automne (octobre), pendant la période de repos qui suit la reproduction.

1.2. Matériel et méthodes

Les expériences se sont déroulées dans des bassins extérieurs non contaminés aménagés avec des végétaux et colonisés naturellement par différents macro-invertébrés (crustacés, chironomes, gastéropodes, etc.). Les épinoches utilisées pour les deux expérimentations provenaient de la même génération et présentaient des différences de taille et de poids liées à leur croissance au cours de l'année ($4,15 \pm 0,28$ cm ; $1,03 \pm 0,24$ g en avril et $4,95 \pm 0,48$ cm ; $2,16 \pm 0,55$ g en octobre). Quatre conditions différentes ont été mises en place pendant 21 jours : « libres-nourris », « libres-non-nourris », « encagés-nourris » et « encagés-non-nourris » ($n = 15$). Les épinoches nourries ont reçu un apport quotidien de vers de vase, à raison de 16 % g/g de poisson au printemps et 9 % g/g de poisson en automne (Ocean Nutrition). Les paramètres physicochimiques de l'eau (pH, température, taux d'oxygène et conductivité) ont été mesurés à la fin de chaque expérimentation. La batterie de biomarqueurs a été mesurée sur chaque individu et les différentes conditions ont été comparées entre elles afin d'estimer les effets du confinement, du manque de nourriture ainsi que de l'interaction de ces deux facteurs.

1.3. Synthèse des principaux résultats

L'ensemble des effets des facteurs de stress mesurés sur les différents biomarqueurs est résumé dans la figure 9. Les effets de la restriction d'accès à la nourriture ont été plus marqués que les effets du confinement, avec davantage de paramètres modulés par ce facteur de stress.

D'une manière générale, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence les points suivants :

- Les paramètres liés au système immunitaire ainsi que l'activité AChE ne sont pas affectés par les facteurs testés
- Les modifications induites par l'encagement étaient bien plus marquées au printemps, lors de la période de reproduction
- De nombreux biomarqueurs ont été affectés par les 21 jours de restriction alimentaire, essentiellement pendant la période de reproduction (Avril)
- Le confinement en tant que seul facteur de stress n'a pas induit d'effets sur la majorité des biomarqueurs étudiés
- En revanche, le stress de confinement a accentué les effets liés à la restriction d'accès à la nourriture

- En dehors de la période de reproduction, les impacts des facteurs liés à l'encagement sur la batterie de biomarqueurs mesurée chez l'épinoche à trois épines sont faibles

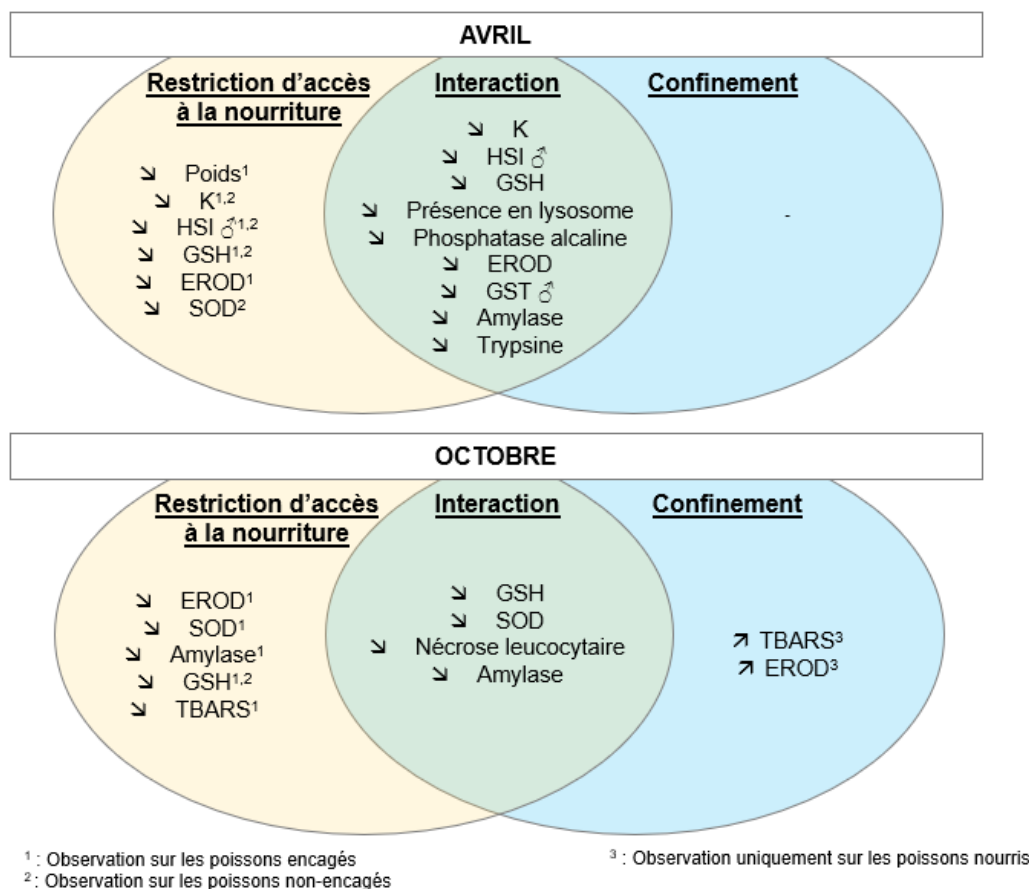


Figure 9 : Modulations des biomarqueurs mesurés en fonction du stress testé (confinement, restriction alimentaire, combinaison des deux stress) lors des deux expériences réalisées dans cette étude

Cette étude a permis de confirmer et de compléter les recommandations émises précédemment :

- (1) A une densité maximale de 2,31 g/L, le confinement n'induit pas de modification des fonctions physiologiques après 21 jours d'encagement
- (2) L'encagement d'épinoche à trois épines doit s'effectuer préférentiellement en dehors de la période de reproduction, durant laquelle les besoins énergétiques sont moins importants
- (3) L'apport de nourriture extérieure n'est pas nécessaire pour maintenir les fonctions physiologiques en dehors de la période de reproduction

L'ensemble de ces résultats est présenté dans l'article 1 « Impact of confinement and food access restriction on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) during caging: a multi-biomarker approach ». Ces recommandations ont été appliquées pour l'ensemble des expérimentations *in situ* réalisées dans le cadre de cette thèse.

ARTICLE 1: IMPACT OF CONFINEMENT AND FOOD ACCESS RESTRICTION ON THE THREE-SPINED STICKLEBACK (*GASTEROSTEUS ACULEATUS*, L.) DURING CAGING: A MULTI-BIOMARKER APPROACH

(Fish Physiology and Biochemistry, 2019, 45(4):1261-1276,

DOI: 10.1007/s10695-019-00670-1)

Authors

Audrey Catteau^{1*}, Antoine Le Guernic^{1,2}, Adrien Marchand¹, Younes M.I. Hani^{1,2}, Olivier Palluel¹, Cyril Turiès¹, Anne Bado-Nilles¹, Odile Dedourge-Geffard², Alain Geffard², Jean-Marc Porcher^{1*}

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

²Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), UMR-I 02 SEBIO, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims, France.

*Corresponding authors:

audrey.catteau@ineris.fr, phone: +33 3 44 61 81 78;

jean-marc.porcher@ineris.fr, phone: +33 3 44 55 65 84

Abstract

Caging is an active biomonitoring strategy that employs a sentinel species, sometimes a species naturally absent from the studied site, in the surveillance of water bodies to verify whether biota may be at risk. The main advantage of caging is the possibility to standardize several biotic and abiotic parameters. However, little knowledge is available about the effects of confinement on physiology and metabolism of caged organisms. The aim of this study is to characterize confinement and food access restriction effects, induced via caging experiments using a multi-biomarker approach (biometric data, immunity, antioxidant, metabolic detoxication and digestive enzymes). The study has been undertaken using the same experiment conducted in ecosystem conditions using three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) during two different periods: one in April, corresponding to breeding season, and the other in October, outside breeding season. Fifteen fish were maintained for 21 days in different conditions (caged or uncaged and with or without food-supply). The main result was that confinement stress had little impact on the biological markers of sticklebacks. However, the stressors seemed to increase the negative effects of food restriction on these biomarkers, when sticklebacks needed more energy, that is, during their breeding period. Outside breeding period, most investigated biomarkers were not impacted by caging. This study showed a way to specify the conditions of application and interpretation of biomarkers during active monitoring to ensure an effective, reliable diagnosis of water body quality.

Keywords

Caging, Food Restriction, Biomonitoring, Biomarkers, Fish

1. Introduction

According to the European Union Water Framework Directive, the assessment of the ecological status of aquatic ecosystems is based on both chemical and ecological status of the water bodies. However, the ecological approach can neither determine the origin of changes in plant and animal populations (composition and/or abundance) nor avoid them. Over the past decades, some tools were proposed to fill this lack of predictivity with an increasing interest in biomarker approaches. Biomarkers are defined as observable and measurable morphological, behavioural, functional or structural changes in organisms reflecting an interaction between a biological system and a potential hazard, which may be chemical, physical or biological (Peakall and Walker 1994; Van der Oost et al. 2003). They can be measured at different scales from individual to cellular and molecular levels. For the purposes of this study, this definition has been repeatedly revised to incorporate the following essential criteria: a biomarker should be sensitive to xenobiotic exposure, it should be reliable, relatively cheap and easy to perform, and mechanisms that occur between biological responses and exposure to pollutants should be well known (Van der Oost et al. 2003).

Aquatic organisms are usually exposed simultaneously to a wide range of pollutants and are subjected to various effects of these xenobiotics. In this context, a multi-biomarker approach based on measurement of several biomarkers, representative of some major vital physiological functions, appeared necessary (Galloway et al. 2004). This approach is increasingly being used for environmental monitoring programs (Flammarion et al. 2002; Sanchez et al. 2007; Le Guernic et al. 2016a).

Two strategies of biomonitoring have been developed: passive biomonitoring, based on biomarker measurement using a native sentinel species and active biomonitoring, based on the introduction of the species at the study site. According to the advantages and disadvantages of these two strategies and to the environmental problem, one strategy will be favoured over the other. Passive biomonitoring allows the temporal assessment of ecological status of a river, but limits space monitoring, depending on the abundance of the studied species (Conti and Cecchetti 2001). In addition, some confounding factors, such as catching stress, organisms' heterogeneity and history, and predation, could lead to misinterpretation of results (Gerhardt 2000; Geffard et al. 2010). Active biomonitoring, and particularly caging, involves exposure of calibrate and well-known organisms to environmental pollution. The main advantage of caging is the possibility of standardizing several biotic (size, sex, age, etc.) and abiotic parameters (number of individuals, distance from the pollution source, exposure duration, etc.) (Oikari 2006). The caging method allows the use of sentinel species, even species naturally absent in the studied aquatic habitat. Moreover, this tool limits the stress

caused by predation and makes sampling more easily compared with passive biomonitoring (Oikari 2006). Caging is increasingly used in ecological studies with different aquatic species such as bivalves (Cappello et al. 2013; Turja et al. 2015), crustaceans (Lacaze et al. 2011; Besse et al. 2013) or fish (Dey et al. 2016; Le Guernic et al. 2016a). Caging also has some disadvantages. Indeed, it can cause movement limitations, food access restriction, injuries and may even be subject to vandalism (Oikari 2006). All these disadvantages can influence the organisms' responses to pollution and therefore can be considered as confounding factors, as shown by Trevisan et al. (2013). In the way to make biomarkers efficient tools in active biomonitoring, it is therefore necessary to precisely characterize the caging effects in ecosystem conditions.

For this purpose, this study aims at assessing potential effects of confinement and food access restriction on a battery of well-known ecotoxicity biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). This fish is frequently used as a sentinel species for ecotoxicological studies (Pottinger et al. 2002; Sanchez et al. 2008a; Villarreal et al. 2012; Le Guernic et al. 2016a) and has several advantages for active biomonitoring. Its small size allows easy handling and caging. This species is found in waterways spanning North America to Asia and Europe and is particularly adapted to the local climate of the north of France. Sticklebacks are relatively tolerant to environmental variation including temperature, salinity and pollution that allow caging in many hydrosystems (Wootton 1984; Pottinger et al. 2002).

The effects of fish density in cages and short transport were already characterized in sticklebacks (Le Guernic et al. 2016b). The objective of the present study is to add new knowledge about stickleback caging by addressing for the first time the direct effects of confinement and restricted access to food on ecotoxicity biomarkers in ecosystem conditions, yielding recommendations for caging in future environmental studies. This set of experiments was conducted during Spring and Autumn to take into account reproductive status, which is known to influence biomarker responses in many species, including stickleback.

2. Material and methods

2.1. Origin and living conditions of fish

The three-spined sticklebacks used in this study come from a well characterized population used for about 15 years in the French *National* Institute for Industrial Environment and Risks (INERIS). Fish were maintained over the year in artificial external ponds with natural vegetation and macroinvertebrate communities. These ponds reproduce natural environmental conditions thanks to natural light, natural temperature and continuous renewal of tap water. Chemical analyses were performed twice a year by Wessling Laboratory to assure the required quality of water was present and that there was an absence of contamination. For optimal survival

and growth in ponds, sticklebacks received a daily food-supply of bloodworms (Ocean Nutrition™, Belgium) to reach 100 % ad libitum. The absolute quantity of food-supply varied during the year depending on the water temperature and length of fish (Leloutre et al. 2016).

2.2. Caging characteristics

The cylindrical cages used were 460 mm high and 250 mm wide (volume = 22.58 L). Meshes were 3.5 mm wide which allows water and particles flow and prevent escapement of sticklebacks. In order to use fewer fish while keeping the desired density, cages were divided by adding a removable wall (volume = 11.29 L). Fifteen fish were placed per half-cage corresponding approximately to 2.32kg/m³ (1.3 fish/L). This density is below the low limit established by OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development) which is between 2.5 and 10 kg/m³ for fish with a similar size to that of stickleback (OECD 2000). Moreover, it was demonstrated that biomarkers levels of three-spined sticklebacks were not significantly different for a density of 1.08 kg/m³ (7 fish per half-cage) and 2.31 kg/m³ (15 fish per half-cage) (Le Guernic et al. 2016b). Cages were placed directly on the sediment (50 cm deep). Fed fish were placed in modified cages on which a pipe was added to convey the food to the sticklebacks without having to handle the cage in order to avoid a supplementary stress.

2.3. Experimental design

The first experiment was conducted in April, corresponding to the beginning of the stickleback breeding season, and the second in October, outside that period. The experiments were performed in an external artificial pond that is regularly used for fish husbandry. Sticklebacks used in these two experiments came from the same batch and generation, and therefore had different morphometric characteristics (4.15 ± 0.28 cm; 1.03 ± 0.24 g for April experiment and 4.95 ± 0.48 cm; 2.16 ± 0.55 g for October experiment; INERIS husbandry). In addition to the caged fish, fifteen fish were placed on each side of the artificial pond (one side with food supply and one without food supply). Conditions tested in this study were caging (“Caged” or “Uncaged”) and diet (“Fed” fish or “Unfed” fish). Conditions were crossed to compare: “Uncaged-Fed”, “Uncaged-Unfed”, “Caged-Fed”, and “Caged-Unfed” (Fig 1.).

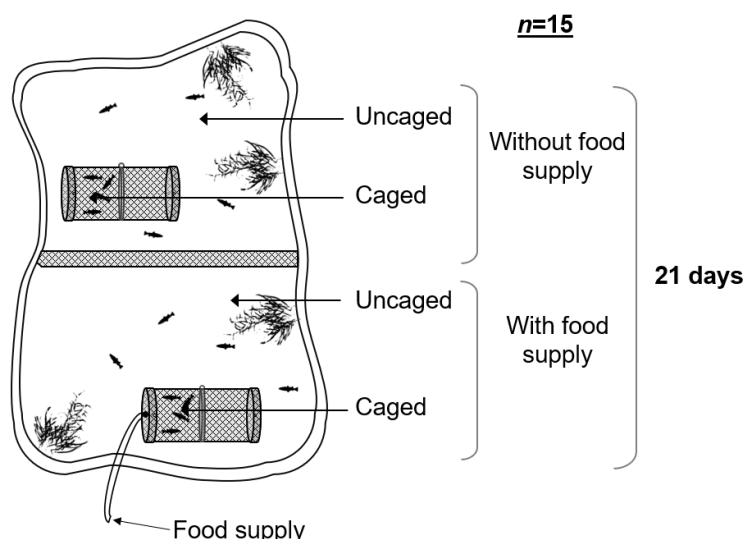


Fig. 1: Experimental design applied in April and in October

Fed-sticklebacks had received daily bloodworms with a ratio of food/fish of around 16 % w/w in April and 9 % w/w in October (to reach respectively 130 % and 70 % *ad libitum*). During each experiment (April and October), the same quantity was supplied for “caged-fed” and “uncaged-fed” fish. The experiment lasted 21 days, which is a conventional caging time for fish (Oikari 2006). Uncaged-fish were sampled by electrofishing. Water pH, conductivity, temperature and rate of oxygen were measured at the end of each experiment (Table 1).

Table 1: Water physical parameters for caging experiments:

Period	April	October
Temperature (°C)	10.88	13.00
pH	7.96	7.98
Conductivity (µS/cm)	682.00	523.00
Oxygen (mg/L)	12.62	11.26

After a 24h-starvation period (Debnath et al. 2007), sticklebacks were anaesthetised by balneation with MS222 (Tricaine methanesulfonate, 100 mg/L, Sigma-Aldrich, USA) and then were sacrificed by cervical dislocation. This experiment was conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE on the protection of animals used for scientific purposes at INERIS facilities (registration number C60-769-02).

2.4. Biological parameters

Biometric indices

Standard length, total weight, liver and gonad weights were recorded to calculate physiological indices. Sex was determined at the same time.

The general well-being of fish was evaluated with Fulton's condition index (K), calculated by the formula: $K = (\text{weight}/\text{length}^3) \times 100$ (Fulton 1902; Htun-Han 1978). Gonado-somatic index (GSI) (Zeyl et al. 2014) and hepatosomatic index (HSI) (Slooff et al. 1983) were calculated respectively by these formulae: $GSI = (\text{gonad weight}/\text{total body weight}) \times 100$, and $HSI = (\text{liver weight}/\text{total liver weight}) \times 100$.

Innate immune capacities

The spleen was recovered and gently pressed through sterilized nylon mesh (40 μm , Sigma-Aldrich, USA) with Leibovitz 15 medium (L15, Sigma-Aldrich, USA) modified with heparin lithium (100 mg/L, Sigma-Aldrich, USA), penicillin (500 mg/L, Sigma-Aldrich, USA) and streptomycin (500 mg/L, Sigma-Aldrich, USA) (Bado-Nilles et al. 2014a). The leucocytes suspension was stored at 4° C for 18 h before analysis to prevent bias due to grinding stress.

To have comparable results, sample leucocyte concentration was then adjusted to 10^6 cell/mL in L15 medium with a Malassez haemocytometer (Marienfeld, Germany) to perform analysis by flow cytometry. Analyses were carried out on whole leucocytes, using a CyAn™ ADP (Beckman coulter, USA) flow cytometer. A total of 10,000 events per sample were analysed after cell excitation by 488 nm argon laser.

Leucocyte sub-populations (lymphocyte and granulocyte-macrophage) were identified by size and complexity using forward scatter (FSC) and size scatter (SSC) parameters. Leucocyte distribution was characterized by percentages of each sub-population (Bado-Nilles et al. 2014b).

The cellular mortality percentages were evaluated using a double labelling with Yo-PRO®-1 (Thermo Fisher Scientific, USA, final concentration: 3.14 mg/L) and propidium iodure (Thermo Fisher Scientific, USA, final concentration: 5.01 mg/L) probes in order to obtain cellular fluorescence parameters indicating respectively apoptotic (FL1, green fluorescence) and necrotic (FL3, red fluorescence) cells (Bado-Nilles et al. 2014b).

Leucocyte respiratory burst measurement is based on the technique described by Chilmonczyk and Monge (1999) and was optimized for the stickleback. Briefly, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (H₂DCF-DA, Thermo Fisher Scientific, USA, final concentration: 29.30 mg/L), a stable non-fluorescent molecule is hydrolysed to dichloro-

dihydro-fluorescein diacetate (DCFH) by cytosolic enzymes. Then, the DCFH obtained was oxidized by ROS to the fluorescent dichlorofluorescein (DCF) to enable quantification, after 30 min of incubation at room temperature, by flow cytometry, of unstimulated and cells stimulated by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma-Aldrich, USA, final concentration: 9.25 mg/L) in FL1. The stimulation index of respiratory burst was determined as the ratio of fluorescence of PMA stimulated cells (H₂DCF-DA plus PMA) to that of unstimulated cells (H₂DCF-DA).

Intracellular lysosomal presence was determined by incubation of spleen leucocyte suspension with 0.3 mg/L of acridine orange (AO, Sigma, USA), a lysosomotropic weak base, for 20 min in the dark at room temperature. Then fluorescence was measured in FL3 (Bado-Nilles et al. 2013).

Phagocytosis activity was evaluated after 1 h of incubation in the dark and at room temperature of spleen leucocyte suspension with fluorescent microsphere at a concentration of 2.7×10^7 particles/mL (Fluorospheres[®] carboxylate-modified microsphere, diameter 1 μ m, Thermo Fisher Scientific, USA) (Gagnaire et al. 2004). Phagocytosis activity was characterized by two biomarkers, phagocytic capacity (adhesion capacity of leucocyte plasma membrane; fluorescence of at least one bead) and phagocytic efficiency (percentage of leucocytes that had engulfed microspheres, fluorescence of at least three beads).

Digestive enzymes

The whole digestive tract was removed on ice, rinsed and cleaned with cold Tris-HCl buffer (10 mM; pH 7, Sigma-Aldrich, USA). Samples were crushed with ceramic and glass beads (respectively 3 mm \varnothing and 1 mm \varnothing) using Precellys24[®] homogenizer (Bertin Technologies, France), at 5500 rpm (2 x 10 s) and centrifuged at 15000 g for 30 min at 4 °C. Supernatants were stored at -80 °C until analysis.

Supernatants from digestive tracts were used for measurements of amylase, intestinal alkaline phosphatase (IAP) and trypsin, according to Junge et al. (2001), Panteghini and Bais (2008) and García-Carreño and Haard (1993) methods respectively, modified and adapted for stickleback on automaton by Hani et al. (2018). All enzymatic techniques were performed on the Gallery™ Automated Photometric Analyzer (Thermo Fisher Scientific, USA) by kinetic colorimetric assay at 405 nm. Results are reported in U/g of gut tissue.

Synaptic transmission

A piece of muscle from the tail (20 ± 5 mg) was recovered and placed in 800 μ L of a potassium phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4, Sigma-Aldrich, USA) modified with glycerol (20 %, Sigma-Aldrich, USA) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 2 μ M, Sigma-Aldrich, USA) as

protease inhibitor. The samples were then frozen in liquid nitrogen and stored in freezer at -80° C until analysis.

Muscles were grinded with glass beads (diameter of 1 mm) using Precellys24® homogenizer (Bertin Instruments, France) and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant of each sample (post-mitochondrial fraction, S9) was placed in 1 mL microtubes. Protein concentration was assessed using the Bradford method (Bradford 1976) with bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA) adapted for microplates. Synaptic transmission was assessed with measurement of acetylcholinesterase activity (AChE) on S9 muscle fractions following the method of Ellman et al. (1961). Results are expressed in U/g of total protein.

Antioxidant system and metabolic detoxication

Livers were recovered and placed in 400 µL of the same solution than muscles. Protein concentration in liver was assessed as previously described. All assays described below were adapted on three-spined stickleback by Sanchez et al. (2005, 2007, 2008a).

Hepatic biomarkers such as total glutathione (GSH) (Vandeputte et al. 1994), glutathione peroxidase activity (GPx) (Paglia and Valentine 1967), superoxide dismutase activity (SOD) (Paoletti et al. 1986), catalase activity (CAT) (Babo and Vasseur 1992) and lipid peroxidation with thiobarbituric acid reactive substance method (TBARS) (Ohkawa et al. 1979) were analysed on S9 liver fractions using a liquid handling automaton (Freedom EVO®, Tecan, Switzerland) and a microplate reader (Synergy™ H4 Hybrid, BioTek, USA). GPx, SOD and CAT were expressed in U/g of total protein, while TBARS and GSH amounts were measured in nmol and µmol/g of total protein, respectively.

The activity of two enzymes involved in metabolic detoxication were analysed on S9 liver fractions: ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione-S-transferase (GST) following Flammarion et al. (2002) and Habig et al. (1974) methods, respectively. Results of EROD and GST are expressed in pmol/min/mg of total protein and U/g of total protein.

2.5. Statistical analyses

All statistical analyses were performed with R software version 3.3.2 (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Statistical differences between gender were tested inside each group with Student or Wilcoxon-Mann-Whitney tests with respect to normality and homoscedasticity ($\alpha = 5\%$). If differences were identified, male and female results were thereafter analysed separately.

Results of April and October were analysed separately. A two-way analysis of variance (two-way ANOVA) was performed to compare results obtained from the four conditions. Normality

and homoscedasticity of ANOVA residuals were assessed respectively by Shapiro-Wilk and Levene tests ($\alpha = 5\%$). If these criteria were respected, ANOVA was kept and was followed by a Tukey test. Despite of a log transformation of the variable, if normality and variance homogeneity were not obtained, ANOVA was replaced by the Kruskal-Wallis test followed by the Nemenyi test ($\alpha = 5\%$). Statistical differences between each condition were reported according to the previous Tukey or Nemenyi tests (Tables 2 and 3).

3. Results

3.1. Individual mortality

No individual mortality nor external signs of stress (i.e. skin coloration or injuries) were observed at the end of both experiments in cages as well as in external ponds.

3.2. Gender difference and GSI heterogeneity in spring

GPx activity and GSI appeared to be gender-dependent for both season with higher values in female than in male fish. In April, gender differences were also observed on HSI and GST activity whereas phagocytic efficiency and CAT activity were sex-dependent in October experiment (Tables 2 and 3). Consequently, for all these biomarkers, results for males and females were analysed and expressed separately. For other investigated biomarkers, no significant difference was noticed between genders and analyses were carried out without gender separation.

In Spring, GSI was a little more elevated in male uncaged-unfed fish than in male caged-unfed fish (Nemenyi test, $p = 4.3 \times 10^{-2}$). Difference in GSI between groups was found to be higher in female fish. Female caged-fed fish presented a much higher GSI (mean of 19.82) than other groups (means of 8.41, 7.18 and 8.34 for uncaged-fed, uncaged unfed and caged-unfed fish respectively). This difference is significant with female caged-unfed and uncaged-unfed (Tukey tests, $p = 4.7 \times 10^{-2}$ and $p = 9.62 \times 10^{-3}$ respectively) (Table 2).

3.3. Effects of restricted access to food on biomarker responses

With regard to the April experiment, the absence of food supply caused a decrease of weight, condition index, HSI in male fish, GSH content and EROD activity in caged organisms (Tukey tests, $p = 2.43 \times 10^{-3}$, $p = 2.14 \times 10^{-4}$, $p = 2.70 \times 10^{-4}$, $p = 2.03 \times 10^{-2}$ and $p = 2.14 \times 10^{-2}$ respectively). For this season, the effects of lack of food were also observable in uncaged organisms with a decrease of condition index, GSH amount (Tukey tests, $p = 1.73 \times 10^{-2}$ and $p = 3.60 \times 10^{-4}$ respectively) as well as SOD activities (Nemenyi test, $p = 4.07 \times 10^{-2}$) (Table 2).

In October, the restricted access to food did not result in weight loss or decrease in condition index. Caged organisms were more affected by the absence of food supply than uncaged fish.

Indeed, decreases of TBARS contents (Tukey tests, $p = 1.99 \times 10^{-4}$), and decreases of EROD, SOD and amylase activities (Tukey tests, $p = 1.15 \times 10^{-4}$, $p = 8.50 \times 10^{-4}$ and $p = 5.15 \times 10^{-4}$, respectively) were reported in “caged-unfed” fish in relation to caged fed fish. Only GSH content was decreased both in uncaged fish and in caged fish (Tukey tests, $p = 2.10 \times 10^{-6}$) (Table 3).

The cellular innate immune responses were not impacted by the lack of food whatever the season.

3.4. Effects of caging on biomarkers

In April, caging caused a significant decrease of amylase and trypsin activities (Tukey tests, $p = 3.42 \times 10^{-2}$ and $p = 9.78 \times 10^{-4}$ respectively) in unfed organisms. No other biomarker was significantly impacted by caging during this season, while in October, three biomarkers were significantly affected by caging: EROD and amylase activities, and TBARS amount. As for the April experiment, amylase activity was lower in “caged-unfed” fish than in “uncaged-unfed” fish (Tukey test, $p = 4.70 \times 10^{-3}$). Surprisingly, EROD activity and TBARS content increased in “caged-fed” organisms compared with “uncaged-fed” organisms (Tukey tests, $p = 4.40 \times 10^{-2}$ and $p = 1.2 \times 10^{-6}$ respectively) (Tables 2 and 3).

Several biomarkers were not affected by caging whatever the season such as biometric parameters, acetylcholinesterase activity, antioxidant system and cellular innate immune responses.

3.5. Effects of both caging and food stress on biomarkers

Combination of both stressors (restricted access to food and confinement) had a higher impact on sticklebacks in April than in October. Indeed, nine biomarkers were significantly decreased in “caged-unfed” fish compared compared “uncaged-fed” fish (control condition) in Spring whereas only four biomarkers were decreased within the same condition in Autumn. In April, “caged-unfed” fish showed a decrease of K, HSI in male fish, GSH, EROD, amylase, IAP and trypsin activities (Tukey tests, $p = 2.90 \times 10^{-3}$, $p = 1.02 \times 10^{-3}$, $p = 9.21 \times 10^{-5}$, $p = 6.00 \times 10^{-4}$, $p = 4.40 \times 10^{-2}$, $p = 4.50 \times 10^{-2}$, $p = 2.97 \times 10^{-2}$ respectively) as well as lysosomal presence and GST activity in male fish (Nemenyi tests, $p = 5.00 \times 10^{-4}$ and $p = 1.26 \times 10^{-4}$ respectively) (Table 2).

In October, only necrosis rate, GSH content (Nemenyi tests, $p = 4.80 \times 10^{-2}$, $p = 4.80 \times 10^{-5}$) and SOD and amylase activities (Tukey tests, $p = 1.87 \times 10^{-3}$, $p = 3.15 \times 10^{-4}$) were decreased in “caged-unfed” fish compared with “uncaged-fed” fish. As with both individual stressors, the confinement-starvation interaction had no effect on markers of the cellular innate immune responses of stickleback (except necrosis rate) or on the AChE activity (Table 3).

Table 2: Biomarker responses in three-spined sticklebacks according to caging and food condition in Spring.

Values are means \pm standard error of the mean (n = 15, except when sexes are separated). Statistical differences between groups are expressed with letters according to the Tukey Test or Nemenyi Test. GSH: total glutathione; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; AChE: Acetylcholinesterase; IAP: Intestinal Alkaline Phosphatase; MFI: Mean fluorescence intensity.

Biomarkers		April															
		Uncaged-Fed			Uncaged-Unfed			Caged-Fed			Caged-Unfed						
		Mean	\pm	SEM	Mean	\pm	SEM	Mean	\pm	SEM	Mean	\pm	SEM				
Biometric index (organism)	Length (cm)	4.15	\pm	0.34	4.09	\pm	0.34	4.27	\pm	0.16	4.09	\pm	0.21				
	Weight (g)	1.08	\pm	0.24	ab	0.95	\pm	0.26	a	1.21	\pm	0.17	b	0.92	\pm	0.18	a
	Fulton's condition index	1.50	\pm	0.17	b	1.35	\pm	0.14	a	1.55	\pm	0.10	b	1.32	\pm	0.13	a
	Hepatosomatic index $\text{\textcircled{M}}$	3.57	\pm	0.18	b	2.17	\pm	0.27	a	3.61	\pm	0.32	b	1.77	\pm	0.15	a
	Hepatosomatic index $\text{\textcircled{F}}$	5.16	\pm	0.92		4.12	\pm	0.29		4.87	\pm	0.25		3.98	\pm	0.80	
	Gonadosomatic index $\text{\textcircled{M}}$	0.84	\pm	0.13	ab	2.05	\pm	1.18	b	0.79	\pm	0.14	ab	0.51	\pm	0.05	a
	Gonadosomatic index $\text{\textcircled{F}}$	8.41	\pm	2.87	ab	7.18	\pm	1.36	a	19.82	\pm	4.37	b	8.34	\pm	2.15	a
Immune system (spleen)	Leucocyte necrosis (%)	2.18	\pm	0.54		2.18	\pm	1.17		2.55	\pm	0.37		2.25	\pm	0.52	
	Leucocyte apoptosis (%)	11.99	\pm	5.86		8.86	\pm	4.38		9.33	\pm	4.16		7.94	\pm	3.23	
	Lymphocytes among leucocytes (%)	81.11	\pm	4.54		83.75	\pm	4.74		82.49	\pm	4.86		81.74	\pm	4.05	
	Granulocytes among leucocytes (%)	19.64	\pm	4.57		17.03	\pm	4.85		18.94	\pm	5.29		19.11	\pm	4.17	
	Phagocytic capacity (%)	62.41	\pm	3.18		64.37	\pm	3.14		62.51	\pm	4.02		61.16	\pm	2.63	
	Phagocytic efficiency (%)	30.15	\pm	5.04		31.42	\pm	5.67		32.37	\pm	5.61		29.14	\pm	4.69	
	Lysosomal presence (MFI)	2.72	\pm	0.33	b	2.54	\pm	0.38	ab	2.48	\pm	0.35	ab	2.33	\pm	0.26	b
Antioxidant system (liver)	GSH ($\mu\text{mol/g}$ of total prot)	14.90	\pm	6.08	c	8.71	\pm	3.53	ab	10.63	\pm	2.53	cb	7.01	\pm	2.59	a
	GPx activity (U/g of total prot) $\text{\textcircled{M}}$	21.72	\pm	8.83		15.51	\pm	7.55		14.53	\pm	2.78		19.45	\pm	15.93	
	GPx activity (U/g of total prot) $\text{\textcircled{F}}$	39.77	\pm	21.21		76.55	\pm	28.00		57.81	\pm	21.55		40.49	\pm	21.57	
	CAT activity (U/g of total prot)	703540	\pm	285811	ab	843866	\pm	276644	b	535372	\pm	162162	a	623136	\pm	339603	ab
	SOD activity (U/ g of total prot)	4764	\pm	1387	bc	3581	\pm	908	a	5108	\pm	1006	c	3971	\pm	1167	ab
Metabolic detoxification (liver)	EROD activity (pmol/min/mg of total prot)	0.42	\pm	0.24	b	0.42	\pm	0.29	b	0.33	\pm	0.15	b	0.18	\pm	0.11	a
	GST activity $\text{\textcircled{M}}$ (U/g of total prot)	3503	\pm	181	b	2734	\pm	353	ab	3306	\pm	92	b	2422	\pm	246	a
	GST activity $\text{\textcircled{F}}$ (U/g of total prot)	2760	\pm	443		1865	\pm	205		1769	\pm	316		2245	\pm	348	
Synaptic transmission (muscle)	AChE activity (U/g of total prot)	26.43	\pm	24.40		50.94	\pm	33.19		26.45	\pm	15.13		33.32	\pm	15.87	
Digestive enzymes (intestine)	Amylase activity (U/g of gut tissu)	2.22	\pm	0.72	b	2.37	\pm	0.52	b	2.25	\pm	0.82	ab	1.58	\pm	0.62	a
	Alkaline phosphatase activity (U/g of gut tissu)	0.91	\pm	0.31	b	0.91	\pm	0.40	ab	0.75	\pm	0.32	ab	0.59	\pm	0.26	a
	Trypsin activity (U/g of gut tissu)	0.22	\pm	0.05	b	0.24	\pm	0.07	b	0.20	\pm	0.06	ab	0.15	\pm	0.03	a

Table 3: Biomarker responses in three-spined sticklebacks according to caging and food condition in Autumn.

Values are means \pm standard error of the mean (n = 15, except when sexes are separated). Statistical differences between groups are expressed with letters according to the Tukey Test or Nemenyi Test. GSH: total glutathione; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; AChE: Acetylcholinesterase; IAP: Intestinal Alkaline Phosphatase; MFI: Mean fluorescence intensity.

Biomarkers		October											
		Uncaged-Fed			Uncaged-Unfed			Caged-Fed			Caged-Unfed		
		Mean	\pm	SEM	Mean	\pm	SEM	Mean	\pm	SEM	Mean	\pm	SEM
Biometric index (organism)	Length (cm)	5.30	\pm	0.44	5.33	\pm	0.65	5.27	\pm	0.39	5.01	\pm	0.50
	Weight (g)	2.18	\pm	0.46	2.28	\pm	0.83	2.20	\pm	0.46	1.82	\pm	0.54
	Fulton's condition index	1.46	\pm	0.19	1.46	\pm	0.18	1.49	\pm	0.14	1.40	\pm	0.10
	Hepatosomatic index	4.80	\pm	1.51	4.72	\pm	2.00	4.86	\pm	0.86	3.91	\pm	1.18
	Gonadosomatic index σ	1.27	\pm	0.15	1.47	\pm	0.09	1.48	\pm	0.11	1.33	\pm	0.09
	Gonadosomatic index ϕ	1.98	\pm	0.36	2.22	\pm	0.40	1.73	\pm	0.32	1.58	\pm	0.11
Immune system (spleen)	Leucocyte necrosis (%)	3.26	\pm	0.96	3.03	\pm	1.18	2.77	\pm	1.32	2.37	\pm	0.56
	Leucocyte apoptosis (%)	4.23	\pm	1.92	5.09	\pm	1.93	5.91	\pm	2.88	5.11	\pm	2.74
	Lymphocytes among leucocytes (%)	59.99	\pm	8.23	63.32	\pm	5.78	63.87	\pm	7.77	59.41	\pm	11.97
	Granulocytes among leucocytes (%)	40.59	\pm	8.27	37.33	\pm	5.81	36.81	\pm	7.87	41.23	\pm	11.97
	Basal oxidative activity (FU)	582.51	\pm	137.87	538.78	\pm	231.34	522.78	\pm	203.66	570.75	\pm	122.84
	Active oxidative activity (FU)	537.03	\pm	230.10	543.09	\pm	138.75	459.31	\pm	194.60	550.94	\pm	226.02
	Respiratory burst index	0.92	\pm	0.35	1.06	\pm	0.42	0.88	\pm	0.26	0.95	\pm	0.33
	Phagocytic capacity (%)	64.29	\pm	3.65	63.26	\pm	2.47	66.12	\pm	4.78	64.65	\pm	3.60
	Phagocytic efficiency σ (%)	18.75	\pm	0.60	15.77	\pm	0.91	17.78	\pm	1.35	17.87	\pm	1.69
	Phagocytic efficiency ϕ (%)	20.51	\pm	1.58	19.03	\pm	0.74	22.35	\pm	1.79	18.27	\pm	1.09
	Lysosomal presence (MFI)	2.14	\pm	0.25	2.12	\pm	0.24	2.21	\pm	0.42	2.12	\pm	0.31
Antioxidant system (liver)	GSH (μ mol/g of total prot)	22.47	\pm	8.19	14.17	\pm	4.96	21.85	\pm	8.12	8.33	\pm	2.70
	GPx activity (U/g of total prot) σ	30.49	\pm	9.73	24.64	\pm	6.22	29.55	\pm	11.53	24.78	\pm	11.30
	GPx activity (U/g of total prot) ϕ	176.15	\pm	109.05	118.36	\pm	75.00	142.34	\pm	105.40	95.65	\pm	46.62
	CAT activity σ (U/g of total prot)	651725	\pm	159331	439194	\pm	149684	496914	\pm	53829	304313	\pm	192013
	CAT activity ϕ (U/g of total prot)	1299344	\pm	164198	897094	\pm	153195	1115704	\pm	138320	814892	\pm	132666
	SOD activity (U/g of total prot)	6706	\pm	892	5752	\pm	1091	6784	\pm	975	5049	\pm	1532
Cell integrity (spleen and liver)	TBARS (nmol/g of total prot)	16.69	\pm	7.23	15.88	\pm	5.98	34.35	\pm	11.35	20.91	\pm	7.13
Metabolic detoxification (liver)	EROD activity (pmol/min/mg of total prot)	0.80	\pm	0.40	0.86	\pm	0.41	1.55	\pm	1.10	0.57	\pm	0.41
	GST activity (U/g of total prot)	1696	\pm	511	1440	\pm	452	1951	\pm	513	1570	\pm	382
Synaptic transmission (muscle)	AChE activity (U/g of total prot)	48.81	\pm	12.23	47.28	\pm	15.73	44.09	\pm	27.04	46.38	\pm	25.92
Digestive enzymes (intestine)	Amylase activity (U/g of gut tissu)	2.67	\pm	1.08	2.31	\pm	0.97	2.53	\pm	0.76	1.25	\pm	0.39
	Alkaline phosphatase activity (U/g of gut tissu)	1.21	\pm	0.45	1.31	\pm	0.51	1.34	\pm	0.69	1.01	\pm	0.28
	Trypsin activity (U/g of gut tissu)	0.31	\pm	0.15	0.29	\pm	0.12	0.33	\pm	0.14	0.26	\pm	0.09

4. Discussion

4.1. GSI heterogeneity in Spring

In Spring, female caged-fed fish have presented more elevated GSI than any other groups in this study. GSI is a common metric of reproductive status in fish and is very dependent of the gonadal stage of the organisms (Zeyl et al. 2014). The gonadal stage is specific to each individual and cannot be determined before the experiment. Moreover, there is no other likely reason why the increase of GSI in caged-fed fish could be explained. The imbalance in female GSI repartition is probably due to their random distribution. Nevertheless, despite this heterogeneity, no significant difference was observed in biomarker measurements between caged-fed fish (mean GSI of 19.82) and uncaged-fed fish (mean GSI of 8.41). This shows that in this study, gonadal stage of females did not significantly affect biomarker levels and therefore did not cause bias in interpretation of results.

4.2. Food access as the most important source of variability in biomarker basal levels

Three-spined sticklebacks are predominantly carnivorous fish. They easily become omnivorous especially in captivity and can eat a large variety of food items, such as copepods, cladocerans, oligochaetes, worms, as well as commercial dried food (Wootton 1976). For *in situ* studies, it is not always possible and advisable to feed the caged fish. In fact, supplying fish with external food could reduce trophic exposure to contaminant. Natural food items can enter the cage through meshes but probably with lower quantity and diversity than in natural conditions, hence the importance to improve knowledge about diet effects on fish. In spite of not being fed with bloodworms, the “uncaged-unfed” sticklebacks could have access to food naturally present in ponds. Access to food is therefore less restricted for uncaged fish compared with caged fish, for which a loss of weight or a decrease of K and HSI could be observed.

As expected, 3 weeks of fasting induced a decrease of HSI and K index in fish but only during Spring. This decrease was also observed after short-term starvation (4 and 6 days) in silver pomfret (*Pampus argenteus*) (Liao et al. 2017). This was reported by Pottinger et al. (2002) who have shown that 2 weeks of food deprivation were enough to induce decreases of K index and weight of sticklebacks. Liao et al. (2017) have simultaneously shown a decrease of crude lipid and an induction of two genes involved in lipolysis which suggest a link between biometric indices and energy reserves in organisms. In Spring, during the breeding time, sticklebacks need more energy than in Autumn (Wootton, 1994). This is probably why no decrease of biometric parameters was observed outside breeding time. Interestingly, April corresponds to the start of reproductive period (Wootton 1984) which requires energy for both the males (nest

building and territory defence) and females (eggs maturation). Decrease of K index and HSI during Spring could be due to the use of energy reserves for reproduction functions.

With normal metabolism, organisms compensate the ROS created by mitochondrial respiration by their antioxidant system, which is maintained at a basal level. However, several factors can alter this equilibrium, such as exposure to xenobiotics (Lushchak 2011), elevated temperature (Almeida et al. 2015), and also prolonged starvation (Furne et al. 2009). Indeed, in our study, 21 days of starvation induced reduction of SOD and GST activities which had a strong impact on GSH content. Furne et al. (2009) have described a similar phenomenon in adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) for 40 and 72 days fasting, for which SOD, CAT, GPx and GR (Glutathione Reductase) activities decreased. In addition, several biomarkers reported in rainbow trout, such as HSI, GST, EROD, GPx and GR activities, decreased after a 15-day starvation (Viganò et al. 1993) and after a 3 to 7 weeks of starvation (Blom et al. 2000). During food deprivation periods, organisms appear to opt for enzymes with low energy consumption like CAT (Guderley et al. 2003). In our study, the fact that CAT activity was maintained for 21 days of starvation while SOD, GST and GSH levels decreased, seems to confirm this hypothesis. The main role of GST is to catalyse the conjugation of glutathione (GSH) to electrophilic centres on a wide variety of compounds in order to make the substance more soluble. GST activity is thus linked with glutathione content. However, all GSH synthesis pathways require energy (Biswas and Rahman 2009), and thus, without food supply, fish might not have enough energy to synthesize GSH and consequently to maintain GST activity. Superoxide dismutases are metalloenzymes which catalyse the transformation of superoxide to molecular oxygen and hydrogen peroxide, using some metals (Cu, Fe, Zn). Nutritional stress could lead to a deficiency of these cofactors which could explain the decrease of SOD activity. Nonetheless, other studies have highlighted increase of antioxidant activity in fish facing longer fasting period. Indeed, after 5 and 7 weeks of starvation, SOD, CAT and GPx activities increased in common dentex (*Dentex dentex*) (Morales et al. 2004). Lipid peroxidation oxidize glutathione rate, SOD, GR and GPx activities have increased in gilthead seabream (*Sparus aurata*) as well (Pascual et al. 2003). During starvation period, stocked triglycerides are hydrolysed in glycerol and fatty acids. These fatty acids are used as fuel for cells through oxidative pathway (Morales et al. 2004; Yengkokpam et al. 2013). The oxidative metabolism is a source of ROS production which can induce an oxidative stress and therefore an increase of antioxidant enzyme activities and oxidative damage. However, sticklebacks in the present study were fasted only for 21 days that might not be enough to engage this pathway. This phenomenon could also be dependent on the species or other confounding factors such as physical and/or chemical parameters.

Apart from the immune system, some functions of sticklebacks were impacted by the 21 days of starvation. Indeed, the antioxidant as well as defence systems were altered by the lack of food. These results are consistent with those found in the literature but are to be qualified based on the dietary stress duration as well as the species studied or based on other confounding factors (i.e. age, sex, gonadic stage...) (Viganò et al. 1993; Wootton 1994; Blom et al. 2000; Guderley et al. 2003; Pascual et al. 2003; Morales et al. 2004; Biswas & Rahman 2009; Furne et al. 2009; Abolfathi et al. 2012; Yengkokpam et al. 2013; Almeida et al. 2015).

4.3. Confinement as negligible source of biomarker variation

Even if cages were built to limit stress (Le Guernic et al. 2016b), confinement and movement limitation can still induce some perturbation on fish. Although cage design, caging depth or caging time were chosen in accordance with literature, caging experiments are not standardized. Exposure duration can vary, according to studies and species, from 2 to 86 days according to the review of Oikari (2006). However, among the 25 different studies reviewed, over the half have used caging time between 14 and 30 days. A shorter time might not be enough to reduce effects of handling stress (Trevisan et al. 2013) and a too long fasting duration could be harmful for unfed fish.

To discuss the impact of confinement stress alone on biomarkers after 21 days of caging, it is important to take into consideration the nutritional status of uncaged-unfed fish. As specified previously, the unfed-uncaged fish have access to natural food in ponds contrary to unfed-caged fish. This difference in the nutritional status between these groups does not allow us to distinguish the confinement stress from the food stress in unfed condition. In order to discuss the confinement stress alone, only fed fish (caged and uncaged) have been considered.

Our results showed that confinement had few impacts on biomarkers in fed fish, whatever the season. In fact, only EROD activity and TBARS content appeared to be increased in caged-fed fish compared with uncaged-fed fish in Autumn. Surprisingly, this effect was not found during the experiment performed in Spring.

Some stress can induce malondialdehyde formation such as exposition to heavy metal (Javed et al. 2017), pesticides (Nwani et al. 2017; Vieira et al. 2017) or pharmaceutical products (Ajima et al. 2017; Stancova et al. 2017). Other types of disturbance such as handling (Sanz et al. 2012) or confinement (Girao et al. 2012) can induce an oxidative stress and thus an increase of TBARS content. However, the increase of the TBARS level when fish received food supply has never been reported. On the contrary, some studies have highlighted beneficial effects of food supplement on oxidative stress (Girao et al. 2012; Kenari and Naderi 2016; Peixoto et al. 2017).

EROD is a marker of Cytochrome P450 1A (CYP1A) induction highly sensitive to contaminant exposure in fish, especially for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), planar halogenated hydrocarbons (PHH) and polychlorinated biphenyl (PCB) (Van der Oost et al. 2003). Induction factors when fish are exposed are usually very high for this parameter. In fact, Sanchez et al. (2008b) have demonstrated that EROD in *G. aculeatus* can be induced with a factor higher than 16-fold by prochloraz and higher than 20-fold by beta-naphtoflavone (BNF). Similar results were observed in different species with induction factor from 15 to 88-fold after an exposition at PAH or BNF (Morrow et al. 2004; Stepić et al. 2012; Sturve et al. 2017). Thus, the induction factor of this biomarker obtained in caged sticklebacks (1.93-fold compared with uncaged sticklebacks) was lower than those induced by xenobiotics and could correspond to basal variation of this parameter.

Finally, results obtained in this study confirmed that 21 days of confinement as a single stressor have few impacts on stickleback biomarkers.

4.4. Caging and restricted access to food during breeding season as the most stressful condition for sticklebacks

The effects of confinement were negligible in fed fish, which was not the case for individuals who did not receive food supply. Indeed, unfed caged fish had less access to food than unfed uncaged fish, which accentuated the differences in their biological responses, particularly in Spring. Thus, the combination of confinement and lack of food supply led to a decrease of nine biomarkers in Spring and only four in Autumn.

Among the effects observed in Spring, decreases of K, HSI, GSH content, EROD and GST activities were already reported and explained with the nutritional stress alone. In addition to these effects, a decrease in digestive enzymes activities and lysosomal presence was also observed.

The decrease of amylase activity was already demonstrated by Abolfathi et al. (2012) who had shown a similar decrease of amylase in juvenile roach (*Rutilus rutilus*) due to an alteration of the enterocyte structure during the 3 weeks starvation. Indeed, intestinal mucosa is a secondary site for amylase synthesis (Kumar and Tembre 1998) and deleterious effects of starvation on this type of cells have already been observed (Baeverfjord and Krogdahl 1996). Another hypothesis is that decrease or change in food habits could lead to the regulation of digestive enzyme synthesis. Indeed, in all the animal species, digestive enzyme activities are indicative of their feeding ecology and trophic niche and are well correlated to their food (German et al. 2004). The adaptation of fish digestive enzymes in response to diet is well known and was described by several authors (Reimer 1982; Infante and Cahu 1994; Péres et al. 1998; Silva et al. 2010). This plasticity is described as a mechanism through which fish

reduce metabolic cost of producing an enzyme when its substrate is reduced or absent (German et al. 2004).

The decrease of lysosomal presence during starvation was also shown in stickleback for a shorter period (14 days) in a contaminated site (Le Guernic et al. 2016b). A minimal lipid rate is necessary for optimal immune status of fish and a change in lipid content or composition can induce cell membrane alterations and thus negatively affect lysosomal integrity (Lall 2000; Henry and Fountoulaki 2014). The energy required during the breeding period could induce a high lipid consumption that could lead to a disruption of lysosomal membranes.

Regarding the effects of both stressors during the Autumn experiment, amylase activity also decreases, probably according to the same phenomenon as previously described. The other effect of both stressors in Autumn was a surprising decrease of leucocyte necrosis. Finally, the combination of both stressors appeared to have no more effect than starvation as a single stress. As a whole, whatever the season, caging stress is mainly due to the reduction of access to food.

During active monitoring studies, the “caged-unfed” condition seems to be more realistic due to the difficulties in giving and controlling food intake. Despite effects observed by lack of food supply and combination between lack of food supply and confinement stress, induction and inhibition factors did not exceed 2.5-fold whatever the season and biomarker. These factors of variation are not striking enough to mask effects of inducible compounds on EROD activity (prochloraz or BNF). For the other less inducible biomarkers (GSH content, SOD, GST, amylase and trypsin activities), the increase of food restriction when sticklebacks were caged, could induce variation factors equal to those obtained after exposure to xenobiotics. Some studies have shown that a nutritional stress (quantity and/or composition) could modulate biomarker responses and suggested that this modulation could decrease the resistance of fish to a chemical stress (Grosell et al. 1998; Quabius et al. 2001; Girao et al. 2012; Sesay et al. 2016; Shiu et al. 2016).

5. Conclusions and recommendations

Caging of sentinel species is a tool frequently used in environmental monitoring because of its many benefits. Apart from aquaculture, studies of the possible caging effects on fish physiology are rare. In the present study, we wanted to validate the use of this tool with three-spined sticklebacks by assessing the effects of two stressors linked to 21 days of caging in ecosystem conditions (confinement stress, restricted food access and combination of both). This work aimed to specify the conditions of application and interpretation of biomarkers to ensure an effective and reliable diagnosis of the quality of water bodies.

The main result yielded from this study was that a restricted access to food has more impact than confinement stress on the biological markers of sticklebacks, within an optimized density of fish per cage. However, the combination of confinement and restricted access to food stressors accentuate the negative effects observed when fish are subjected only to a restricted access to food; in particular when sticklebacks needed more energy, namely during their breeding period.

Consequently, ecotoxicological studies applying this active monitoring tool should favour a period outside the reproductive stage of the species studied, from Autumn to early Spring for sticklebacks, where the effects of caging are less impactful. Outside the breeding period, a food supply is not necessary and food that enters the cage is sufficient to maintain most of biological functions.

Caging is a useful approach for assessing contaminant effects on aquatic organisms, especially in upstream / downstream studies whose aim is to assess the impacts of an anthropic activity (i.e. water treatment plant, industrial waste) on ecosystem. For *in situ* studies, food items can be carried by the stream. On the contrary, the present experiments were performed in artificial external ponds in which the stream was almost nonexistent. Sticklebacks were under more severe dietary conditions than in real biomonitoring studies and despite that, few effects were measured on biomarkers. Caging effects during the biomonitoring campaign could therefore be weaker and insignificant compared with the contamination impact-outcomes measured. However, in the aim to totally remove the effects of caging on biomarkers, reduced caging time was found to be of benefit. Fish could be less impacted by a short-term, limited access to food. Nevertheless, the caging time must be chosen taking into account the induction time of biomarkers. Other experiments would be necessary to assess biomarkers induction kinetics when sticklebacks are exposed to xenobiotics to determine the best caging time to apply.

Acknowledgments

The authors are grateful to Ms Felicity Mc Callum for native English reviewing of this paper.

Funding information

This work was financially supported by the ecotoxicology research program of the French Ministry in charge of the environment (P190) and the European Regional Development Fund (ERDF).

References

- Abolfathi M, Hajimoradloo A, Ghorbani R, Zamani A (2012) Effect of starvation and refeeding on digestive enzyme activities in juvenile roach, *Rutilus rutilus caspicus*. *Comp Biochem and Physiol A* 161:166-173. <http://doi.org/10.1016/j.cbpa.2011.10.020>
- Ajima MNO, Pandey PK, Kumar K, Poojary N (2017) Assessment of mutagenic, hematological and oxidative stress biomarkers in liver of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) in response to sublethal verapamil exposure. *Drug Chem Toxicol* 40:286-294. <http://doi.org/10.1080/01480545.2016.1219914>
- Almeida JR, Gravato C, Guilhermino L (2015) Effects of Temperature in Juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) Biomarker Responses and Behaviour: Implications for Environmental Monitoring. *Estuaries and Coasts* 38:45-55. <http://doi.org/10.1007/s12237-014-9792-7>
- Babo S, Vasseur P (1992) In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol* 22:61-68. [http://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90036-M](http://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90036-M)
- 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. <http://doi.org/10.1007/s11356-012-1410-2>
- Bado-Nilles A, Techer R, Porcher JM, Geffard A, Gagnaire B, Betoulle S, Sanchez W. (2014a) 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. <http://doi.org/10.1016/j.etap.2014.08.002>
- Bado-Nilles A, Jolly S, Porcher JM, Palluel O, Geffard A, Gagnaire B, Betoulle S, Sanchez W. (2014b) Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus* sp. *Environ Pollut* 184:9-17. <http://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.049>
- Baeverfjord G, Krogdahl A (1996) Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *J Fish Dis* 19:375-387. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1996.d01-92.x>
- Besse JP, Coquery M, Lopes C, Chaumot A, Budzinski H, Labadie P, Geffard O (2013) Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Res* 47:650-660. <http://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>
- Biswas SK, Rahman I (2009) Environmental toxicity, redox signaling and lung inflammation: the role of glutathione. *Mol Asp Medicine* 30:60-76. <http://doi.org/10.1016/j.mam.2008.07.001>
- Blom S, Andersson T, Förlin L (2000) Effects of food deprivation and handling stress on head kidney 17alpha-hydroxyprogesterone 21-hydroxylase activity, plasma cortisol and the activities of liver detoxification enzymes in rainbow trout. *Aquat Toxicol* 48: 265-274. [http://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00031-4](http://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00031-4)
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254. [http://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Cappello T, Maisano M, D'Agata A, Natalotto A, Mauceri A, Fasulo S (2013) Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar Environ Res* 91:52-60. <http://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.12.010>

- 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. <http://doi.org/10.1006/fsim.1998.0188>
- Conti ME, Cecchetti G. (2001) Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment — a review. *Environ Pollut* 114:471-492. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00224-4)
- Debnath D, Pal AK, Sahu NP, Yengkokpam S, Baruah K, Choudhury D, Venkateshwarlu G (2007) Digestive enzymes and metabolic profile of *Labeo rohita* fingerlings fed diets with different crude protein levels. *Comp Biochem Physiol B* 146:107-114. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.09.008>
- Dey S, Samanta P, Pal S, Mukherjee AK, Kole D, Ghosh AR (2016) Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). *Emerg Contami* 2:191-203. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.002>
- Ellman GL, Courtney KD, Andres jr V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Flammarion P, Devaux A, Nehls S, Migeon B, Noury P, Garric J (2002). Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol Environ Saf* 51:145-153. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2134>
- Fulton TW (1902) Rate of Growth of Sea Fishes. Neill & Company, Edinburgh
- Furné M, Garcia-Gallego M, Hidalgo MC, Morales AE, Domezain A, Domezain J, Sanz A (2009) Oxidative stress parameters during starvation and refeeding periods in Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquac Nutr* 15:587-595. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2095.2008.00626.x>
- Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T (2004) In vitro effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes. *Fish Shellfish Immunol* 16:501-512. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2003.08.007>
- Galloway TS, Brown RJ, Browne MA, Dissanayake A, Lowe D, Jones MB, Depledge MH (2004) A Multibiomarker Approach To Environmental Assessment. *Environ Sci Technol* 38:1723-1731. <https://doi.org/10.1021/es030570>
- García-Carreño FL, Haard NF (1993) Characterization of Proteinase Classes in Langostilla (*Pleuroncodes planipes*) and Crayfish (*Pacifastacus astacus*) Extracts. *J Food Biochem* 17:97-113. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4514.1993.tb00864.x>
- Geffard O, Ferrari B, Chaumot A, Montuelle B (2010) Les expérimentations *in situ*: principes et perspectives. *Sci Eaux & Territoires* 1:20-25. <http://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2010.1.05>
- Gerhardt A (2000) Biomonitoring of Polluted Water: Reviews on Actual Topics. Trans Tech, United-States
- German DP, Horn MH, Gawlicka A (2004) Digestive enzyme activities in herbivorous and carnivorous prickleback fishes (Teleostei: *Stichaeidae*): ontogenetic, dietary, and phylogenetic effects. *Physiol Biochem Zool* 77:789-804. <https://doi.org/10.1086/422228>
- Girao PM, Pereira da Silva EM, de Melo MP (2012) Dietary lycopene supplementation on Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) juveniles submitted to confinement: effects on cortisol level and antioxidant response: Dietary lycopene supplementation on Nile Tilapia. *Aquac Res* 43:789-798. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2011.02890.x>
- Grosell M, Hansen HJ, Rosenkilde P (1998) Cu uptake, metabolism and elimination in fed and starved European eels (*Anguilla anguilla*) during adaptation to water-borne Cu exposure. *Comp Biochem Physiol C* 120: 295–305. [https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10009-9](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10009-9)

- Guderley H, Lapointe D, Bedard M, Dutil JD (2003) Metabolic priorities during starvation: enzyme sparing in liver and white muscle of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Comp Biochem Physiol A* 135:347-356. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(03\)00089-8](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(03)00089-8)
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB (1974) Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249:7130–7139.
- Hani YMI, Marchand A, Turies C, Kerambrun E, Palluel O, Bado-Nilles A, Beaudouin R, Porcher JM, Geffard A, Dedourge-Geffard O (2018) Digestive enzymes and gut morphometric parameters of threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Influence of body size and temperature. *PLOS ONE* 13:e0194932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194932>
- 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 Immunol* 37:215-219. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2014.02.005>
- Htun-Han M (1978) The reproductive biology of the dab *Limanda limanda* (L.) in the North Sea: seasonal changes in the ovary. *J Fish Biol* 13:351–359. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1978.tb03445.x>
- Infante JZ, Cahu CL (1994) Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comp Biochem Physiol A* 109:209–212. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(94\)90122-8](https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90122-8)
- Javed M, Ahmad MI, Usmani N, Ahmad M (2017) Multiple biomarker responses (serum biochemistry, oxidative stress, genotoxicity and histopathology) in *Channa punctatus* exposed to heavy metal loaded waste water. *Sci Rep* 7:1675. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01749-6>
- Junge W, Wortmann W, Wilke B, Waldenström J, Kurrle-Weittenhiller A, Finke J, Klein G (2001) Development and evaluation of assays for the determination of total and pancreatic amylase at 37 degrees C according to the principle recommended by the IFCC. *Clin Biochem* 34:607-615. [http://doi.org/10.1016/S0009-9120\(01\)00278-8](http://doi.org/10.1016/S0009-9120(01)00278-8)
- Kenari AA, Naderi M (2016) Effects of enriched Artemia by fish and soybean oils supplemented with vitamin E on growth performance, lipid peroxidation, lipase activity and fatty acid composition of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) larvae. *Aquac Nutr*, 22:382-391. <https://doi.org/10.1111/anu.12260>
- Kumar S, Tembre M (1998) Digestive system. In: Kumar S and Tembre M (eds) *Anatomy and Physiology of Fishes*, Vikas Pub. House Pvt, New Delhi, p. 56-76
- Lacaze E, Devaux A, Mons R, Bony S, Garric J, Geffard A, Geffard O (2011) DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: a tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environ Pollut* 159:1682-1691 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.02.038>
- Lall SP (2000) Nutrition and health of fish. In: Cruz -Suárez LE, Ricque-Marie D, Tapia-Salazar M, Olvera-Novoa MA, Civera-Cerecedo R (eds) *Avances en Nutrición Acuicola V. Memorias del V Simposium Internacional de Nutrición Acuicola*, Mexico, 19–22.
- 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 (2016a) In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). *Ecotoxicol* 25 :1234-1259. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1677-z>
- 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 (2016b) In situ experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiol Biochem* 42:643-657. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0166-2>

- Leloutre C, Péry ARR, Porcher JM, Beaudouin R (2016) A bioenergetics model of the entire life cycle of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Ecol Freshw Fish* 27:116-127. <https://doi.org/10.1111/eff.12329>
- Liao K, Meng R, Ran Z, Cheng G, Wang Y, Xu J, Xu S, Yan X. (2017) Short-term starvation in silver pomfret (*Pampus argenteus*): molecular effects on lipid mobilization and utilization. *Aquac Res* 48:4874-4885. <https://doi.org/10.1111/are.13307>
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101:13-30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- Morales AE, Perez-Jimenez A, Hidalgo MC, Abellan E, Cardenete G (2004) Oxidative stress and antioxidant defenses after prolonged starvation in *Dentex dentex* liver. *Comp Biochem Physiol C* 139:153-161. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.10.008>
- Morrow MD, Higgs D, Kennedy CJ (2004) The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol C*, 137:143–154. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2004.01.001>
- Nwani CD, Somdare PO, Ogueji EO, Nwani JC, Ukonze JA, Nwadinigwe AO (2017) Genotoxicity assessment and oxidative stress responses in freshwater African catfish *Clarias gariepinus* exposed to fenthion formulations. *Drug Chem Toxicol* 40:273-280. <https://doi.org/10.1080/01480545.2016.1209772>
- OECD (2000) Fish , Juvenile Growth Test. In: Eleventh addendum to the OECD guidelines for testing of chemicals. OECD publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070202-en>
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95:351-358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Oikari A (2006) Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquat Toxicol* 78:370-381. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.010>
- Paglia DE, Valentine WN (1967) Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70:158-169.
- Panteghini MMD, Bais R (2008) Enzymes. In: Burtis CA, Ashwood ER, D BDEM (eds). *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, 6th edition. Saunders, ELSEVIER.
- Paoletti F, Aldinucci D, Mocali A, Caparrini A (1986) A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal Biochem* 154:536-541. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
- Pascual P, Pedrajas JR, Toribio F, López-Barea J, Peinado J (2003) Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chem Biol Interact* 145:191-199. [https://doi.org/10.1016/S0009-2797\(03\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0009-2797(03)00002-4)
- Peakall DB, Walker CH (1994) The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Vertebrates. Ecotoxicol* 3:173–179. <https://doi.org/10.1007/BF00117082>
- Peixoto MJ, Salas-Leiton E, Brito F, Pereira LF, Svendsen JC, Baptista T, Pereira R, Abreu H, Reis PA, Gonçalves JFM, Otavio R, de Almeida Ozorio RO (2017) Effects of dietary *Gracilaria sp* and *Alaria sp* supplementation on growth performance, metabolic rates and health in meagre (*Argyrosomus regius*) subjected to pathogen infection. *J Appl Phycol* 29:433-447. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0917-1>
- Péres A, Infante JZ, Cahu CL (1998) Dietary regulation of activities and mRNA levels of trypsin and amylase in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Fish Physiol Biochem* 19:145–152.

- Pottinger TG, Carrick TR, Yeomans WE (2002) The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *J Fish Biol* 61:207-229. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb01747.x>
- Quabius ES, Nolan DT, Segner H, Wendelaar Bonga SE (2001) Confinement stress and starvation modulate the induction of EROD activity after dietary exposure to PCB 126 in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Fish Physiol Biochem* 25:109–119. <http://doi.org/10.1023/A:1020590726262>
- Reimer G (1982) The influence of diet on the digestive enzymes of the Amazon fish *Matrincha, Brycon cf. melanopterus*. *J Fish Bio* 21:637–642. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1982.tb02867.x>
- Sanchez W, Palluel O, Meunier L, Coquery M, Porcher JM, Aït-Aïssa S (2005) Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ Toxicol Pharmacol* 19:177-183. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.003>
- Sanchez W, Aït-Aïssa 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. *Ecotoxicol* 16:279-287. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0131-z>
- 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. *Environ Int*, 34:490-498. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.11.003>
- Sanchez W, Piccini B, Porcher JM (2008b) Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *J Environ Sci Health. B* 43:65-70. <https://doi.org/10.1080/03601230701735151>
- Sanz A, Furne M, Trenzado CE, de Haro C, Sanchez-Muros MJ (2012) Study of the Oxidative State, as a Marker of Welfare, on Gilthead Sea Bream, *Sparus aurata*, Subjected to Handling Stress. *J World Aquac Soc* 43:707-715. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2012.00602.x>
- Sesay DF, Habte-Tsion HM, Zhou Q, Ren M, Xie J, Liu B, Chen R, Pan L (2016) Effects of dietary folic acid on the growth, digestive enzyme activity, immune response and antioxidant enzyme activity of blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerling. *Aquaculture* 452:142-150. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.10.026>
- Shiu YL, Lin HL, Chi CC, Yeh SP, Liu CH (2016) Effects of hiram lemon, *Citrus depressa* Hayata, leaf meal in diets on the immune response and disease resistance of juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (bloch), against *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol* 55:332-338. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.06.001>
- Silva FCP, Nicoli JR, Zambonino-Infante JL, Le Gall MM, Kaushik S, Gatesoupe FJ (2010) Influence of partial substitution of dietary fish meal on the activity of digestive enzymes in the intestinal brush border membrane of gilthead sea bream, *Sparus aurata* and goldfish, *Carassius auratus*. *Aquaculture*, 306:233-237. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2010.05.018>
- Slooff W, Van Kreijl CF, Baars AJ (1983) Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquat Toxicol*, 4:1-14. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(83\)90057-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(83)90057-7)
- Stancova V, Plhalova L, Blahova J, Zivna D, Bartoskova M, Siroka Z, Marsalek P, Svobodova Z (2017) Effects of the pharmaceutical contaminants ibuprofen, diclofenac, and carbamazepine alone, and in combination, on oxidative stress parameters in early life stages of tench (*Tinca tinca*). *Vet Med* 62:90-97. <https://doi.org/10.17221/125/2016-VETMED>
- Stepić S, Hackenberger BK, Hackenberger DK, Velki M, Lončarić Ž (2012) Impact of Oxidative Stress Indicated by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Protein Carbonyl Levels (PC)

- on Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Induction in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Water Air Soil Pollut* 223:4785-4793. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1234-1>
- Sturve J, Hultman MT, Wassmur B, Almroth BC (2017) Determining oxidative stress and EROD activity in dab (*Limanda limanda*) in the North and Baltic Seas. *Marine Environ Res* 124:46-53. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.10.008>
- Trevisan R, Uliano-Silva M, Franco J L, Posser T, Hoppe R, Farina M, Bainy AC, Dafre, A L (2013) Confinement during field studies may jeopardize antioxidant and physiological responses of Nile tilapia to contaminants. *Marine Environ Res* 91:97-103. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.005>
- Turja R, Lehtonen, KK Meierjohann A, Brozinski JM, Vahtera E, Soirinsuo A, Sokolov A, Snoeijs P, Budzinski H, Devier MH, Peluhet L, Paakkonen JP, Viitasalo M, Kronberg L (2015) The mussel caging approach in assessing biological effects of wastewater treatment plant discharges in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Marine Pollut Bull* 97:135-149. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.06.024>
- Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen NP (2003) Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ toxicol pharmacol* 13:57–149. [http://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](http://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- 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 Biol Toxicol* 10:415-421. <https://doi.org/10.1007/BF00755791>
- Vieira CED, Costa PG, Cabrera LC, Primel EG, Fillmann G, Bianchini A, Bueno Dos Reis Martinez C (2017) A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Sci Total Environ*, 586:598-609. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.026>
- Viganò L, Arillo A, Bagnasco M, Bennicelli C, Melodia F (1993) Xenobiotic metabolizing enzymes in uninduced and induced rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects of diets and food deprivation. *Comp Biochem and Physiol Part C* 104:51-55. [https://doi.org/10.1016/0742-8413\(93\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0742-8413(93)90110-7)
- Villarreal F, Falisse E, Morin D, Buckpitt A, Kültz D (2012) Effect of naphthalene and copper nanoparticles on three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *FASEB J* 26:1_supplement, 833.13-833.13.
- Wootton RJ (1994) Energy allocation in the threespine stickleback. In: Bell MA and Foster SA (eds), *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback*, Oxford University, United-States, p114-140
- Wootton RJ (1984) *A Functional Biology of Sticklebacks*. University of California Press, United-States.
- Wootton RJ (1976) *The biology of the sticklebacks*. Academic Press, United-States.
- Yengkokpam S, Debnath D, Pal AK, Sahu NP, Jain KK, Norouzitallab P, Baruah K (2013) Short-term periodic feed deprivation in *Labeo rohita* fingerlings: Effect on the activities of digestive, metabolic and anti-oxidative enzymes. *Aquaculture* 412-413:186-192. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2013.07.025>
- Zeyl JN, Love OP, Higgs DM (2014) Evaluating gonadosomatic index as an estimator of reproductive condition in the invasive round goby, *Neogobius melanostomus*. *J Great Lakes Res*, 40:164-171. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2013.12.004>

2. OPTIMISATION DES CAGES

Afin d'améliorer la qualité de vie des épinoches durant les périodes d'encagement, et pour intégrer les nouvelles directives liées au bien-être animal, les cages ont été améliorées pour prendre en compte les spécificités comportementales des poissons. Ainsi, la longueur et le diamètre ont été augmentés par rapport aux cages utilisées dans l'étude de l'article 1 pour permettre aux épinoches d'avoir plus d'espace de nage. Un élargissement des mailles (de 3,5mm de côté à 5 mm de côté) a permis de limiter le colmatage et d'améliorer le passage de la nourriture à l'intérieur des cages (figure 10). De plus, des caches en PVC ont été ajoutées pour permettre aux poissons de conserver un comportement de fuite en cas de stress (agressivité d'autres épinoches, courant, prédateur). L'objectif de ces optimisations est de permettre aux poissons d'exprimer des comportements normaux pour minimiser au maximum tout risque de stress et ainsi de s'approcher au mieux de leurs conditions de vie naturelles.

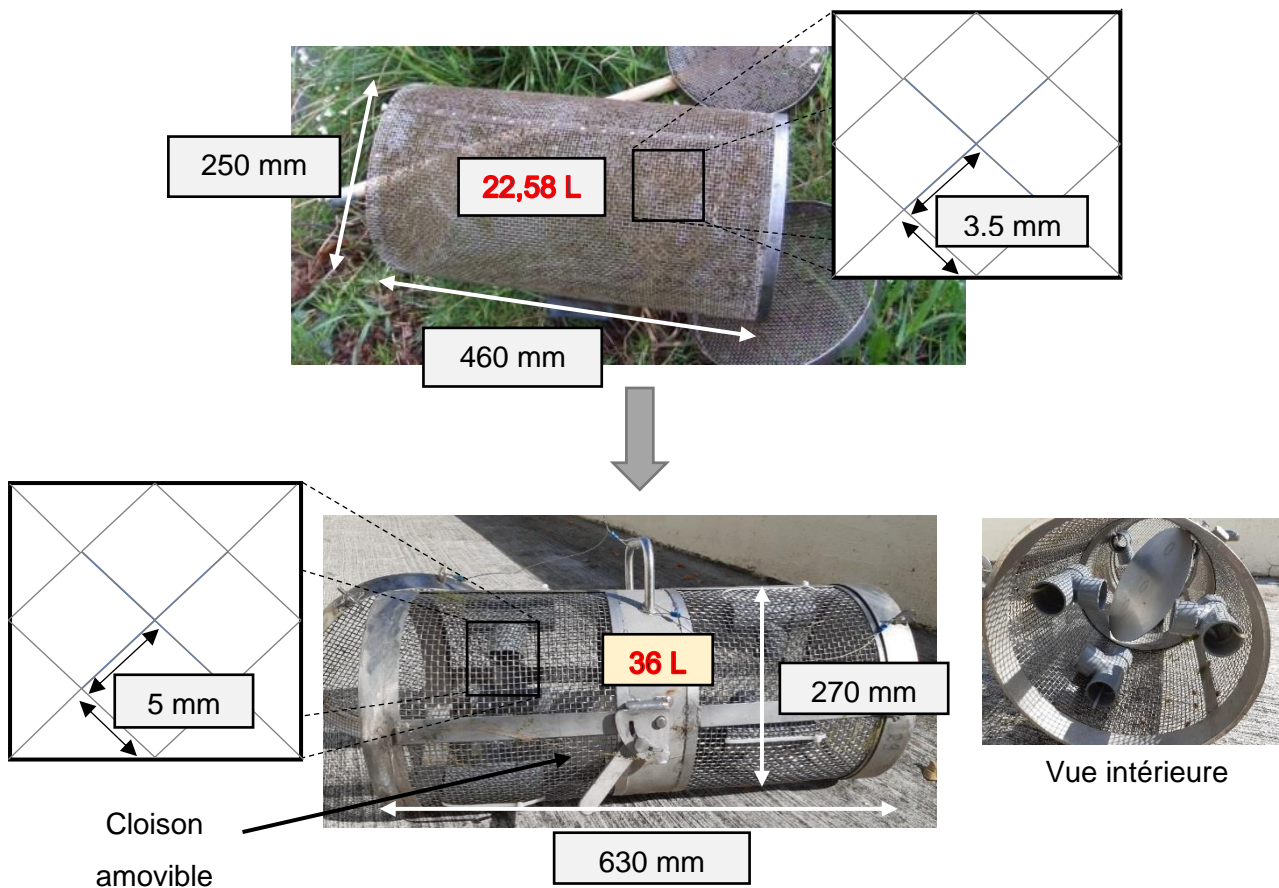


Figure 10 : Caractéristiques des différentes cages utilisées en biosurveillance active chez l'épinoche à trois épines. En haut : ancienne version, utilisée dans l'étude présentée dans l'article 1 ; en bas : nouvelle version, utilisée pour toutes les applications *in situ*

3. IMPACTS DE CERTAINS FACTEURS CONFONDANTS SUR LES NIVEAUX DE BASE DES BIOMARQUEURS

3.1. Exploration des données historiques du laboratoire

Quelle que soit la stratégie de biosurveillance utilisée (active ou passive), il est nécessaire d'avoir une idée la plus précise possible des niveaux de référence des biomarqueurs mesurés. Les niveaux de référence doivent en effet permettre de comparer les réponses mesurées sur des sites d'intérêt avec les réponses mesurées chez des organismes sains, non exposés à des contaminants. Cependant ces valeurs basales peuvent varier selon de nombreux facteurs confondants à la fois biotiques (taille, sexe, âge des individus) et abiotiques (température, conductivité, oxygène dissous). La zone géographique et l'hydrosystème considérés peuvent également influencer les niveaux de bases des biomarqueurs chez les individus. Ainsi, certains auteurs recommandent l'utilisation de sites de références différents, propres à chaque bassin versant et hydrosystème (Sanchez and Porcher 2009). Cette recommandation est facile à mettre en œuvre dans le cas d'études sur des pollutions locales ou ponctuelles, pour lesquelles il est possible de réaliser des comparaisons entre des individus exposés en aval de la pollution avec des individus exposés en amont. Cependant, dans le contexte actuel de contamination diffuse et généralisée des milieux aquatiques, les sites les moins anthropisés ne sont généralement pas totalement exempts de contaminants. Il est donc de plus en plus difficile de définir de vrais sites de référence. Une des solutions envisagées peut alors être la caractérisation de valeurs de référence en laboratoire. Cette solution est d'autant plus intéressante que, dans l'approche de biosurveillance active déployée dans le cadre de cette thèse, les épinoches utilisées proviennent de la même population initiale, bien connue et suivie. De plus, ces valeurs de référence génériques pourraient permettre de comparer des sites présents sur des bassins hydrographiques distants.

Une base de données historiques du laboratoire a donc été constituée, dans l'objectif de définir des valeurs basales de référence pour la population d'épinoches utilisée à l'INERIS. Cette base de données regroupe 36 expérimentations réalisées à des saisons et dans des conditions différentes sur une période d'environ 15 ans.

Dans cette partie, seuls les biomarqueurs associés au stress oxydatif (GSH, GPx, CAT, SOD, TBARS), à la biotransformation (GST, EROD) et à la transmission synaptique (AChE) ont été pris en compte. Les paramètres du système immunitaire inné ont en effet été traités de manière complète et détaillée par Marchand et al. (2019). De plus, en cas d'absence de perturbation endocrinienne, la VTG chez les mâles et la SPG chez les femelles ne sont pas

déTECTABLES, ce qui permet de s'affranchir du calcul de valeurs de référence pour ces deux biomarqueurs.

Le tableau 7 présente les moyennes, les écart-types ainsi que les coefficients de variation des biomarqueurs mesurés chez les témoins de chaque expérimentation. Les expérimentations pour lesquels les mesures des biomarqueurs cités précédemment sont absentes n'ont pas été prises en compte. Les expérimentations ont été séparées par saison, et par année. Pour la GPx et la CAT, deux biomarqueurs particulièrement influencés par le sexe des individus, des valeurs ont été calculées séparément pour les mâles et les femelles.

Le coefficient de variation a été calculé d'après la formule suivante :

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} * 100$$

où σ et μ correspondent respectivement à l'écart-type et à la moyenne pour une expérimentation donnée.

Le premier aspect mis en évidence lors de cette exploration du jeu de données est l'importante variabilité des niveaux de biomarqueurs mesurée au sein même des expérimentations, alors même que les épinoches ne sont exposées à aucun stress chimique. Cette variabilité interindividuelle est mise en évidence par des coefficients de variation élevés pour tous les biomarqueurs, compris généralement entre 40 et 80 %. La GST semble être le biomarqueur le moins variable, avec des CV souvent inférieurs à 35 %. La concentration en TBARS, l'activité GPx chez les mâles et l'activité EROD semblent être les biomarqueurs les plus variables en fonction des individus, avec des CV souvent supérieurs à 80 %. Cette importante variabilité inter-individuelle peut s'expliquer par des variations liées à la taille des individus mais également à leur statut reproducteur.

Le second aspect mis en évidence par cette simple observation des moyennes concerne les différences dans les niveaux de biomarqueurs mesurés en fonction des expérimentations. Ainsi par exemple, l'activité GPx moyenne mesurée en condition témoin au laboratoire au printemps était égale à 97,9 U/g de protéine en 2013 et à 14.1 U/g de protéine en 2016, soit une différence égale à un facteur 7. Les concentrations en GSH et en TBARS au laboratoire varient respectivement d'un facteur 5,6 et 3,6 entre 2013 et 2016 au printemps. Des facteurs de variation supérieurs à 2 sont également observés au printemps pour la catalase chez les deux sexes. Ces différences mesurées pendant la période de reproduction peuvent s'expliquer par (i) une différence dans la taille des épinoches utilisées lors des différentes expérimentations mais également (ii) par des différences dans le statut reproducteur des individus, connus pour induire des variations dans les réponses physiologiques.

Cependant, même en dehors de la période de reproduction, les différences inter-expérimentations sont importantes pour la majorité des biomarqueurs. L'activité SOD mesurée chez les épinoches en mésocosmes en automne varie ainsi d'un facteur 2,4 entre 2013 et 2014. La concentration en glutathion total (GSH) varie également d'un facteur 3,9 en automne en laboratoire entre 2008 et 2013. Ce facteur de variation passe à 8 lorsque les niveaux de GST mesurés en laboratoire en 2008 sont comparés avec les niveaux mesurés sur un site de référence en 2004.

Ainsi, en plus de la variabilité liée au statut reproducteur des épinoches, d'autres paramètres peuvent jouer un rôle dans les niveaux des biomarqueurs mesurés tel que l'expérimentateur, les conditions d'expérimentation (bassin, laboratoire, mésocosme), le changement de l'automate du laboratoire ainsi que l'adaptations des protocoles de dosage, en particulier liés au passage des dosages en plaques de 384 puits (au lieu de 96 puits initialement). Enfin, les conditions physicochimiques (en particulier la température) dans lesquelles ont été réalisées les différentes expérimentations peuvent influencer significativement les niveaux de réponses des biomarqueurs. Tous ces facteurs, même s'ils ne sont pas tous connus et maîtrisés, augmentent la variabilité des réponses des biomarqueurs. Cette variabilité rend difficile l'établissement de valeurs de référence à l'aide de la base des données historiques du laboratoire (en particulier si l'on souhaite utiliser l'intégralité du jeu de données).

Tableau 7 : Niveaux des biomarqueurs chez des épinoches à trois épines maintenues en condition de référence à l'INERIS.

Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm écart-type. Chaque ligne représente une expérimentation. Loc. : localisation ; GPx : Glutathion-péroxydase ; CAT : Catalase ; GSH : Glutathion total ; SOD : Superoxyde dismutase ; TBARS : Substances réactives aux acides thiobarbituriques ; EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase ; AChE : Acétylcholinestérase.

Saison	Loc.	Année	GPx ♂				GPx ♀				CAT ♂				CAT ♀			
			μ	\pm	σ	CV (%)	μ	\pm	σ	CV (%)	μ	\pm	σ	CV (%)	μ	\pm	σ	CV (%)
HIVER	Laboratoire	2013																
	Laboratoire + Bassin extérieurs	2015	32.8	\pm	32.7	99.7	98.5	\pm	67.6	68.6	2010895	\pm	1575680	78.4	2556545	\pm	1475272	57.7
AUTOMNE	Mésocosmes	2002																
	<i>In situ</i>	2004	118.9	\pm	113.2	95.2	133.5	\pm	53.1	39.7								
	Laboratoire	2006																
	Laboratoire	2008	57.2	\pm	9.6	16.7	128.7	\pm	50.5	39.3								
	Laboratoire	2013	43.8	\pm	25.7	58.6	154.4	\pm	145.5	94.2	533686	\pm	418141	78.3	984375	\pm	480054	48.8
	Mésocosmes	2013	31.5	\pm	21.4	67.9	69.3	\pm	36.6	52.8	618284	\pm	345155	55.8	1126363	\pm	629066	55.8
	Mésocosmes	2014	15.6	\pm	7.7	49.3	54.4	\pm	22.1	40.6	118851	\pm	64584	54.3	276364	\pm	87434	31.6
	Bassin extérieurs	2016	30.5	\pm	9.7	31.9	176.1	\pm	109.1	61.9	651725	\pm	450655	69.1	1299344	\pm	434426	33.4
Laboratoire + Bassin extérieur	2016	9.5	\pm	5.4	57.1	49.4	\pm	41.1	83.1	697799	\pm	348838	50.0	1021603	\pm	540458	52.9	
PRINTEMPS	Mésocosmes	2002	155.5	\pm	93.7	60.3	124.2	\pm	117.5	94.6								
	Laboratoire	2007	68.7	\pm	38.0	55.3	47.4	\pm	22.1	46.5								
	Laboratoire	2013	97.9	\pm	92.1	94.0	174.8	\pm	143.8	82.3	535427	\pm	265842	49.7	804828	\pm	536393	66.6
	Laboratoire	2016	19.1	\pm	7.9	41.3	49.7	\pm	15.0	30.2								
	Laboratoire	2016	15.3	\pm	6.1	40.0	44.4	\pm	22.3	50.1								
	Laboratoire	2016	14.1	\pm	5.2	36.6	31.3	\pm	4.2	13.4								
	Bassin extérieur	2016	21.7	\pm	8.8	40.7	39.8	\pm	21.2	53.3	718479	\pm	310825	43.3	643784	\pm	183716	28.5
	Laboratoire + Bassin extérieur	2016	31.4	\pm	46.5	148.2	129.4	\pm	72.7	56.2	1441630	\pm	1126492	78.1	1525658	\pm	1101937	72.2
ÉTÉ	Mésocosmes	2001																
	Mésocosmes	2002	52.1	\pm	12.5	24.1	121.1	\pm	62.2	51.4								
	<i>In situ</i>	2003	56.7	\pm	47.1	83.0	113.1	\pm	56.8	50.3								
	<i>In situ</i>	2004	74.1	\pm	38.7	52.2	133.9	\pm	115.6	86.3								
	<i>In situ</i>	2005	94.9	\pm	14.1	14.9	264.6	\pm	141.0	53.3								
	Laboratoire + Bassin extérieur	2016									926016	\pm	422751	45.7	1215485	\pm	569662	46.9

Tableau 7 (suite)

Saison	Loc.	Année	GSH				SOD				TBARS													
			μ	\pm	σ	CV (%)	μ	\pm	σ	CV (%)	μ	\pm	σ	CV (%)										
HIVER	Laboratoire	2013																						
	Laboratoire + Bassin extérieur	2015	15.2	\pm	13.4	88.3	9694	\pm	7146	73.7	38.0	\pm	48.4	127.1										
AUTOMNE	Mésocosmes	2002																						
	<i>In situ</i>	2004	40.6	\pm	18.1	44.6					52.1	\pm	17.2	33.0										
	Laboratoire	2006																						
	Laboratoire	2008	5.0	\pm	3.3	66.4					26.8	\pm	15.8	59.1										
	Laboratoire	2013	19.6	\pm	7.8	39.9	821	\pm	518	63.1	50.7	\pm	29.8	58.7										
	Mésocosmes	2013	10.5	\pm	6.7	63.6	2058	\pm	676	32.9														
	Mésocosmes	2014	6.9	\pm	4.1	59.6	841	\pm	495	58.9														
	Bassin extérieur	2016	22.5	\pm	8.2	36.4	6309	\pm	1762	27.9	16.7	\pm	7.2	43.3										
	Laboratoire + Bassin extérieur	2016	14.1	\pm	5.8	40.8	5385	\pm	2447	45.4	27.0	\pm	16.3	60.4										
PRINTEMPS	Mésocosmes	2002					6464		2826	43.7														
	Laboratoire	2007	6.2	\pm	2.7	43.8																		
	Laboratoire	2013	20.4	\pm	8.0	39.3	3127	\pm	1439	46.0	71.8	\pm	101.6	141.6										
	Laboratoire	2016	4.1	\pm	2.4	59.7					130.7	\pm	54.8	41.9										
	Laboratoire	2016	3.6	\pm	2.0	55.4					255.7	\pm	127.9	50.0										
	Laboratoire	2016	3.6	\pm	1.9	51.3					177.6	\pm	117.9	66.4										
	Bassin extérieur	2016	14.9	\pm	6.1	40.8	4764	\pm	1387	29.1														
Laboratoire + Bassin extérieur	2016	22.3	\pm	16.0	71.8	9135	\pm	5229	57.2	29.1	\pm	33.2	114.1											
ÉTÉ	Mésocosmes	2001	19.6	\pm	15.0						59.6	\pm	32.7											
	Mésocosmes	2002					7543	\pm	4066	53.9	70.0	\pm	90.2	128.9										
	<i>In situ</i>	2003	30.4	\pm	22.4	73.6	5626	\pm	1836	32.6	46.3	\pm	24.7	53.4										
	<i>In situ</i>	2004	81.4	\pm	56.0	68.8					53.4	\pm	22.8	42.7										
	<i>In situ</i>	2005	19.2	\pm	14.1	73.1					53.2	\pm	33.5	63.1										
	Laboratoire + Bassin extérieur	2016	14.8	\pm	10.2		3746	\pm	561		14.9	\pm	11.2											

Tableau 7 (suite)

Saison	Loc.	Année	GST				EROD				AChE			
			μ	\pm	σ	CV (%)	μ	\pm	σ	CV (%)	μ	\pm	σ	CV (%)
HIVER	Laboratoire	2013					0.8	\pm	0.5			53.4	\pm	24.9
	Laboratoire + Bassin extérieur	2015	2142.7	\pm	1281.3	59.8	1.7	\pm	1.5	93.1		45.2	\pm	28.6 63.3
AUTOMNE	Mésocosmes	2002					4.2	\pm	4.9					
	In situ	2004	1967.2	\pm	440.7	22.4	4.9	\pm	3.6	72.8				
	Laboratoire	2006	1336.5	\pm	542.3		6.1	\pm	2.8					
	Laboratoire	2008	1746.1	\pm	506.8	29.0	5.5	\pm	6.3	112.9				
	Laboratoire	2013	909.0	\pm	415.1	45.7								
	Mésocosmes	2013												
	Mésocosmes	2014					1.3	\pm	1.0	74.8		103.8	\pm	47.8 46.1
	Bassin extérieur	2016	1695.8	\pm	510.8	30.1	0.8	\pm	0.4	49.8		48.8	\pm	12.2 25.1
	Laboratoire + Bassin extérieur	2016	1757.7	\pm	688.7	39.2	0.6	\pm	0.5	79.9		116.3	\pm	45.3 38.9
PRINTEMPS	Mésocosmes	2002					32.7	\pm	27.1	82.8				
	Laboratoire	2007	2743.4	\pm	674.9	24.6	7.4	\pm	6.7	90.6				
	Laboratoire	2013									129.5	\pm	80.7 62.3	
	Laboratoire	2016	2767.2	\pm	674.5	24.4	0.7	\pm	0.3	41.8		27.9	\pm	9.7 34.8
	Laboratoire	2016	2692.5	\pm	777.8	28.9	0.7	\pm	0.3	42.5		27.3	\pm	11.1 40.7
	Laboratoire	2016	2402.5	\pm	708.3	29.5	0.9	\pm	0.5	56.9		38.0	\pm	20.3 53.5
	Bassin extérieur	2016	3354.2	\pm	699.2	20.8	0.4	\pm	0.2	58.3		26.4	\pm	24.4 92.3
	Laboratoire + Bassin extérieur	2016	1765.0	\pm	1375.8	78.0	1.1	\pm	1.5	134.4		68.3	\pm	35.0 51.3
ÉTÉ	Mésocosmes	2001					7.5	\pm	8.5					
	Mésocosmes	2002					24.0	\pm	22.2	92.7				
	In situ	2003	1247.8	\pm	406.6	32.6	29.1	\pm	24.8	85.0				
	In situ	2004	1562.0	\pm	624.3	40.0	7.1	\pm	4.0	56.4				
	In situ	2005	3012.6	\pm	2419.3	80.3	7.1	\pm	8.4	117.6				
	Laboratoire + Bassin extérieur	2016	1731.3	\pm	744.1		0.8	\pm	0.7			129.9	\pm	59.1

3.2. Impacts du sexe, de la taille et de la saison sur les valeurs basales des biomarqueurs

Des données issues d'une expérimentation de l'année 2016 ont été extraites de la base de données historiques afin de mettre en évidence les effets de la taille, de la saison mais aussi du sexe des individus sur les niveaux de biomarqueurs. Restreindre le jeu de donnée à une expérimentation permet de s'affranchir des facteurs de variabilité liés à l'expérimentateur ainsi qu'aux protocoles et aux appareils de laboratoire. Ces données ont été choisies car elles regroupent une large gamme de taille (30 mm à 60 mm) avec l'ensemble des biomarqueurs mesurés sur chaque individu avec les appareils et les protocoles les plus récemment utilisés au laboratoire. Ce jeu de données comporte ainsi suffisamment d'individus pour tester les effets (i) de la saison de prélèvement, (ii) du sexe et (iii) de la taille des individus sur les niveaux des biomarqueurs en condition de référence.

D'un point de vue méthodologique, les variations saisonnières de température et de photopériode avaient été simulées en laboratoire afin de permettre aux poissons d'effectuer leur cycle naturel. Des poissons de différentes classes de taille (30-35mm, 35-40mm, 40-45mm et >45mm) avaient été échantillonnés en février, avril, juin, août et octobre.

Des ANOVA hiérarchiques à trois facteurs ont permis de définir quels paramètres influencent significativement les niveaux du biomarqueur considéré. Les résultats sont résumés dans le tableau 8. La période de l'année est le facteur qui influence le plus grand nombre de biomarqueurs, suivie par la taille et le sexe des individus. Le modèle montre cependant que l'influence de la taille semble souvent dépendante de la période considérée (significativité du facteur période × taille pour 5 biomarqueurs sur 8). Cette forte influence de la période peut être expliquée par le fait que ce facteur regroupe plusieurs paramètres dont les effets ne sont pas détaillés ici, à savoir la température de l'eau, la photopériode, mais également le stade gonadique des poissons et leur comportement lié à la période de reproduction (de mars à septembre). En effet, les besoins énergétiques sont accrus durant cette période, tant chez les femelles (maturation des œufs) que chez les mâles (construction d'un nid, comportement agressif) ce qui influence les paramètres biochimiques comme cela a déjà été démontré de nombreuses fois (Ronisz et al. 2000; Kopecka and Pempkowiak 2008; Sanchez et al. 2008c).

Tableau 8 : Résultats des ANOVA hiérarchiques appliquées à chaque biomarqueur pour l'ensemble des données
 (* : 0,05 < p < 0,01 ; ** : 0,01 < p < 0,001 ; *** : p < 0,001)

	Période	Sexe	Taille	Période×Sexe	Période×Taille	Sexe×Taille	Période×Sexe×Taille
EROD	*		***				
GST			*		*		
GSH	***	*	*				
GPx	***	***	***	**		*	
CAT	***	*			***		
SOD	***		*		*		
TBARS	***	*	***		*		
AChE	***				**		

Ces ANOVA ont été complétées par des analyses de partitionnement de la variance afin de caractériser précisément la part de variance expliquée par ces trois paramètres (tableau 9). La période de prélèvement est le facteur qui influe le plus le GSH ainsi que les activités CAT, SOD et AChE, avec respectivement 10 %, 28,4 %, 26,2 % et 40,9 % de la variabilité de ces paramètres expliquée par ce facteur période. La variabilité globale de l'activité GPx dans ce jeu de données est majoritairement expliquée par une différence entre les sexes (27,6 %), même si la période de prélèvement et la taille expliquent respectivement 9,5 % et 19,39 % de la variabilité de ce biomarqueur. La taille est également un facteur de variation majeur pour les TBARS, dont la variabilité est expliquée à 11,71 % par ce facteur. La variance résiduelle correspond au taux de variation qui n'est expliqué par aucun des facteurs étudiés et peut être assimilée à de la variabilité interindividuelle. Celle-ci est très élevée pour tous les paramètres (supérieure à 50 % sauf pour la GPx), ce qui montre que la variabilité interindividuelle est très importante, même lorsque les facteurs de variation principaux ont été extraits.

Tableau 9 : Résultats des analyses de partitionnement de la variance (%).
 En rouge sont reportés les paramètres pour lesquels les p-value ont été significatives lors des ANOVA hiérarchiques. Une absence de chiffre signifie un pourcentage de variance expliqué par ce paramètre trop faible pour être mesuré (Var. résiduelle = variance résiduelle)

	Période	Sexe	Taille	Période×Sexe	Période×Taille	Sexe×Taille	Période×Sexe×Taille	Var. résiduelle
EROD	3.7	0.1	4.8	0.1		0.1		92.94
GST	4.4	0.5	1.4					94.70
GSH	10.0	1.3						89.21
GPx	9.5	27.6	19.4	1.7		0.3		44.10
CAT	28.4	1.2	0.6	1.0	2.1			66.77
SOD	26.2		1.4		1.2			71.47
TBARS	9.7	0.2	11.7		1.3	0.1		77.44
AChE	40.9		0.2					59.72

Ainsi, ces analyses ont permis de confirmer l'importance de la taille, du sexe et de la saison sur les niveaux des biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines. Les résultats ont également mis en évidence l'importante variabilité inter-individuelle de ces biomarqueurs. Celle-ci pourrait compliquer l'utilisation de valeurs de références génériques lors d'études *in situ*. En effet, si la variabilité basale des biomarqueurs est supérieure aux modulations induites par des composés chimiques, aucune conclusion ne pourra être tirée concernant les sites étudiés.

3.3. Calcul de valeurs de références en automne et en hiver

Durant la première expérimentation réalisée dans le cadre de cette thèse (Article 1), la période automne-hiver a été mise en évidence comme étant la période la plus propice à l'encagement de l'épinoche. Ainsi, durant l'ensemble de ces travaux de thèse, les expérimentations ont été réalisées durant ces deux saisons. Le calcul de valeurs de référence pour cette période paraît donc prioritaire par rapport aux autres saisons.

Dans ce but, les données des mois d'octobre et de février de l'année 2016 décrites précédemment ont été réutilisées. Des différences peuvent exister dans les niveaux physiologiques de base en fonction des conditions de maintien des poissons. Ainsi, pour compléter ces données de 2016 obtenues en laboratoire, d'autres données de la même année et des mêmes mois obtenues sur des épinoches prélevées dans des bassins extérieurs à l'INERIS en conditions écosystémiques, ont été ajoutées. De plus, seuls les poissons compris entre 38mm et 48mm ont été pris en compte, afin de limiter au maximum la variabilité induite par le facteur taille et de correspondre au mieux aux individus utilisés en biosurveillance active. Les poissons inférieurs à 38mm ne peuvent en effet pas être utilisés avec l'approche multibiomarqueurs actuelle, en raison de la difficulté à prélever le sang sur des poissons de petite taille et du faible volume hépatique qui rend difficile le dosage de l'ensemble des biomarqueurs.

Des ANOVA hiérarchiques ont été réalisées afin de caractériser l'influence des facteurs « Période » (octobre ou février), « condition de maintien des poissons » (laboratoire ou bassin extérieur), « Sexe » et « Taille » sur les niveaux de base des biomarqueurs. Si l'effet « Période » présentait un impact significatif sur un paramètre, les analyses ont été reconduites séparément pour chaque mois avec en facteurs « Condition », « Sexe » et « Taille ».

Les résultats sont résumés dans le tableau 10. Malgré la période sélectionnée (hors reproduction), le facteur « période » présente un impact significatif sur tous les biomarqueurs, hormis la concentration en GSH et en TBARS. Des différences entre les niveaux physiologiques mesurés en laboratoire et en bassins extérieurs sont également fréquemment retrouvées.

Tableau 10 : Résultats des ANOVA hiérarchiques appliquées à chaque biomarqueur en octobre et février pour des poissons de taille comprise entre 38mm et 48mm
 (* : 0,05 < p < 0,01 ; ** : 0,01 < p < 0,001 ; *** : p < 0,001)

	Période	Condition	Sexe	Taille	Période x Condition	Période x Sexe	Condition x Sexe	Période x Taille	Condition x Taille	Sexe x Taille
GSH									**	
GPx	***		***							
CAT	***	**	*		*					
SOD	***									
TBARS		***						*		
AChE	***									
EROD	***	***			***					
GST	**	***			*					

Les facteurs confondants significatifs ont été retenus pour la définition de valeurs de référence théoriques. La moyenne ainsi que les écart-types ont été calculés pour ces périodes en fonction des facteurs ayant un impact significatif sur les biomarqueurs (tableau 11).

Tableau 11 : Valeurs basales des biomarqueurs calculées à partir des données de février et octobre en laboratoire et dans les bassins en conditions écosystémiques pour des poissons de taille comprise entre 38mm et 48 mm (stress oxydant, détoxification métabolique et neurotoxicité)

Biomarqueurs	Période	Condition	Sexe	Moyenne	Ecart-type	
STRESS OXYDANT	GSH ($\mu\text{mol/g prot}$)	Février - Octobre	Laboratoire - Bassin	♂ - ♀	15.07	± 9.18
	GPx (U/g prot)	Février	Laboratoire - Bassin	♂	27.70	± 17.72
				♀	118.65	± 53.37
		Octobre	Laboratoire - Bassin	♂	9.24	± 5.60
				♀	35.51	± 33.83
	CAT (U/g prot)	Février	Laboratoire	♂	2177690	± 1239810
				♀	2924290	± 1072020
			Bassin	♂	789890	± 502490
				♀	1883500	± 1194560
	SOD (U/g prot)	Février	Laboratoire - Bassin	♂ - ♀	8238.97	± 2471.17
		Octobre	Laboratoire - Bassin	♂ - ♀	5042.33	± 2648.82
	TBARS (nmol/g prot)	Février - Octobre	Laboratoire	♂ - ♀	29.18	± 17.90
			Bassin	♂ - ♀	15.88	± 10.00
DÉTOXICATION MÉTABOLIQUE	EROD (pml/min/mg prof)	Février	Laboratoire	♂ - ♀	1.21	± 0.70
			Bassin	♂ - ♀	3.51	± 1.80
		Octobre	Laboratoire - Bassin	♂ - ♀	0.57	± 0.45
	GST (U/g prot)	Février	Laboratoire	♂ - ♀	3034.50	± 1393.36
			Bassin	♂ - ♀	1609.45	± 683.68
		Octobre	Laboratoire - Bassin	♂ - ♀	1759.59	± 720.41
NEURO-TOXICITÉ	AChE (U/g prot)	Février	Laboratoire - Bassin	♂ - ♀	40.85	± 22.55
		Octobre	Laboratoire - Bassin	♂ - ♀	126.16	± 44.01

3.4. Comparaison des valeurs de références avec de nouvelles données

Ces valeurs de références obtenues avec les données de l'année 2016 ont été comparées avec les niveaux de biomarqueurs mesurés en laboratoire et en bassins extérieurs durant les diverses expérimentations réalisées dans le cadre de cette thèse entre 2016 et 2019. Les résultats des comparaisons sont représentés sur les figures 11 et 12. La figure 11 représente les comparaisons des données obtenues en automne (octobre) et la figure 12 représente les comparaisons des données obtenues en hiver (février).

Même si certains biomarqueurs présentent des niveaux semblables lors des 4 années (i.e. TBARS et GSH en hiver, SOD en octobre, EROD et GST entre 2016 et 2017), les résultats mettent en évidence de nombreuses différences entre les références 2016 et les réponses mesurées par la suite dans les mêmes conditions entre 2017 et 2019.

Certaines différences interannuelles sont très élevées. C'est le cas par exemple de la CAT pour laquelle une réduction significative de l'activité a été observée sur les trois années par rapport aux valeurs mesurées en 2016, avec une division de l'activité par un facteur compris entre 4,6 et 5,3 en automne et entre 9,9 et 21,9 en hiver pour les mâles et les femelles respectivement. Au contraire, les activités GST mesurées étaient beaucoup plus importantes en 2018 ($\times 4,8$) et en 2019 ($\times 5,6$ en janvier et $\times 4,2$ en février) que les valeurs enregistrées en 2016. Enfin, la concentration en GSH n'était pas quantifiable en octobre 2017 et 2018 car très proches de la limite de détection.

D'autres différences, moins importantes mais néanmoins significatives, sont à prendre en compte. L'activité SOD était significativement plus faible en hiver 2019 par rapport à l'hiver 2016 (division par un facteur 2,9 en janvier et 1,5 en février). Une variabilité interannuelle a également été mise en évidence pour l'activité de la GPx, en particulier en hiver chez les femelles, avec une réduction de l'activité d'un facteur 2,8 en janvier 2019 et d'un facteur 1,9 en février 2019 par rapport à la référence 2016. En automne, seule l'activité mesurée chez les femelles en 2017 était différente de la référence (induction d'un facteur 2,6). Les valeurs mesurées chez les mâles en octobre 2017 étaient également plus importantes que l'activité enregistrée en 2016 (induction d'un facteur 2,2). L'activité AChE présente également des différences interannuelles significatives, pour les deux saisons : augmentation d'un facteur d'environ 1,6 en 2017 et 2018 par rapport à la référence en automne et diminution d'un facteur 1,4 et 2,3 en 2019 en février et janvier respectivement. De même, les activités EROD mesurées en octobre 2018 et en février 2019 étaient respectivement plus ($\times 2,8$) ou moins ($/ 5,2$) importantes que les références 2016. Enfin, pour les TBARS, les valeurs mesurées chez

les épinoches maintenues dans les bassins extérieurs en 2018 étaient induites d'un facteur de 2,2 par rapport aux valeurs de référence calculées pour les épinoches des bassins en 2016.

Ces facteurs de variation interannuels peuvent être comparés avec des facteurs d'inductions obtenus après une exposition de poissons adultes à des composés chimiques (tableau 12). Pour la catalase, la GST, la SOD et la GPx, les variations interannuelles sont généralement plus élevées que les facteurs de variations mesurés en présence de molécules chimiques. Cette observation souligne la difficulté d'utiliser des valeurs génériques pour ces biomarqueurs lors d'études *in situ*. En effet, la faible amplitude de modulation des réponses par des composés chimiques nécessite d'utiliser des valeurs de référence obtenues dans des conditions les plus comparables possibles à celles de l'exposition. Cela permettra de limiter la variabilité induite par d'autres facteurs que la contamination et ainsi pouvoir limiter le risque de conclure à une absence d'effet significatif du milieu alors qu'un effet peut effectivement être mesuré avec une référence ponctuelle.

Pour conclure, les valeurs de référence calculées sur l'année 2016 présentent d'importantes différences interannuelles avec les données obtenues dans les multiples expérimentations réalisées au cours de cette thèse, et ce pour plusieurs biomarqueurs. Ces variations interannuelles sont parfois plus importantes que les facteurs d'inductions et d'inhibitions mesurés en présence d'un composé toxique. Ceci souligne la difficulté de définir des valeurs génériques, au moins pour les biomarqueurs étudiés dans cette partie, à savoir le stress oxydant, la biotransformation et la transmission synaptique. Aussi, et pour faciliter l'interprétation des données, l'ensemble des résultats obtenus dans le cadre de cette thèse sera comparé à une référence propre à chaque expérimentation.

Tableau 12 : Exemples de facteurs d'induction ou d'inhibition des biomarqueurs dans des foies de poissons adultes après exposition à certains xénobiotiques.

Tous les exemples considérés ont été montrés comme significatifs par les auteurs des différentes publications. GSH : Glutathion total ; GPx : Glutathion peroxydase ; CAT : Catalase ; SOD : Superoxyde dismutase ; EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase ; GST : Glutathion-S-Transférase ; AChE : Acétylcholinestérase ; TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique. ; + : induction ; - : inhibition.

	Espèce	Substance	Concentration	Jour	Effet	Facteur	Référence
CAT	<i>Channa punctatus</i>	Endosulfan	5ppb	1	+	2.747	Pandey et al. 2001
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	SDS	0.1 à 1 mg/L	12 à 18	+	1.408	Jifa et al. 2006
	<i>Ictalurus nebulosus</i>	Dichlorvos	1 à 5 ppm	1	+	1.510	Hai et al. 1997
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Trichlorfon	0.5mg/L	4	+	1.306	Thomaz et al. 2009
	<i>Labeo rohita</i>	Cr(IV)	48.3 ppm	1 à 4	+	16.792	Kumari et al. 2014
	<i>Channa punctatus</i>	Deltamethrin	0.75µg/L	2	-	-1.827	Sayeed et al. 2003
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Pb	0.1 à 1 mg/L	21	+	1.518	Firdin 2018
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Pb:Zn	0.1:0.5 à 1:5 mg/L	21	+	1.414	Firdin 2018
GST	<i>Channa punctatus</i>	Endosulfan	5ppb	1	-	1.654	Pandey et al. 2001
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Benzo[a]pyrene	2 à 20 µg/L	6	-	-1.745	Jifa et al. 2006
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Benzo[a]pyrene	2 à 20 µg/L	18	+	1.424	Jifa et al. 2006
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	SDS	0.1 mg/L	12	+	1.458	Jifa et al. 2006
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Trichlorfon	0.5mg/L	4	+	1.556	Thomaz et al. 2009
	<i>Channa punctatus</i>	Deltamethrin	0.75µg/L	2	+	1.650	Sayeed et al. 2003
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Pb	0.1 à 1 mg/L	7 à 21	+	1.372	Firdin 2018
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Pb:Zn	0.1:0.5 à 1:5 mg/L	7 à 21	+	1.182	Firdin 2018
	<i>Gasteroteus aculeatus</i>	Prochloraz	10 à 500 µg/L	21	+	1.579	Sanchez et al., 2008d
GSH total	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Benzo[a]pyrene	2 à 20 µg/L	18	+	1.506	Jifa et al. 2006
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Methylparathion	0.5 à 1ppm	2	-	-1.531	Isik and Celik 2008
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Diazinon	0.5ppm	2	-	-1.462	Isik and Celik 2008
SOD	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Benzo[a]pyrene	2 à 20µg/L	6 à 18	+	1.926	Jifa et al. 2006
	<i>Cyprinus carpio</i>	Dichlorvos	1 à 5 ppm	1	+	1.600	Hai et al. 1997
	<i>Ictalurus nebulosus</i>	Dichlorvos	1 à 5 ppm	1	+	1.298	Hai et al. 1997
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Trichlorfon	0.5mg/L	4	-	-1.376	Thomaz et al. 2009
	<i>Labeo rohita</i>	Cr(IV)	48.3 ppm	2 à 3	+	1.608	Kumari et al. 2014
GPx	<i>Channa punctatus</i>	Endosulfan	5ppb	1	+	1.769	Pandey et al. 2001
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	SDS	0.1 à 1 mg/L	6 à 18	+	1.621	Jifa et al. 2006
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	Benzo[a]pyrene	2 à 20 µg/L	6 à 18	+	1.543	Jifa et al. 2006
	<i>Channa punctatus</i>	Deltamethrin	0.75µg/L	2	-	1.933	Sayeed et al. 2003
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Pb	1 mg/L	7 à 21	-	-3.738	Firdin 2018
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Pb:Zn	0.1:0.5 mg/L	21	-	-1.780	Firdin 2018
	<i>Gasteroteus aculeatus</i>	Prochloraz	10 à 500 µg/L	21	-	-1.370	Sanchez et al. 2008d
AChE	<i>Oreochromis niloticus</i>	Etoxazole	0.81 à 1.35ppm	1 à 15	-	-2.963	Sevgiler et al. 2004
	<i>Lateolabrax japonicus</i>	SDS	0.1 à 1 mg/L	6 à 18	+	2.512	Jifa et al. 2006
	<i>Carassius auratus</i>	Acide 2,4-dichlorophénoxyacétique	10 à 100 mg/L	4	-	-1.564	Matviishyn et al. 2014
EROD	<i>Gasteroteus aculeatus</i>	Prochloraz	10 à 500 µg/L	21	+	10.801	Sanchez et al. 2008d
TBARS	<i>Channa punctatus</i>	Endosulfan	5ppb	1	-	1.702	Pandey et al. 2001
	<i>Channa punctatus</i>	Deltamethrin	0.75µg/L	2	-	1.413	Sayeed et al. 2003
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Pb	0.1 à 1 mg/L	7 à 21	+	1.864	Firdin 2018
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Pb:Zn	0.1:0.5 mg/L	21	+	1.414	Firdin 2018

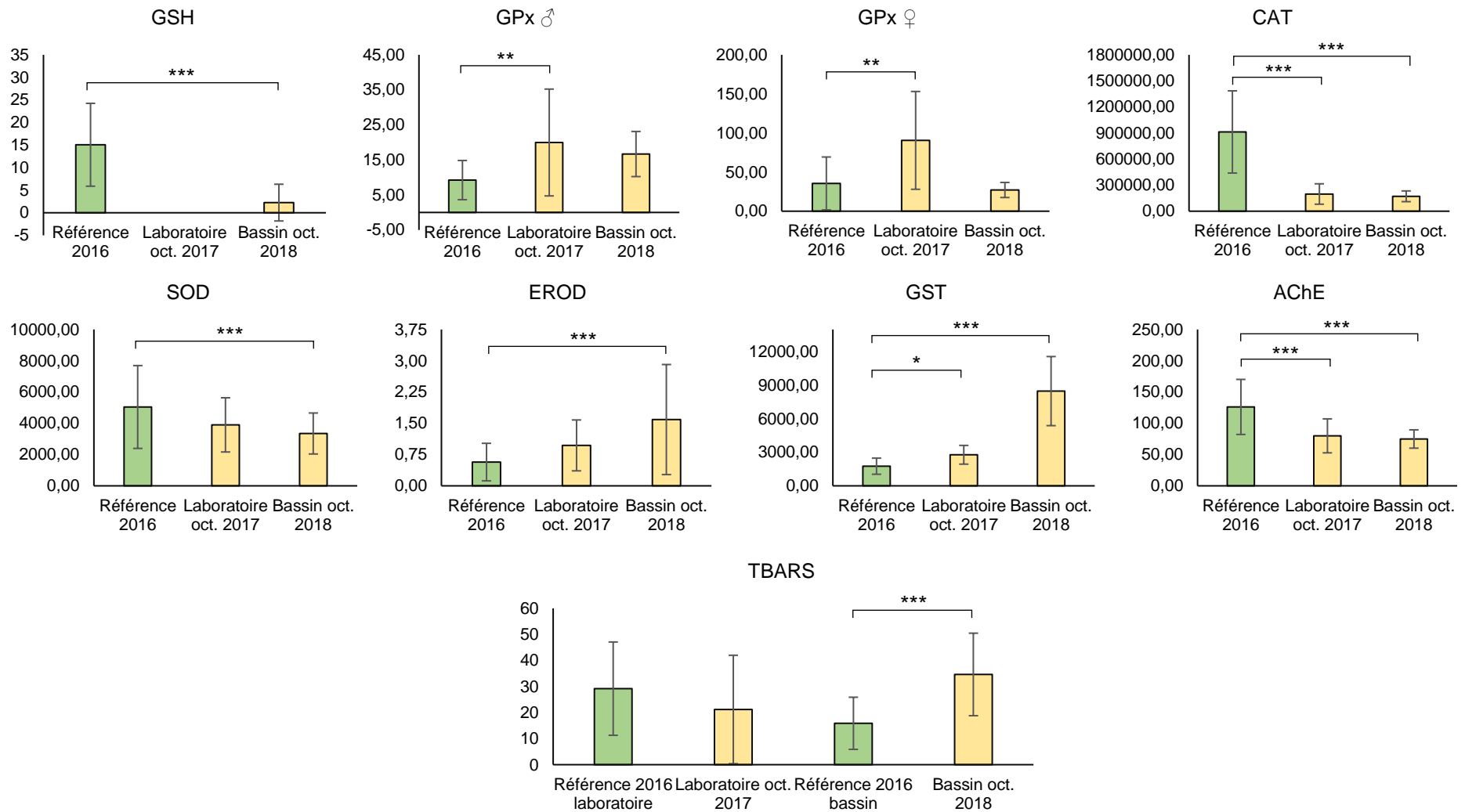


Figure 11 : Comparaison des valeurs de référence théoriques calculées sur les données de 2016 avec les valeurs de biomarqueurs mesurés en laboratoire en 2017 et dans les bassins en 2018 durant le mois d'octobre.

Les différences statistiques entre la référence et les autres groupes sont indiquées par des étoiles selon les résultats des tests post-hoc de Tuckey ou de Nemenyi ($\alpha = 5\%$) avec * : $0,05 > p.value > 0,01$; ** : $0,01 > p.value > 0,001$; *** : $p.value < 0,001$. GSH : Glutathion total ; GPx : Glutathion peroxydase ; CAT : Catalase ; SOD : Superoxyde dismutase ; EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase ; GST : Glutathion-S-Transférase ; AChE : Acétylcholinestérase ; TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique.

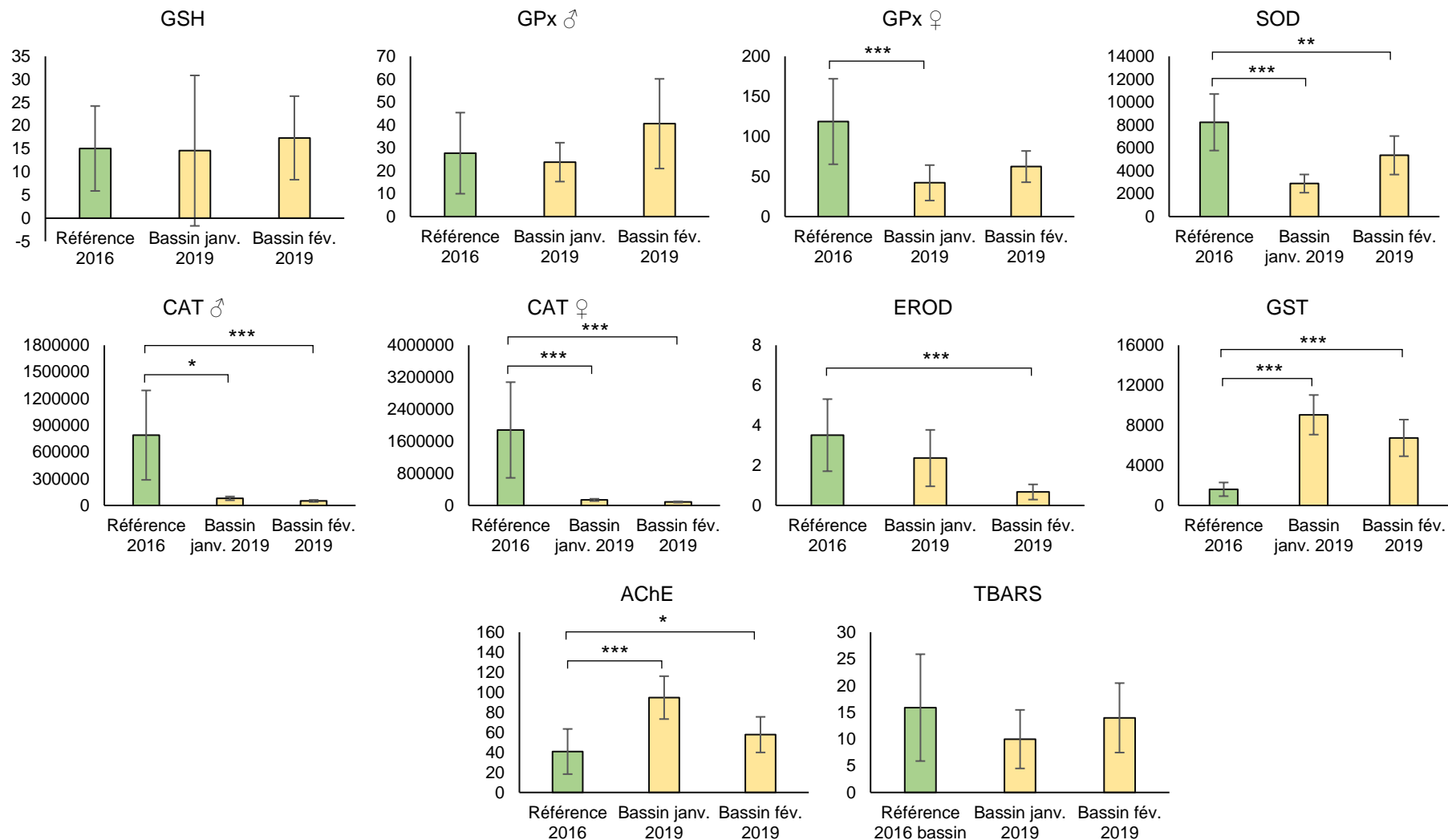


Figure 12 : Comparaison des valeurs de référence théoriques calculées sur les données de 2016 avec les valeurs de biomarqueurs mesurés dans les bassins durant l'hiver 2019.

Les différences statistiques entre la référence et les autres groupes sont indiquées par des étoiles selon les résultats des tests post-hoc de Tuckey ou de Nemenyi ($\alpha = 5\%$) avec * : $0,05 > p.value > 0,01$; ** : $0,01 > p.value > 0,001$; *** : $p.value < 0,001$. GSH : Glutathion total ; GPx : Glutathion peroxydase ; CAT : Catalase ; SOD : Superoxyde dismutase ; EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase ; GST : Glutathion-S-Transférase ; AChE : Acétylcholinestérase ; TBARS : Substances réactives à l'acide thiobarbiturique.

CHAPITRE 3 : APPLICATIONS *IN SITU*



1. UTILISATION DE L'APPROCHE MULTIBIOMARQUEURS POUR EVALUER L'EFFICACITE D'UNE ZONE HUMIDE TAMPON EN AVAL D'UNE STATION DE TRAITEMENT DES EAUX USEES

1.1. Contexte et objectifs

Les stations d'épuration des eaux usées (STEU) n'étant pas conçues pour éliminer l'ensemble des polluants présents dans les influents, leurs effluents représentent une source majeure de contaminants des milieux aquatiques. Pour limiter le rejet de ces substances, l'efficacité de plusieurs types de traitements tertiaires a été étudiée, notamment l'ozonation (Choubert et al. 2017) et la filtration sur charbon actif (Mailler et al. 2016). Indépendamment de leur efficacité, la plupart de ces traitements restent trop coûteux pour être généralisés à l'ensemble des installations. De plus en plus de communes, en particulier les communes rurales, optent pour la mise en place de zone humides tampons (ZHT) en aval des STEU. Ces zones humides artificielles permettent d'améliorer la qualité générale des effluents de STEU par des mécanismes d'autoépuration impliquant à la fois le sol, les plantes et les communautés microbiennes associées. L'efficacité d'épuration de ces zones humides a fait l'objet de nombreuses études, mais la plupart se focalisent surtout sur des analyses physicochimiques ou chimiques (Anderson et al. 2013; Síma et al. 2013; Hsieh et al. 2015; Toro-Vélez et al. 2016).

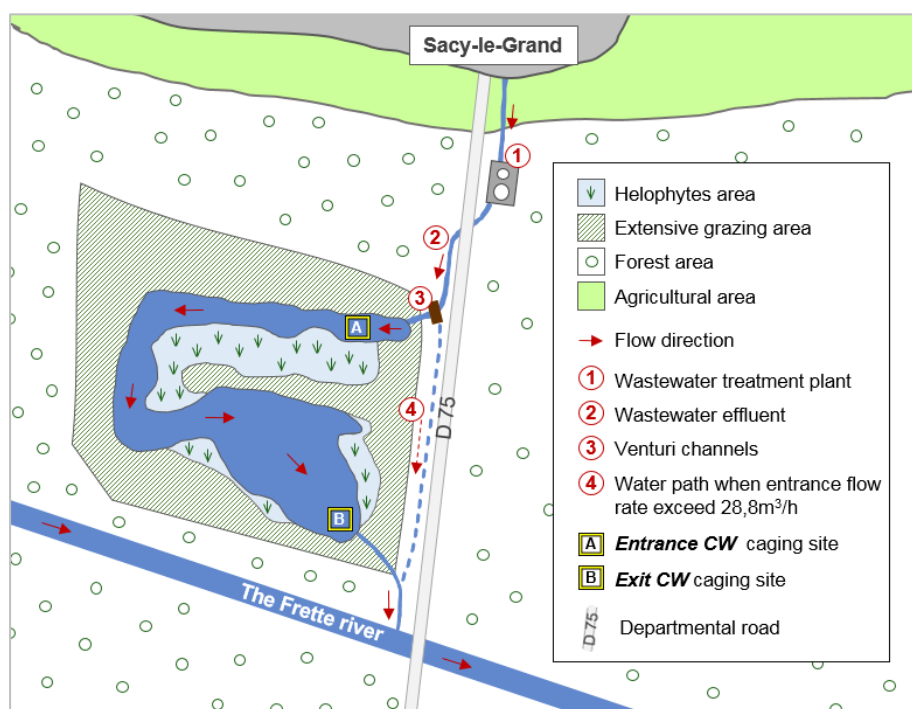
L'objectif de cette première étude *in situ* était donc d'évaluer l'efficacité d'une zone humide tampon à l'aide d'une batterie de biomarqueurs chez des épinoches à trois épines encagées. Ce travail a également été l'occasion de déployer pour la première fois ces outils dans le cadre d'une contamination aux effluents de STEU, et ainsi de valider leurs capacités de réponses face à ce type de rejet.

1.2. Matériel et méthodes

La ZHT étudiée dans le cadre de ce travail se situe sur la commune de Sacy-le-Grand (Oise, France) et plus précisément au cœur des marais de Sacy, vaste zone humide et tourbeuse de 1000ha qui comprend une zone Natura 2000 et Ramsar de 245ha. Elle a été construite en aval d'une STEU rurale d'une capacité d'épuration de 10000 équivalents habitants, afin de limiter l'impact du rejet sur cette zone protégée et fragile. L'effluent issu de la station de traitement présente une contamination urbaine (liée aux activités domestiques des villages raccordés à la station) mais également une probable contamination agricole (issue du ruissellement de la plaine agricole qui entoure la zone d'étude). La route à proximité de la ZHT

peut également être considérée comme une source de contamination supplémentaire, notamment par des hydrocarbures (figure 13).

Les épinoches utilisées dans cette étude (42.1 ± 2.8 mm) étaient issues de la même génération de la population d'épinoches élevée et maintenue à l'INERIS depuis de nombreuses années. Les individus ont été maintenus pendant plusieurs mois dans des bassins extérieurs en conditions écosystémiques avant l'expérimentation. Trente épinoches (réparties dans 2 cages) ont été encagées en entrée de la ZHT et trente épinoches ont été encagées en sortie de la ZHT. Parallèlement, des individus ont été encagés dans le canal de Ladrancourt, sur un site considéré comme référence. L'expérience s'est déroulée en hiver (janvier-février) en dehors de la période de reproduction, comme préconisé à l'issue de la première expérimentation de la thèse. Les encagements ont duré 21 jours durant lesquels les poissons n'ont eu accès qu'aux aliments entrant naturellement dans les cages. Le pH, la concentration en oxygène et la conductivité ont été mesurés 5 fois durant toute la durée de l'expérience. La température a, quant à elle, été mesurée en continu.



Les réponses des biomarqueurs ont dans un premier temps été traitées par des analyses multivariées descriptives (Analyses en Composantes principales) afin d'explorer globalement le jeu de données obtenues. Ces analyses multivariées ont été complétées par des tests statistiques pour chaque biomarqueur (ANOVA ou tests de Kruskal-Wallis suivis des tests post-hoc correspondants). Enfin, un indice biomarqueur (IBR) (Sanchez et al. 2013) a été calculé afin d'intégrer l'ensemble des réponses des biomarqueurs.

1.3. Synthèse des principaux résultats

Les résultats ont permis de mettre en évidence les points suivants :

- Des effets de l'effluent de STEP ont été observés sur de nombreux biomarqueurs.
- En particulier, les fonctions immunitaires ont été altérées en entrée de la ZHT chez les épinoches engagées. Ces altérations ont été caractérisées par une augmentation de la mortalité leucocytaire (apoptose et nécrose), une modification de la distribution leucocytaire, une augmentation de la présence en lysosomes et une diminution de l'activité de phagocytose (capacité et efficacité) par rapport aux épinoches engagées sur le site de référence.
- La zone humide tampon a induit une amélioration notable sur les biomarqueurs de l'immunité innée, avec un retour au niveau des valeurs de référence pour tous les paramètres chez les épinoches engagées à la sortie.
- De plus, une forte augmentation de l'activité EROD a été mesurée chez les épinoches en entrée de la ZHT (x 10,5 chez les mâles et x 7,1 chez les femelles) par rapport aux individus engagés sur le site de référence. Cette induction d'EROD a été également mesurée chez les épinoches engagées en sortie de la ZHT, mais de façon moins prononcée (x 7,8 chez les mâles et x 5,1 chez les femelles).
- La synthèse des résultats à l'aide d'un Indice Biomarqueur (IBR) est pertinente pour mettre en évidence la différence entre les sites étudiés. En effet, les IBR calculés pour chacun des groupes ont mis en évidence un indice égal à 25,2 en entrée de ZHT et 17,4 en sortie de ZHT. Ce résultat illustre l'efficacité de la zone humide tampon dans l'amélioration de la qualité de l'eau qui a permis de réduire l'IBR de 31 %.
- Un questionnement quant à la validité du site de référence en tant que site totalement exempt de toute contamination est apparu. En effet, les valeurs élevées de l'activité des enzymes antioxydantes ainsi qu'une faible activité AChE suggèrent la présence de contaminants dans le canal de Ladrancourt.

Cette première application *in situ* a donc montré que l'engagement d'épinoches était un dispositif non seulement utilisable (aucune mortalité observée) mais également pertinent pour mettre en évidence et objectiver les effets des effluents de STEP sur les poissons. De plus, l'approche utilisée a permis de mettre en évidence l'amélioration de la qualité de l'eau par la zone humide tampon. L'étude a également mis en évidence l'importance des paramètres liés à l'immunité innée dans ce contexte de contamination. L'utilisation d'un IBR comme outil de

synthèse permet d'intégrer l'ensemble des données et de réaliser une lecture rapide des résultats.

L'ensemble des résultats de cette étude est présenté dans l'article 2 « An active biomonitoring approach using three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to assess the efficiency of a constructed wetland as tertiary treatment of wastewater ».

ARTICLE 2: AN ACTIVE BIOMONITORING APPROACH USING THREE-SPINED STICKLEBACK (*GASTEROSTEUS ACULEATUS*, L.) TO ASSESS THE EFFICIENCY OF A CONSTRUCTED WETLAND AS TERTIARY TREATMENT OF WASTEWATER.

(Ecological Indicators, submitted in July 2019)

Authors

Audrey Catteau^{1*}, Anne Bado-Nilles¹, Rémy Beaudouin¹, Olivier Palluel¹, Cyril Turiès¹, Christophe Gallet³, Alain Geffard², Jean-Marc Porcher^{1*}

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

²Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), UMR-I 02 SEBIO, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims, France.

³Syndicat Mixte Oise-Aronde, 60280 Clairoix, France.

*Corresponding authors:

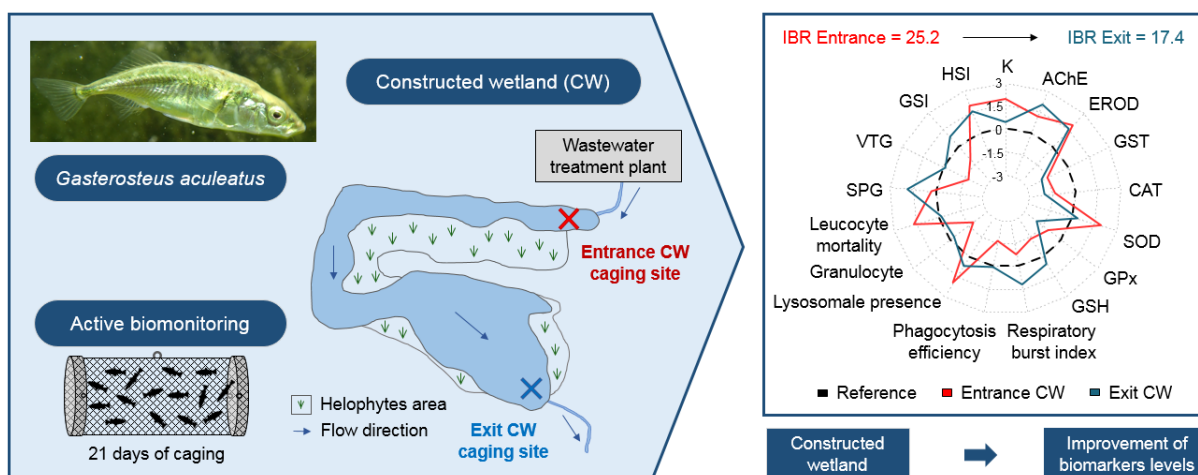
audrey.catteau@ineris.fr, phone: +33 3 44 61 81 78;

jean-marc.porcher@ineris.fr, phone: +33 3 44 55 65 84

Abstract

The present work aimed to assess the efficiency of a constructed wetland as tertiary treatment on urban wastewater with a multibiomarker approach using caged three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.). Fish were caged on three sites: at the entrance of the Constructed Wetland (CW), directly inside the wastewater effluent, at the exit of the CW, and in a weakly impacted site considered as a reference. After 21 days of caging, sticklebacks state of health was assessed using several biomarkers representing some biological functions such as innate immune and antioxidant systems, biotransformation enzymes, reproduction parameters and synaptic transmission. A strong inhibition of the innate immune system, an induction of EROD activity and an alteration of the hepatosomatic index were observed in fish caged at the entrance of the CW compared to those caged in the reference site. In addition, wastewater effluent induced a decrease of antioxidant system without induced oxidative damage on cell membranes. No improvement of these biomarkers was observed for antioxidant parameters at the exit of the CW. However, in fish caged at the exit of the CW, the EROD induction observed at the entrance was reduced and the innate immune system presented the same level compared to fish caged in the reference site, underlying the beneficial effect of the CW for these parameters. Integrated Biomarker response (IBR) was equal to 25.2 at the entrance of the CW and 17.4 at the exit of the CW which highlighted the global positive effect of the CW on water quality based on fish biomarker measurement.

Graphical abstract



Keywords

Biomonitoring, Integrated Biomarker Response, fish, wastewater, wetland

Highlights

- An IBR index was used for assessing the efficiency of a constructed wetland

- Stickleback's biomarker responses were altered downstream the wastewater effluent
- After the constructed wetland, biomarkers were equal to the reference level
- The efficiency of the constructed wetland was highlighted
- The IBR is a relevant tool for the water quality assessment

1. Introduction

Human activities generate large volumes of wastewater that must be treated before being released into the environment in order to limit the potential negative effects on ecosystems and human health. However, for several decades, the presence of micropollutants in aquatic environments has become a widespread problem of increasing concern. These micropollutants, also known as "emerging contaminants", include many different molecules such as pharmaceuticals, personal care products, natural and synthetic hormones, pesticides, and industrial chemicals such as polychlorinated biphenyl (PCB) or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (Luo et al., 2014). Wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to treat all these contaminants and WWTPs effluents concentrate these molecules which are released into the natural environment where they can be found in concentrations ranging from ng/L to µg/L (Blum et al., 2018). This complex mixture of xenobiotics may have deleterious effects on living organisms downstream of effluents discharge area. Indeed, many studies highlight estrogenic effects, induction of oxidative stress, modification of immune system parameters and histological damage in caged fish downstream of WWTPs (Cazenave et al., 2014; Jasinska et al., 2015; McGovarin et al., 2018; Pérez et al., 2018).

To improve wastewater treatment of WWTPs, new technologies have emerged such as membrane bioreactors, activated carbon absorption, ultra- or nano- filtration, reverse osmosis, ozonation or other advanced oxidation processes (Gorito et al., 2017). However, even if these technologies are effective, they are often expensive. Another alternative may be to set constructed wetland (CW) downstream of WWTPs. CW allows self-purification of water through natural process involving wetland vegetation, soil, and their associated microbial assemblage to treat effluent or other water source (US EPA 2000). This solution has the advantage of being financially more accessible, both in terms of implementation and maintenance (Ayaz and Akca, 2000).

Several authors have studied the efficiency of some different types of CW to improve physicochemical parameters. Their results have shown that efficiency depends on the installation type and the season. However, in all cases, CWs are efficient to decrease suspended solids, nitrogen concentration, chemical and biological oxygen demand and water contamination by some pathogens such as coliforms (removal higher than 90 %) (Ahmed et al., 2008). Other studies have also highlighted the effectiveness of CWs in reducing pesticides (Anderson et al., 2013), human and veterinary drugs (Anderson et al., 2013; Hsieh et al., 2015), industrial chemicals (Síma et al., 2013; Toro-Vélez et al., 2016) as well as antibiotics and antibiotic-resistant bacteria (Chen et al., 2015). Some authors have also focused on the effects of endocrine disruption in fish and reported a decrease in estrogenic effects downstream of

the CW in male fathead minnow (*Pimephales promelas*) (Hemming et al., 2001; Bringolf and Summerfelt, 2003).

All studies conducted to assess CWs efficiency used chemical or physicochemical parameters. However, chemical analyses do not consider the bioavailability of compounds and the real exposure and risk for living organisms. Moreover, physicochemical analyses do not allow the assessment of health status of living organisms in these ecosystems. Over the past decades, some tools have been proposed to link chemical contamination to biological responses of exposed individuals. Among them, biomarkers are defined as observable and measurable changes on organisms (ranging from molecular to individual level and from biochemical to behavioral responses) following a pollution exposure or an environmental modification (Van der Oost et al., 2003). The biomarker approach is particularly useful to assess environmental impact of local pollution point source (Sanchez et al., 2012) and, by extension, to assess the effectiveness of process that improves the water quality.

The present work aims to assess for the first time the effects of a constructed wetland built downstream of a wastewater treatment plant using a multi-biomarker approach in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) with an active biomonitoring strategy. Caged fish are increasingly used in environmental risk assessment, especially in case of WWTP's effluent contamination (Cazenave et al., 2014; McGovarin et al., 2018; Pérez et al., 2018). Caging is particularly useful when the sentinel species is absent in a study site. Even if the species is present, this approach prevents the risk associated with the capture of endangered species. Moreover, the stress caused by predation is reduced and the sampling is facilitated compared to passive sampling (Oikari, 2006). Several biotic (number of individuals, size, sex, age, etc.) and abiotic parameters (distance with the pollution source, exposure duration, etc.) can be standardized through caging approach (Oikari, 2006). The use of well calibrated individuals allows a thorough biomarker comparison between sites according to the chemical contamination. In this study, the three-spined stickleback was chosen as sentinel species because of its large geographical repartition in northern Europe and its resistance to pollution and environmental changes (temperature, salinity), which allows caging in many hydrosystems. Moreover, sticklebacks have a small size (from four to eight centimeters) (Wootton, 1984) and are easy to handle which facilitates caging (Le Guernic et al., 2016). Biomarkers measured in this study are representative of some important physiological functions frequently assessed in organism downstream WWTP such as innate immune responses, antioxidant system, biotransformation enzymes, reproduction parameters and synaptic transmission (Cazenave et al., 2014; Jasinska et al., 2015; McGovarin et al., 2018; Pérez et al., 2018). The assessment of a great number of physiological functions allow to integrate the effect of a complex mixture of contaminants as in a WWTP's effluent. Finally,

biomarkers were integrated in an Integrated Biomarker Response index developed by Sanchez et al. (2013) that will be used to synthesize the global biomarker response of fish.

2. Material and methods

2.1. Description of the study area

The city of Sacy-le-Grand is located inside a huge wet and peaty area of 1000 hectares which includes a 245 hectares Natura 2000 and Ramsar area (i.e. Les Marais de Sacy). The WWTPs of Sacy-le Grand is a small plant that collects and treats wastewater from this town and surrounding villages and is designed for 10,000 population equivalents. In addition to the primary treatment, this WWTP is equipped with a phosphate and nitrate removal treatment. The CW is located downstream the WWTP and is used as tertiary treatment: the effluent that enters the CW presents a multi-contamination related to municipal water (effluent from WWTP), and potential runoff from the agricultural plain (pesticides) and from the road nearby (hydrocarbons). This CW was built to improve the water quality before releasing it into the protected area (49°20'40.5"N, 2°32'49.1"E).

Inside the CW, the vegetation has grown naturally, and a large part of the shallow waters has been colonized by native vegetation. Thus, 94 different species of plants have been identified around and inside the wetland. Among them, the helophytes play the major role in the cleanup process and particularly the broadleaf cattail (*Typha latifolia*) and rush (*Juncus effusus* and *Juncus inflexus*) that have been frequently inventoried in this area. The environment is maintained open by extensive grazing of water buffalo (*Bubalus bubalis*) during Spring and Summer. The studied wetland is an artificial lake of 8500m² with a maximum depth of 1.90 m and a maximum capacity of 3900 m³. Water enters the wetland through a Venturi channel with a variation of flow rate from 10.8 m³/h to 28.8 m³/h which corresponds to a residence time of 5 to 15 days. Beyond 28.8 m³/h, the excess water runs into the ditch without going through the wetland (Fig. 1).

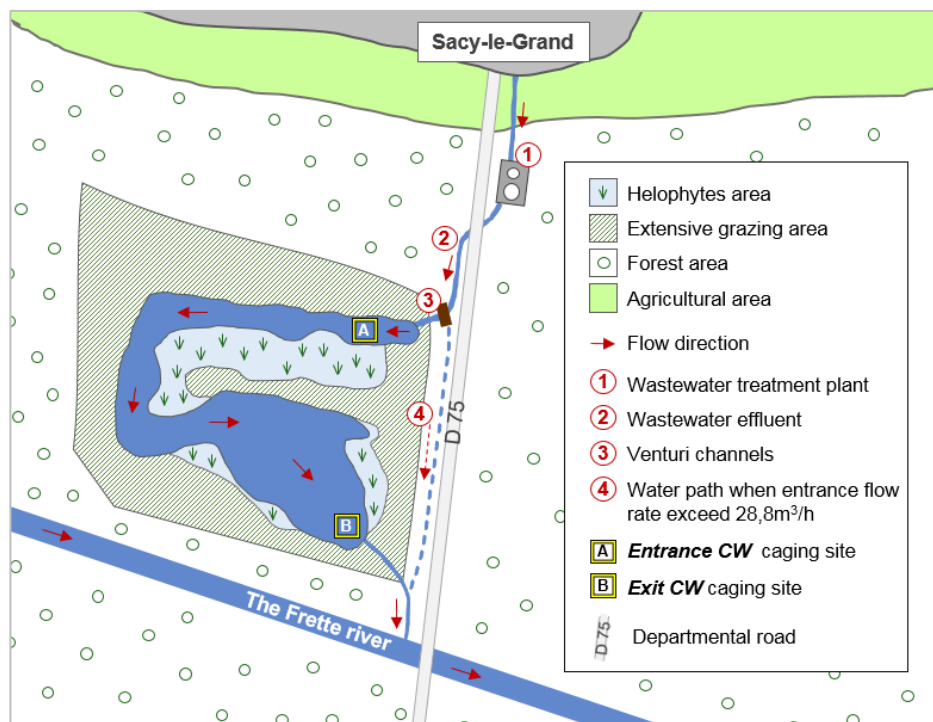


Fig. 1: Drawing of the constructed wetland of Sacy-le-Grand and surroundings

2.2. Experimental design

The cylindrical cages used are 630 mm high and 270 mm diameter (volume = 36 L). Adult three-spined sticklebacks (42.1 ± 2.8 mm) came from the breeding facilities of the French National Institute for Industrial Environment and Risks (INERIS). They were maintained in outdoor ponds free from chemical contamination under ecosystem conditions during several months before the start of the experiment. Thirty sticklebacks were caged at the entrance (*Entrance CW* site), directly at the WWTP effluent inlet, and at the exit of the CW (*Exit CW* site) (Fig. 1). At the same time, 15 sticklebacks were caged in a weakly impacted site considered as reference: the Ladrancourt channel (*Ladrancourt* site). All cages were placed at 50 cm depth. This experiment was carried out in winter, outside of the stickleback breeding period, and the exposure lasted 21 days during which the fish received no external food intake. pH, oxygen and conductivity were recorded at all sites five times during the present study. Temperature was monitored continuously throughout the exposure.

2.3. Organ and blood sampling

After the 21-days exposure, sticklebacks were anaesthetised by balneation in MS222 (Tricaine methanesulfonate, 100 mg/L, Sigma-Aldrich, USA) and then were sacrificed by cervical dislocation. This experiment was conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE on the protection of animals used for scientific purposes at INERIS facilities

(registration number D60-769-02). Standard length, total weight, liver and gonad weights were recorded to calculate physiological indices. Sex was determined at the same time. The general well-being of fish was evaluated with Fulton's condition index (K) (Fulton, 1902).

$$K = \frac{\text{Total body weight}}{\text{Standard length}^3} * 100$$

Blood samples (5 µL) were then collected and placed in 45 µL of phosphate buffered saline solution (Fisher Scientific, Belgium) supplemented with 30% heparin and 20% glycerol. These samples were stored at -80 °C before vitellogenin analysis.

Spleen was recovered and gently smashed through sterilized nylon mesh (40 µm, Sigma-Aldrich, USA) with Leibovitz 15 medium (L15, Sigma-Aldrich, USA) modified with heparin lithium (100 mg/L, Sigma-Aldrich, USA), penicillin (500 mg/L, Sigma-Aldrich, USA) and streptomycin (500 mg/L, Sigma-Aldrich, USA) (Bado-Nilles et al., 2014a). The leucocytes suspension was stored at 4° C for 18 hours before analysis to prevent bias due to grinding stress.

Kidney were recovered and placed in 200 µL of denaturation buffer (Tris-HCl 100 mM, EDTA 10 mM, urea 8 M, SDS 2%, β-mercapto-ethanol 200 mM). The samples were then frozen in liquid nitrogen and stored in freezer at 80 °C until further analysis.

The liver was recovered; weighted and placed in 400 µL of potassium phosphate buffer (0.1 M; pH 7.4, Sigma-Aldrich, USA) modified with glycerol (20%, Sigma-Aldrich, USA) and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF, 2 µM, Sigma-Aldrich, USA) as protease inhibitor. A piece of tail muscle (20 ± 5 mg) was recovered too and placed in 800 µL of the same buffer. The samples were then frozen in liquid nitrogen and stored in freezer at 80 °C until further analysis.

Gonads and livers were weighted to calculate the gonado-somatic index (GSI) and the hepatosomatic index (HSI) respectively (Slooff et al., 1983).

$$GSI = \frac{\text{Gonad weight}}{\text{Total body weight}} * 100$$

$$HSI = \frac{\text{Liver weight}}{\text{Total body weight}} * 100$$

2.4. Biomarkers analysis

Innate immune capacities

The leucocytes suspension was used for innate immune biomarkers analysis. To have comparable results, sample leucocyte concentration was then adjusted to 10^6 cell/mL in L15 medium with Malassez haemocytometer (Marienfeld, Germany) to perform analysis by flow cytometry. Analyses were carried out on whole leucocytes, using a CyAn™ ADP (Beckman coulter, USA) flow cytometer using 96 well microplates containing 200 μ L of leucocytes suspension. A total of 10,000 events per sample were analysed after cell excitation by 488 nm argon laser.

The cellular mortality percentages (necrosis and apoptosis) leucocyte distribution (lymphocyte and granulocyte-macrophage), lysosomale presence (LMP), phagocytic capacity and efficiency and leucocyte respiratory burst were assessed following protocols described by Bado-Nilles et al. (2013, 2014b) and Gagnaire et al. (2015). All immune biomarkers were expressed in percentage except LMP which was expressed in unit of fluorescence and respiratory burst index which was expressed without unit.

Synaptic transmission, antioxidant and metabolic detoxication enzymes activities

Muscle and liver samples were grinded with glass beads (diameter of 1 mm) using a Precellys24® homogenizer (Bertin Instruments, France) and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4 °C. The supernatant of each sample (post-mitochondrial fraction, S9) was placed in 1 mL microtubes. All assays described below were adapted on three-spined stickleback by Sanchez et al. (2005, 2007, 2008a).

Protein concentration was assessed in both liver and muscle S9 fraction using the Bradford method (Bradford, 1976).

Synaptic transmission was assessed with measurement of acetylcholinesterase activity (AChE) on S9 muscle fractions following the method of Ellman et al. (Ellman et al., 1961). Results are expressed in U/g of total protein.

Total glutathione (GSH) (Vandeputte et al., 1994), glutathione peroxidase activity (GPx) (Paglia and Valentine, 1967), superoxide dismutase activity (SOD) (Paoletti et al., 1986), catalase activity (CAT) (Babo and Vasseur, 1992) and lipid peroxidation with thiobarbituric acid reactive substance method (TBARS) (Ohkawa et al., 1979) were analysed on S9 liver fractions using a liquid handling automaton (Freedom EVO®, Tecan, Switzerland) and a microplate reader (Synergy™ H4 Hybrid, BioTek, USA). GPx, SOD and CAT were expressed in U/g of

total protein, while TBARS and GSH amounts were measured in nmol and $\mu\text{mol/g}$ of total protein, respectively.

The activity of two enzymes involved in metabolic detoxication were analysed on S9 liver fractions: ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione-S-transferase (GST) following Flammarion et al. (2002) and Habis et al., (1974) methods respectively. Results of EROD and GST are expressed in pmol/min/mg of total protein and U/g of total protein.

Endocrine disruption biomarkers

Vitellogenin (VTG) was measured in male blood samples according to the method described by Sanchez et al. (2007). VTG concentration was expressed as ng/mL of fish blood.

Spiggin (SPG) was measured in kidney after a dissolution process (grind in boiling water) by specific competitive ELISA as described by Katsiadaki et al. (2002) and Sanchez et al. (2008b). Results for spiggin were expressed as U/g of total fish weight.

2.5. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R software version 3.3.2 (Foundation for *Statistical Computing*, Vienna, Austria).

One-way ANOVA was performed to analyse physicochemical data ($\alpha = 5\%$). Normality of residuals (Shapiro-Wilk's tests, $\alpha = 5\%$) and homoscedasticity (Bartlett's test, $\alpha = 5\%$) between groups were tested in order to validate the use of an ANOVA. If normality and homoscedasticity were not respected, analysis was retried with a log-transformation of data. If conditions were still not respected, ANOVA was replaced by Kruskal-Wallis tests ($\alpha = 5\%$). Analyses were followed by post-hoc tests (Tukey after ANOVA or Nemenyi after Kruskal-Wallis).

Biomarker results were first analysed through a Principal Component Analysis (PCA). Some biomarkers were suppressed by grouping or deleting to avoid the redundancy of given information. In this way, leucocyte necrosis and apoptosis rates were summed as a single parameter called "leucocyte mortality". For oxidative burst parameters, only oxidative burst index was kept for PCA whereas ROS B and ROS A were not taken into consideration for PCA construction. In the same way, only Fulton's condition index (K) was considered whereas fish standard length and weight were not taken into consideration. Finally, phagocytic capacity was not considered, and only phagocytic efficiency was kept. TBARS content, which was below the detection limit for all sites, was not take into consideration for PCA.

Then, two-way ANOVAs on the raw data (or log-transformed data) were applied for each biomarker to determine the impacts of "Sex" and "Exposure area" factors. Residue normality and homoscedasticity between each group were systematically verified using Shapiro-Wilk

and Bartlett's tests ($\alpha = 0.05$). In case of non-compliance with normality, ANOVAs were replaced by Kruskal-Wallis tests ($\alpha = 0.05$). In this case, interaction of both factors was not considered. ANOVAs and Kruskal-Wallis tests were followed respectively by post-hoc tests of Tukey or Nemenyi ($\alpha = 0.05$). When significant difference was detected between gender, data for male and female stickleback were analysed separately for the concerned biomarker. Globally, 25 biomarkers were tested and, with a first order risk equal to 5%, from 0 to 4 false positive results are expected (IC 95%, binomial distribution).

An integrated biomarker index (IBR) was calculated according to the method described by Sanchez et al. (2013) using the data set. The IBR value indicates the global difference of a studied sites compared to a reference value. Biomarker measurement in fish caged in Ladrancourt channel have been used as reference values for the present study. As for the PCA analysis, the redundant information were suppressed by deleting or grouping the considered biomarkers and TBARS was not considered. Briefly, sites averages were calculated for each biomarker (X_i). Then, averages of the three sites were divided by the reference values (X_0) and a log transformation was applied ($Y_i = \log (X_i/X_0)$). A deviation index was calculated by dividing the site values by the general standard deviation (s) of the log transformed ratio ($A = Y_i/s$). This allowed to create the basal line centred on 0 and represented biomarker variation from the reference values (Ladrancourt). Finally, the absolute values of these index were summed to obtain the overall IBR of each site ($IBRv2 = \sum |A|$). At each exposure sites, the calculated A values were reported in a star plot representing the deviation of each biomarker from the reference level. A value above 0 reflects a biomarker induction while a value below 0 indicates a biomarker inhibition.

3. Results

3.1. Water physical and chemical parameters

Results of physicochemical parameters are presented in Table 1. Significant differences were highlighted for water temperature between the three sites with warmer water at Ladrancourt and cooler water at the exit of the wetland. Conductivity and oxygen rate at the entrance of the wetland were respectively higher and lower compare to Ladrancourt but these differences disappeared at the exit of the wetland.

Table 1: Physical and chemical parameters of studied sites. Results are expressed with arithmetical mean \pm standard deviation. Statistical differences between sites are expressed with letters according to Tukey or Nemenyi Tests

	Ladrancourt	Entrance CW	Exit CW
	mean \pm sd	mean \pm sd	mean \pm sd
Temperature (°C)	8.9 \pm 0.8 c	7.6 \pm 1.2 b	5.2 \pm 1.7 a
pH	7.5 \pm 0.1	7.3 \pm 0.3	7.6 \pm 0.1
Conductivity (μ S/cm)	534.6 \pm 160.4 a	913.4 \pm 56.8 b	697 \pm 81.1 ab
Oxygen rate (%)	95.6 \pm 5.4 b	56.4 \pm 3.9 a	74.8 \pm 22.3 ab

3.2. Stickleback biomarkers

No mortality was observed during the whole experiment. Sticklebacks showed no external sign of stress nor injury.

The first two principal components of PCA (PC1 and PC2) explained 32.4% of the overall variance (Fig. 2). Groups of fish from the different sites are well separated along axis 1 and 2. “Ladrancourt” and “Exit of CW” are separated along PC2 (14% of overall variance) which was mainly formed by GPx and CAT activities (Table 2). “Ladrancourt” and “Exit of CW” are principally separated from “Entrance of CW” along PC1 (18.4% of overall variance) which was mainly built by some innate immune biomarkers and EROD activity (Table 2). Fish caged at the entrance of the CW seems to present a decrease of innate immune system (elevated leucocytes mortality, lower phagocytic activity and granulocyte percentage) as well as an increase in EROD activity.

More generally, “Exit of CW” and “Ladrancourt” groups are closer than “Entrance of CW” group. Biomarker levels from caged fish at the exit of the wetland appeared to be closer to biomarker levels in fish caged in Ladrancourt.

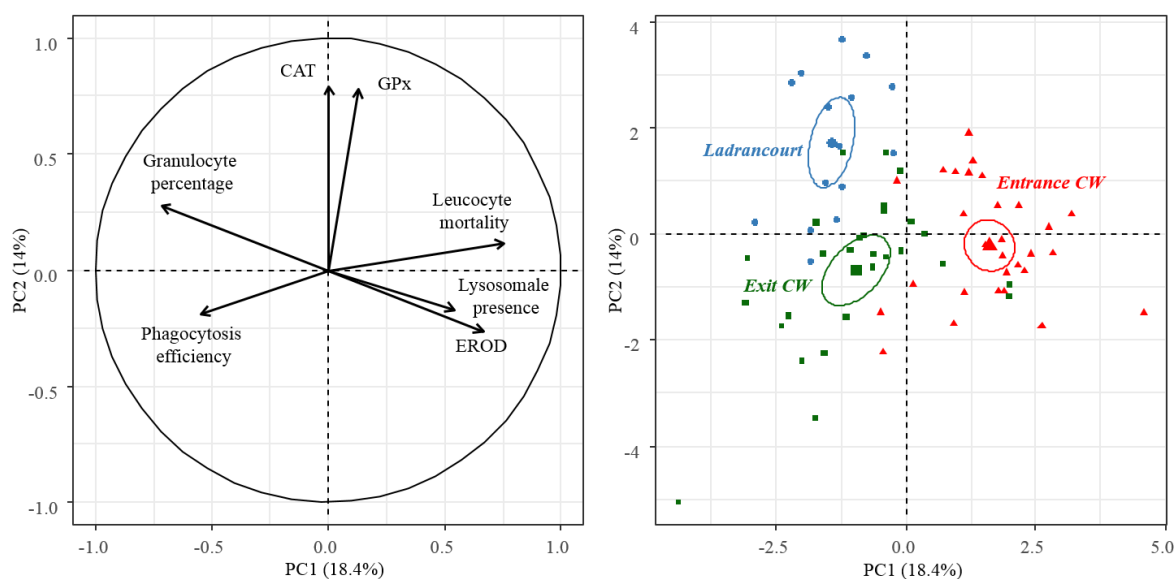


Fig. 2: Results of PCA analysis.

Variable graphical is presented to the left. Only variable which contributes for more than 10% to the building of axis are indicated. Individual graphical is presented to the right. GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase

Table 2: Contribution of each biomarker to the construction of the two main components (%).

CAT: catalase; GPx: glutathione peroxidase; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; AChE: Acetylcholinesterase; SOD: superoxide dismutase; GSH: total glutathione.

	PC1	PC2	Sum of total contribution (%)
CAT activity	0.00	26.46	26.46
GPx activity	0.54	25.55	26.09
Granulocyte percentage	16.50	3.23	19.73
Leucocyte mortality	18.17	0.59	18.76
EROD activity	14.02	2.89	16.91
Phagocytosis efficiency	9.65	1.47	11.12
Lysosomale presence	9.33	1.18	10.51
Respiratory burst index	3.57	6.05	9.62
Fulton's condition Index	4.77	3.88	8.65
GST activity	1.26	7.07	8.33
AChE activity	0.23	7.77	8.00
SOD activity	4.30	3.43	7.73
Hepatosomatic index	6.78	0.94	7.72
Spiggin	3.00	3.49	6.49
Gonadosomatic index	0.13	4.97	5.10
GSH content	3.96	1.02	4.98
Vitellogenin	3.78	0.02	3.79

3.3. Statistical analysis of biomarkers responses

Levels of biomarkers and statistical results are expressed in Table 3. Some biomarkers increased in fish caged at the entrance of wetland such as male HSI, leucocyte apoptosis and necrosis, and lysosomale presence, whereas some other decreased such as phagocytic activity (capacity and efficiency), granulocyte rate and GSH content. These changes at the entrance of the wetland were no longer detectable at the exit of the wetland where these biomarkers presented the same levels as in fish caged in Ladrancourt site. Female GPx activity and catalase activity for both sexes presented a significant decrease in fish caged at the entrance and at the exit of the CW. EROD was significantly increased in fish caged at the entrance and at the exit of CW. AChE activity was higher in fish caged at the exit of wetland than in the other sites. Finally, spiggin in female fish was higher at the exit of the CW than in the two other sites. TBARS content was under the detection limit for all sites and was thus not shown.

Table 3: Biomarker responses in three-spined stickleback caged in the three sites.

Values are means \pm standard deviation. Statistical difference between groups are expressed with letters according to Tukey Test or Nemenyi Test. GSH: total glutathione; GPx: glutathione peroxidase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; AChE: Acetylcholinesterase; MFI: Mean fluorescence intensity; FU: Fluorescence unit.

Biomarkers		Ladrancourt		Entrance CW		Exit CW	
		mean	\pm Sd	mean	\pm Sd	mean	\pm Sd
General condition (organism)	Length (mm)	42.5	\pm 3.0	42.0	\pm 2.7	42.1	\pm 2.8
	Weight (mg)	1053.3	\pm 226.3	1098.3	\pm 234.5	1035.0	\pm 194.9
	Fulton's condition Index ♂	1.44	\pm 0.10	1.53	\pm 0.16	1.4	\pm 0.08
	Fulton's condition Index ♀	1.31	\pm 0.13	1.42	\pm 0.13	1.36	\pm 0.12
	Hepatosomatic index ♂	2.2	\pm 0.6	5.1	\pm 1.3	3.1	\pm 0.8
	Hepatosomatic index ♀	3.0	\pm 0.8	5.9	\pm 2.2	5.6	\pm 1.6
Innate immune system (spleen)	Leucocyte apoptosis (%)	6.2	\pm 2.3	10.5	\pm 4.2	6.4	\pm 3.4
	Leucocyte necrosis (%)	2.6	\pm 1.0	3.2	\pm 1.3	2.0	\pm 0.7
	Granulocyte percentage among leucocytes (%)	41.2	\pm 6.3	19.5	\pm 9.3	35.9	\pm 8.9
	Lysosomal presence (MFI)	3.2	\pm 0.7	3.8	\pm 0.6	3.4	\pm 0.5
	Phagocytic capacity (%)	58.9	\pm 4.9	51.9	\pm 4.9	59.1	\pm 6.5
	Phagocytic efficiency (%)	23.8	\pm 5.0	17.9	\pm 4.4	23.6	\pm 7.0
	Basal oxidative activity (FU)	672.5	\pm 428.1	575.3	\pm 285.4	635.2	\pm 313.4
	Active oxidative activity (FU)	795.2	\pm 460.6	708.5	\pm 331.6	755.4	\pm 337.9
	Respiratory burst index	1.3	\pm 0.3	1.3	\pm 0.2	1.3	\pm 0.8
Antioxydant system (liver)	GSH content (μ mol/g of total protein)	7.3	\pm 2.7	4.7	\pm 4.6	8.6	\pm 5.3
	GPx activity ♂ (U/g of total protein)	43.6	\pm 4.0	50.1	\pm 20.8	36.5	\pm 17.5
	GPx activity ♀ (U/g of total protein)	106.4	\pm 32.4	80.3	\pm 28.8	64.1	\pm 28.5
	CAT activity ♂ (U/mg of total protein)	865.0	\pm 215.6	576.2	\pm 133.6	494.5	\pm 116.8
	CAT activity ♀ (U/mg of total protein)	1074.3	\pm 180.2	755.3	\pm 153.0	633.1	\pm 168.6
	SOD activity (U/mg of total protein)	13.4	\pm 5.0	16.9	\pm 4.8	13.6	\pm 4.7
Metabolic detoxification (liver)	GST activity (U/g of total protein)	7382	\pm 1026	6796	\pm 1372	6646	\pm 2246
	EROD activity ♂ (pmol/min/mg of total protein)	2.87	\pm 3.67	30.19	\pm 17.03	22.36	\pm 18.23
	EROD activity ♀ (pmol/min/mg of total protein)	2.77	\pm 2.24	19.67	\pm 15.13	14.17	\pm 8.84
Synaptic transmission (muscle)	AChE activity (U/g of total protein)	31.2	\pm 7.4	39.6	\pm 12.9	48.6	\pm 15.4
Reproduction (gonad, blood and kidney)	Gonadosomatic index ♂	0.6	\pm 0.2	0.7	\pm 0.3	0.7	\pm 0.2
	Gonadosomatic index ♀	5.9	\pm 1.6	5.7	\pm 2.9	6.8	\pm 3.1
	Vitellogenin ♂ (log ng/mL blood)	2.1	\pm 0.9	< DL		2.2	\pm 0.8
	Spiggin ♀ (log U/g of total weight)	0.3	\pm 0.2	0.4	\pm 0.4	1.1	\pm 0.3

3.4. Integrated biomarker response (IBR)

Results of IBR calculations and star plots are presented in Fig.3. IBR results for the CW entrance was 25.2 against 17.4 for the CW exit.

As expected, all biomarkers which were highlighted to be significantly different from the Ladrancourt site present a strong deviation index from the basal line (deviation index > 1.5 or < -1.5). Moreover, some biomarkers with non-significant difference with the Ladrancourt site present a strong deviation index. This can be observed for Oxidative burst index, VTG in male, SOD and GST activity at the entrance of the CW as well as in Oxidative burst index, GSI and GST activity at the exit of the CW. Hence, the star plots emphasized some trends in induction or inhibition of biomarker which were not significant with statistical approach. This is probably due to the high inter-individual variability of these biomarkers.

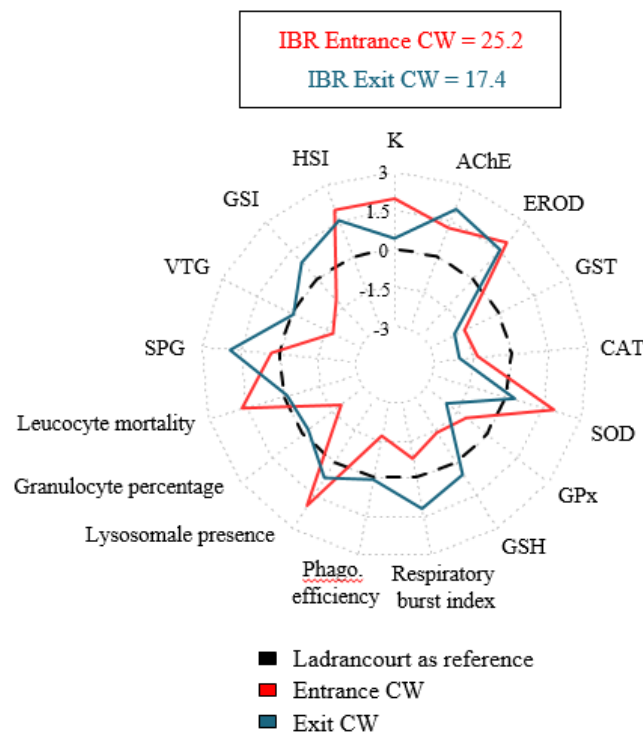


Fig. 3: Result of IBR calculations and star plot of deviation index from Ladrancourt station. K: Fulton's condition index; AChE: Acetylcholinesterase; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; CAT: catalase; SOD: superoxide dismutase; GPx: glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; Phago. efficiency: phagocytosis efficiency; SPG: Spiggin; VTG: Vitellogenin; GSI: Gonadosomatic index; HSI: Hepatosomatic index.

4. Discussion

The improvement of the water quality is highlighted and summarized by the Integrated Biomarker Response index which was equal to 25.2 at the entrance of the constructed wetland and decreased to 17.4 at the exit of the constructed wetland. Considering the entrance of the CW as the theoretical maximum IBR, the IBR at Ladrancourt was reduced by 31% which attests the efficiency of the CW in improving the water quality on a biological point of view. The seeming induction/inhibition of some biomarkers (i.e. Oxidative burst index, SOD, GST) which have not presented a significant difference with the reference site can be explained by the IBR calculation method. In fact, it is based on the mean of biomarker in each site and does not consider the interindividual variation inside groups. The result of IBR calculation is in accordance with ACP analysis which has highlighted the greatest proximity between the fish caged at the reference site and those caged at the exit of the wetland.

More precisely, the most important improvement in biomarker levels is measured for the innate immune system which was impaired in fish caged at the entrance of the CW (increase of leucocyte apoptosis and necrosis, reduce of granulocyte percentage and decrease of phagocytosis activity). This immune impairment was totally absent in fish caged at the exit of the wetland. The immunosuppressive effects of WWTP effluents are known and already observed in literature (Kakuta, 1997; Ménard et al., 2010). In fact, municipal wastewater can contain a variety of organic (i.e. polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides, etc.) and inorganic substances (i.e. arsenic, cadmium, chromium, lead, etc.) that are known to modulate immunity in fish (Ahmed, 2000; Bols et al., 2001). The immunosuppressive effects observed at the entrance of the CW suggest the presence of a contamination that modulated the immune response in stickleback. This contamination seems to be totally removed after the CW where fish do not present any immunosuppression which highlights the improvement of water quality by the CW.

Fish caged at the exit of the CW have presented higher AChE activity (48.6 ± 15.4 U/g of protein) in comparison to those caged at the reference site (31.2 ± 7.4 U/g of protein) and at the entrance of the CW (39.6 ± 12.9 U/g of protein). The measured AChE activity at the exit of wetland corresponds to the normal range (from 44 to 49 U/g of total protein) in control condition outside the breeding period which was observed in a previous study in three-spined stickleback (Catteau et al., 2019). In comparison, activities recorded at the Ladrancourt and the entrance of CW sites in the present study are low, which could indicate the presence of some organophosphorus contaminants known as cholinesterases inhibitors (Sturm et al., 1999). This hypothesis is supported by the agricultural context around the Marais-de-Sacy area which

could have contaminated the Ladrancourt site and the entrance of the CW with pesticides and therefore organophosphorus compounds. The constructed wetland seems to reduce chemical contamination and allow the return of AChE activity to a normal range. The discussion about the potential contamination of Ladrancourt site underlines the difficulty to find real contamination free reference sites. One way to solve this difficulty would be to measure biomarker levels in fish before exposure to use these values as reference (Vieira et al., 2017) or to establish generic reference values from control conditions (Marchand et al., 2019).

Some other improvements can be noticed at the exit of the CW, namely EROD activity and HSI. The EROD activity presented a strong induction at the entrance of the wetland compared to the reference site with a higher difference for males ($\times 10.5$) compared to females ($\times 7.1$). This induction was slightly reduced at the exit of the CW in both male and female fish: the induction factor was only $\times 7.8$ fold for male and $\times 5.1$ fold for female. Considering the EROD activity at the entrance of the CW as a theoretical maximum induction activity, the EROD activity decreased of 26% and 28% in male and female sticklebacks caged at the exit of the CW. At the same time, HSI was significantly increased at the entrance of the wetland in comparison to the reference site. It is known that an increase of HSI can be linked with the induction of some hepatic enzyme activities (Slooff et al., 1983). Indeed, some authors noticed a significant increase in HSI downstream of WWTP simultaneously with an increase in EROD activity (Corsi et al., 2003; Mdegela et al., 2010). Numerous compounds can bind to the AhR receptor and consequently induce CYP1A and EROD activities, especially dioxin-like compounds (i.e. polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurnas, polychlorinated biphenyls, etc.) or PAH compounds (Whyte et al., 2000). These xenobiotics are known to pass into the aquatic compartment through atmospheric deposition (Sakurai et al., 1998), runoff from agricultural area (Masunaga et al., 2001) or WWTPs effluents (Moon et al., 2008). Some induction of EROD activity downstream of WWTP have been already reported in literature, which tends to confirm the hypothesis of a regular contamination of WWTPs effluents by dioxine-like and/or PAH compounds (Corsi et al., 2003; McCallum et al., 2017). Even if some studies have highlighted the efficiency of CW to remove PAHs (Yi et al., 2016; Lamichhane, 2017), the major way to remove these compounds seems to be the direct adsorption to the sediment or to any suspended solid before sedimentation (Fountoulakis et al., 2009; Wojciechowska, 2013). Consequently, free water surface wetlands with horizontal flow (like the studied CW studied) seems to be less efficient to remove PAHs compared to a subsurface water wetland or a CW with vertical flow, which have more contact with solid matters (Fountoulakis et al., 2009). Finally, the reduced EROD activity at the exit of the CW highlighted a slight capacity of this facility to remove this type of contamination.

Concerning the antioxidant system, the decrease of CAT and GPx activities measured in fish caged at the entrance of the CW, compared to the reference site, still exists at the exit of the CW, but without any worsening between the two sites. Only GSH content increased compared to the entrance. However, despite the observed modulation of antioxidant defenses, TBARS content is below the detection limit in both sites which indicates the absence of oxidative damages. Results of the present study are rather different to those found in literature. Indeed, most studies have shown an increase of antioxidant systems (Cazenave et al., 2014; Jasinska et al., 2015; Pérez et al., 2018) and even an induction of oxidative damages (Cazenave et al., 2014; McGovarin et al., 2018; Pérez et al., 2018) in organisms downstream of WWTP. However, these observations seem to be dependent of considered species and organs. In the present study, the WWTP effluent seems to slightly reduce antioxidant systems in stickleback. This decrease in antioxidant defenses is not improved by the wetland but, in all cases, no oxidative damages are measured which indicate that the decrease of defenses was not strong or long enough to be deleterious for fish.

Finally, despite the improvement induced by the CW for some parameters, results for endocrine disruption are not as encouraging as for other biomarkers. Indeed, a strong induction of spiggin was measured in female fish caged at the exit of the wetland ($\times 3.5$ log unit) compared to the other fish. This induction was very strong compared to the induction factor found in wild female stickleback previously measured in Rhonelle and Escaut rivers (respectively $\times 1.22$ and $\times 1.34$ log unit in comparison with the reference site) by Sanchez et al. (2007). Although the androgen-like compounds are known to be present in WWTP effluents (Chang et al., 2011), the female sticklebacks caged at the entrance of the wetland did not show any spiggin production induction. One possible hypothesis to explain the absence of induction at the entrance of the CW could be that the complex mixture of the effluent induced some interactions which masked the effect of androgen-like compounds by a decrease of its bioavailability (i.e. adsorption to organic particles). A potential reduction of organic matter by the CW can increase the bioavailability of androgens which can explain the measured spiggin induction at the exit site only. Other investigations are necessary in order to furtherly understand this spiggin induction.

The link between the physico-chemical parameters and the biomarker responses can also be discussed especially for temperature which is known to have an important role in the regulation of metabolism activity in poikilotherm organisms such as fish. Water temperature is more elevated in Ladrancourt site than in the CW. Water in Ladrancourt comes directly from the groundwater and is consequently very stable throughout the year and never drops below 7°C. The water temperature seemed to decrease in the CW to reach the coolest level at the exit (mean from 7.6°C at the entrance to 5.2 °C at the exit). These temperatures are at the bottom

of the tolerance range of the stickleback (from 0 to 34.6°C) (Wootton, 1984) and the differences between the three sites are only of a few degrees. In our study, observed differences of temperature do not seem to play a major role in the biomarkers modulation. Actually, the IBR index is the highest at the entrance of the CW, compared to the reference site whereas temperatures are of the same order. On the contrary, the variations of conductivity and oxygen rate were exactly in the same way than some biomarkers responses, especially for innate immune biomarkers. Indeed, conductivity and oxygen rate were respectively higher and lower at the entrance of the CW compared to Ladrancourt site. These modulations were no longer observable at the exit of the CW where the oxygen and conductivity were at the same level compared to Ladrancourt. This highlights the beneficial of the constructed wetland to improve the physico-chemical quality of water. Few information is available in literature about the modulation of biomarker levels according to conductivity. However, the role of oxygen rate is more documented, especially in the induction of oxidative stress in case of hyperoxia (Martínez-Álvarez et al., 2005) and in decreasing of immune system in case of hypoxia (Bowden, 2008). Consequently, hypoxic conditions as at the entrance of the CW could be partly responsible for the immunosuppression measured in fish at the entrance of the wetland. So, to reduce the result misinterpretation, the confounding factors must not be neglected and should be integrated in the result interpretation.

5. Conclusion

In the present study, the efficiency of the constructed wetland of Sacy-le-Grand to improve the water quality was investigated by using an active biomonitoring approach with three-spined sticklebacks. Some physiological functions were assessed such as antioxidant and innate immune systems, metabolic detoxication, synaptic transmission and reproduction parameters. The integration of all the biomarker results in a biomarker index (IBR) has highlighted the benefic effect of this constructed wetland on water quality based on fish biomarkers assessment. This tool has helped to successfully discriminate the entrance and the exit of the wetland without use of chemical analysis. Even if few effects on the antioxidant system and an induction of spiggin were observed at the exit of the CW, the most part of biomarker levels impacted by the WWTP effluent were improved at the exit of the CW. More precisely, fish caged at the exit of the constructed wetland did not present any immunosuppressive effect. AChE activity returned to a normal range value in fish caged at the exit of the CW. Moreover, even if EROD activity and HSI did not return to normal values, the CW slightly improved these parameters.

The chemical composition of effluents is variable according to the type of wastewater received by the plant (municipal, industrial, hospital), the treatment performed by the plant and the

season (temperature and precipitation). In addition, the constructed wetland functioning is depending on the type of CW but also on the season. Consequently, more investigations would be necessary at all seasons to validate the diagnosis obtained in winter. In all cases, the present work has demonstrated the efficiency of the multi-biomarker approach using caged stickleback to characterize the adverse effects of a contamination by a WWTP effluent and to assess improvement induced by a constructed wetland. The caging approach associated with the integration of the results in an IBR allowed to make a robust environmental diagnosis of the water quality. This tool could be spread out on a larger scale to assess the impact of wastewater treatment plants on the water quality of rivers.

Acknowledgments

This research was funded by the INTERREG DIADeM program and the French Ministry of Ecology Ecotoxicology programs. The authors thank the European Regional Development Fund (ERDF). The authors are grateful to Tony Rulance (Oise County) and to Sacy-le-Grand town council for an easily access to the sites. The authors are also grateful to Dr. Antoine Le Guernic for his scientific advice.

References

- Ahmed, S., Popov, V., Trevedi, R.C., 2008. Constructed wetland as tertiary treatment for municipal wastewater. *Proceedings of the Institution of Civil Engineers - Waste and Resource Management* 161, 77–84. <https://doi.org/10.1680/warm.2008.161.2.77>
- Ahmed, S.A., 2000. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field. *Toxicology* 150, 191–206. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00259-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00259-6)
- Anderson, J.C., Carlson, J.C., Low, J.E., Challis, J.K., Wong, C.S., Knapp, C.W., Hanson, M.L., 2013. Performance of a constructed wetland in Grand Marais, Manitoba, Canada: Removal of nutrients, pharmaceuticals, and antibiotic resistance genes from municipal wastewater. *Chem Cent J* 7, 54. <https://doi.org/10.1186/1752-153X-7-54>
- Ayaz, S.Ç., Akca, I., 2000. Treatment of wastewater by constructed wetland in small settlements. *Water Sci Technol* 41, 69–72. <https://doi.org/10.2166/wst.2000.0012>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90036-M](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90036-M)
- Bado-Nilles, A., Betoulle, S., Geffard, A., Porcher, J.-M., 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* 20, 2692–2704. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1410-2>
- Bado-Nilles, A., Techer, R., Porcher, J.M., Geffard, A., Gagnaire, B., Betoulle, S., Sanchez, W., 2014a. 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. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.08.002>
- Bado-Nilles, A., Jolly, S., Porcher, J.-M., Palluel, O., Geffard, A., Gagnaire, B., Betoulle, S., Sanchez, W., 2014b. Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus sp.* *Environmental Pollution* 184, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.049>
- Blum, K.M., Andersson, P.L., Ahrens, L., Wiberg, K., Haglund, P., 2018. Persistence, mobility and bioavailability of emerging organic contaminants discharged from sewage treatment plants. *Science of The Total Environment* 612, 1532–1542. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.006>
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E.J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 853–873. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00040-4)
- Bowden, T.J., 2008. Modulation of the immune system of fish by their environment. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 373–383. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.03.017>
- Bradford, M.M., 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

- Bringolf, R., Summerfelt, R., 2003. Reduction of estrogenic activity of municipal wastewater by aerated lagoon treatment facilities. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 22, 77–83. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220110>
- Catteau, A., Le Guernic, A., Marchand, A., Hani, Y.M.I., Palluel, O., Turiès, C., Bado-Nilles, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Porcher, J.-M., 2019. Impact of confinement and food access restriction on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) during caging: a multi-biomarker approach. *Fish Physiol Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00670-1>
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M.J., 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators* 38, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.10.029>
- Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., Hu, J., 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res.* 45, 732–740. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.08.046>
- Chen, J., Liu, Y.-S., Su, H.-C., Ying, G.-G., Liu, F., Liu, S.-S., He, L.-Y., Chen, Z.-F., Yang, Y.-Q., Chen, F.-R., 2015. Removal of antibiotics and antibiotic resistance genes in rural wastewater by an integrated constructed wetland. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 1794–1803. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-2800-4>
- Corsi, I., Mariottini, M., Sensini, C., Lancini, L., Focardi, S., 2003. Cytochrome P450, acetylcholinesterase and gonadal histology for evaluating contaminant exposure levels in fishes from a highly eutrophic brackish ecosystem: the Orbetello Lagoon, Italy. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 203–212. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00359-4](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00359-4)
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Flammarion, P., Devaux, A., Nehls, S., Migeon, B., Noury, P., Garric, J., 2002. Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51, 145–153. <https://doi.org/10.1006/eesa.2001.2134>
- Fountoulakis, M.S., Terzakis, S., Kalogerakis, N., Manios, T., 2009. Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and linear alkylbenzene sulfonates from domestic wastewater in pilot constructed wetlands and a gravel filter. *Ecological Engineering* 35, 1702–1709. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2009.06.011>
- Fulton, T.W., 1902. *Rate of Growth of Sea Fishes.* Neill & Company.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s10646-014-1374-8>
- Gorito, A.M., Ribeiro, A.R., Almeida, C.M.R., Silva, A.M.T., 2017. A review on the application of constructed wetlands for the removal of priority substances and contaminants of emerging concern listed in recently launched EU legislation. *Environmental Pollution* 227, 428–443. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.060>
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249, 7130–7139.

- Hemming, J., Waller, W., C. Chow, M., Denslow, N., Venables, B., 2001. Assessment of the estrogenicity and toxicity of a domestic wastewater effluent flowing through a constructed wetland system using biomarkers in male fathead minnows (*Pimephales promelas Rafinesque*, 1820). *Environmental toxicology and chemistry / SETAC* 20, 2268–75. <https://doi.org/10.1002/etc.5620201020>
- Hsieh, C.Y., Liaw, E.T., Fan, K.M., 2015. Removal of veterinary antibiotics, alkylphenolic compounds, and estrogens from the Wuluo constructed wetland in southern Taiwan. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 50, 151–160. <https://doi.org/10.1080/10934529.2015.975062>
- Jasinska, E.J., Goss, G.G., Gillis, P.L., Van Der Kraak, G.J., Matsumoto, J., de Souza Machado, A.A., Giacomini, M., Moon, T.W., Massarsky, A., Gagné, F., Servos, M.R., Wilson, J., Sultana, T., Metcalfe, C.D., 2015. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Science of The Total Environment* 530–531, 140–153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.080>
- Kakuta, I., 1997. Effect of sewage on blood parameters and the resistance against bacterial infection of goldfish, *Carassius auratus*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12, 43–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1997\)12:1<43::AID-TOX7>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:1<43::AID-TOX7>3.0.CO;2-8)
- Katsiadaki, I., Scott, A.P., Hurst, M.R., Matthiessen, P., Mayer, I., 2002. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 1946–1954. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210924>
- Lamichhane, S., 2017. Improve the Efficiency of Constructed Wetlands in Removing Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) from Stormwater. Curtin University.
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Bado-Nilles, A., Palluel, O., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Delahaut, L., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.-M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016. In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). *Ecotoxicology* 25, 1234–1259. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1677-z>
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- Marchand, A., Tebby, C., Beaudouin, R., Hani, Y.M.I., Porcher, J.-M., Turies, C., Bado-Nilles, A., 2019. Modelling the effect of season, sex, and body size on the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, cellular innate immunomarkers: A proposition of laboratory reference ranges. *Science of The Total Environment* 648, 337–349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.381>
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15, 75–88. <https://doi.org/10.1007/s11160-005-7846-4>
- Masunaga, S., Yao, Y., Ogura, I., Nakai, S., Kanai, Y., Yamamuro, M., Nakanishi, J., 2001. Identifying Sources and Mass Balance of Dioxin Pollution in Lake Shinji Basin, Japan. *Environmental science & technology* 35, 1967–73. <https://doi.org/10.1021/es001729a>

- McCallum, E.S., Krutzelmann, E., Brodin, T., Fick, J., Sundelin, A., Balshine, S., 2017. Exposure to wastewater effluent affects fish behaviour and tissue-specific uptake of pharmaceuticals. *Sci. Total Environ.* 605–606, 578–588. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.073>
- McGovarin, S., Sultana, T., Metcalfe, C., 2018. Biological Responses in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) Caged Downstream from Municipal Wastewater Treatment Plants in the Credit River, ON, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100, 106–111. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2242-z>
- Mdegela, R.H., Braathen, M., Mosha, R.D., Skaare, J.U., Sandvik, M., 2010. Assessment of pollution in sewage ponds using biomarker responses in wild African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) in Tanzania. *Ecotoxicology* 19, 722–734. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0449-4>
- Ménard, L., Escarné, R., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Fournier, M., Gagné, F., 2010. The impacts of urban pollution on the immune system of spottail shiners. *Fresenius Environmental Bulletin* 19, 7.
- Moon, H.-B., Yoon, S.-P., Jung, R.-H., Choi, M., 2008. Wastewater treatment plants (WWTPs) as a source of sediment contamination by toxic organic pollutants and fecal sterols in a semi-enclosed bay in Korea. *Chemosphere* 73, 880–889. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.07.038>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Oikari, A., 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 78, 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.010>
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
- Pérez, M.R., Rossi, A.S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., Cazenave, J., 2018. In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators* 84, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.09.004>
- Sakurai, T., Suzuki, N., Masunaga, S., Nakanishi, J., 1998. Origin attribution of polychlorinated dibenzo p-dioxins and dibenzofurans in sediment and soil from a Japanese freshwater lake area through congener-specific data analysis. *Chemosphere, Chlorinated Dioxins and Related Compounds* 1996 37, 2211–2224. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00282-3](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00282-3)
- Sanchez, W., Aït-Aïssa, S., Palluel, O., Ditche, J.-M., Porcher, J.-M., 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16, 279–287. <https://doi.org/10.1007/s10646-006-0131-z>
- Sanchez, W., Bado-Nilles, A., Porcher, J.-M., 2012. Biomarqueurs chez le poisson : un outil d'intérêt pour le contrôle d'enquête. *La Houille Blanche* 49–54. <https://doi.org/10.1051/lhb/2012015>
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.-M., 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ Sci Pollut Res* 20, 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>

- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditche, J.-M., Porcher, J.-M., 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. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.11.003>
- Sanchez, W., Goin, C., Brion, F., Olsson, P.E., Goksøyr, A., Porcher, J.M., 2008b. A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.08.007>
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.003>
- Síma, J., Pazdernik, M., Triska, J., Svoboda, L., 2013. Degradation of surface-active compounds in a constructed wetland determined using high performance liquid chromatography and extraction spectrophotometry. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* 48, 559–67. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.730453>
- Slooff, W., Van Kreijl, C.F., Baars, A.J., 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology* 4, 1–14. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(83\)90057-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(83)90057-7)
- Sturm, A., Wogram, J., Hansen, P.-D., 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. <https://doi.org/10.1002/etc.5620180214>
- Toro-Vélez, A.F., Madera-Parra, C.A., Peña-Varón, M.R., Lee, W.Y., Bezares-Cruz, J.C., Walker, W.S., Cárdenas-Henao, H., Quesada-Calderón, S., García-Hernández, H., Lens, P.N.L., 2016. BPA and NP removal from municipal wastewater by tropical horizontal subsurface constructed wetlands. *Science of The Total Environment* 542, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.154>
- US EPA, 2000. *Guiding Principles for Constructed Treatment Wetlands*.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 13, 57–149. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- 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 Biol Toxicol* 10, 415–421. <https://doi.org/10.1007/BF00755791>
- Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Bianchini, A., Bueno Dos Reis Martinez, C., 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Sci. Total Environ.* 586, 598–609. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.026>
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 347–570. <https://doi.org/10.1080/10408440091159239>

- Wojciechowska, E., 2013. Removal of persistent organic pollutants from landfill leachates treated in three constructed wetland systems. *Water Science and Technology* 68, 1164–1172. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.316>
- Wootton, R.J., 1984. *A Functional Biology of Sticklebacks*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8513-8>
- Yi, X.-H., Jing, D.-D., Wan, J., Ma, Y., Wang, Y., 2016. Temporal and spatial variations of contaminant removal, enzyme activities, and microbial community structure in a pilot horizontal subsurface flow constructed wetland purifying industrial runoff. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 8565–8576. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6083-9>

1.4. Expérimentation complémentaire : variabilité interannuelle de la réponse aux effluents de STEU

Dans l'objectif de confirmer les résultats présentés dans l'article 2, l'expérimentation d'encagement en entrée et en sortie de la zone humide tampon de Sacy-le-Grand a été reconduite l'année suivante sur les mêmes sites et selon la même démarche. La qualité de Ladrancourt en tant que site de référence ayant été remise en question (inhibition de l'activité AChE et fortes activités antioxydantes), un quatrième site a été investigué sur La Frette, une rivière qui traverse les marais de Sacy d'ouest en est. Des épinoches issues de la population d'origine des bassins de stabulations de l'INERIS ont également été prélevées afin d'être utilisées comme référence population.

Les résultats sont présentés sur les figures 14, 15 et 16. Les inductions de l'apoptose leucocytaire, de l'EROD et de l'indice hépatosomatique mesurées en 2018 en entrée de la zone humide tampon sont retrouvées en 2019. Les niveaux d'induction sont cependant moins élevés qu'en 2018. Concernant les autres paramètres, aucun effet mesuré en 2018 chez les épinoches engagées dans l'effluent n'est retrouvé en 2019 (absence de modification de la distribution leucocytaire, d'augmentation du nombre de lysosomes et de diminution de l'activité de phagocytose). Ces résultats indiquent une toxicité de l'effluent moins importante en 2019 par rapport à 2018. Les effluents rejetés par les stations d'épuration présentent une contamination variable. Cette variabilité peut être liée au fonctionnement de la station de traitement elle-même, qui est dépendante de nombreux paramètres comme la température ou la concentration initiale en contaminants dans l'influent. Cette variabilité peut également être liée à la dilution de l'effluent, notamment par des précipitations plus importantes. La dilution a d'ailleurs été suggérée comme étant le facteur prédominant dans la réduction de la concentration de certaines molécules dans les effluents (Gómez et al. 2012). En conséquence de ce faible impact de l'effluent sur les niveaux de biomarqueurs, aucun effet significatif de la zone humide tampon n'a pu être mis en évidence en 2019.

Les niveaux de biomarqueurs mesurés chez les épinoches engagées à Ladrancourt sont également très différents de ceux mesurés en 2018. En particulier, l'inhibition de l'activité AChE et le stress oxydant mesurés en 2018 ne sont pas retrouvés l'année suivante, ce qui montre une réduction voire une disparition de la contamination détectée en 2018. Cependant, par rapport aux niveaux de biomarqueurs mesurés dans la population d'origine en 2019, le site de la Frette semble d'avantage correspondre à un site de référence que Ladrancourt. En effet, seuls 6 biomarqueurs présentent des différences significatives par rapport aux niveaux mesurés dans la population d'origine, uniquement liés à la condition générale (diminution de HSI chez les femelles et du facteur K chez les deux sexes) ainsi qu'au système immunitaire

inné (diminution de l'apoptose, de l'efficacité de phagocytose, de la flambée oxydative et modification de la distribution leucocytaire). Au contraire, 13 biomarqueurs associés au système antioxydants, à la condition générale, à l'immunité innée et à la transmission synaptiques sont significativement différents des niveaux mesurés dans la population d'origine chez les épinoches encagées à Ladrancourt.

Ces résultats mettent en évidence que la contamination générée par un effluent de STEU n'est pas stable et continue dans le temps, et qu'elle peut être modulée par de nombreux facteurs, comme des facteurs climatiques mais également en fonction de la qualité et le volume d'influents qui entrent dans l'installation. Ainsi, cette étude rappelle que l'utilisation d'une approche multibiomarqueurs en biosurveillance active ne reflète la contamination d'un milieu qu'à un temps donné, et que la caractérisation précise de l'état d'un milieu ne peut être réalisée qu'à travers des analyses répétées dans le temps.

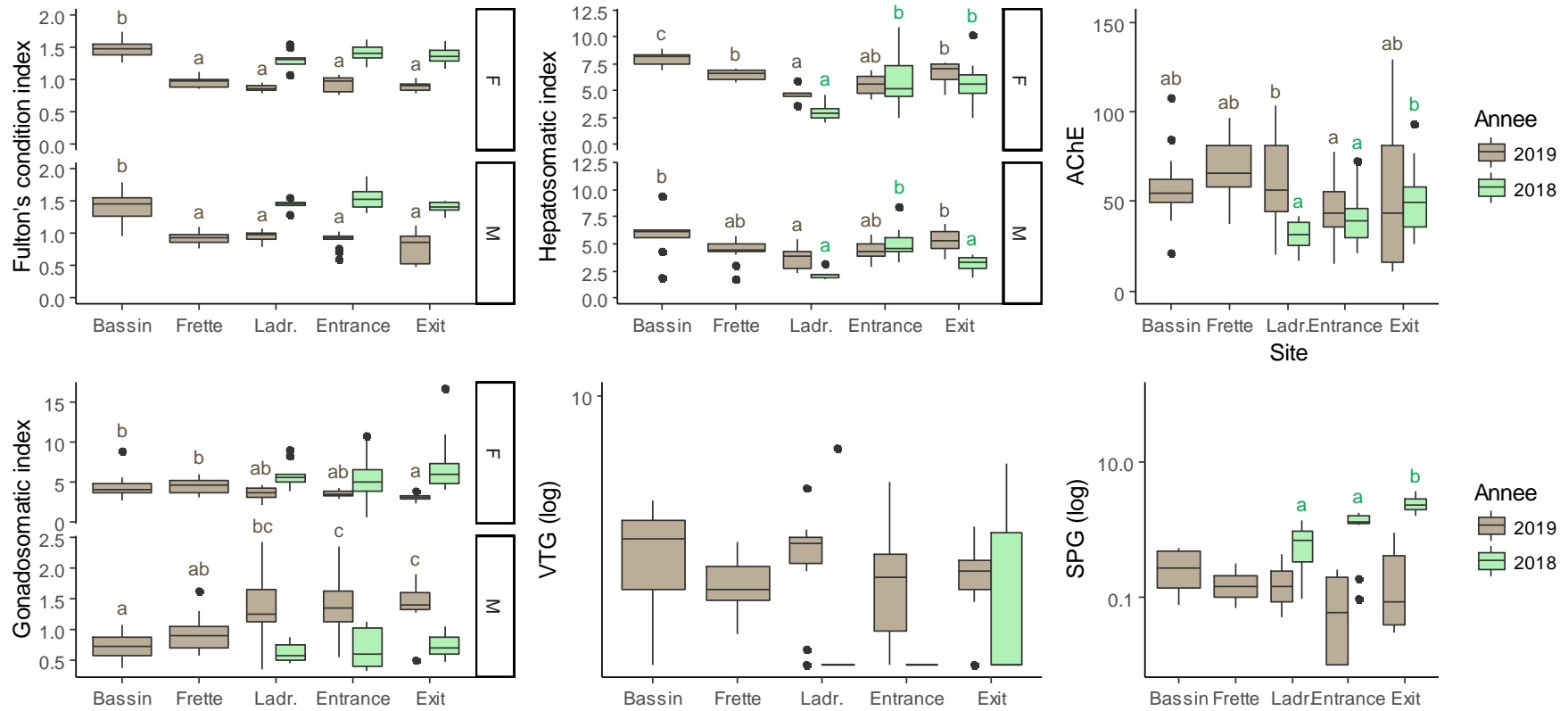


Figure 14 : Réponses des biomarqueurs associés à la condition générale des individus, à la transmission synaptique et à la reproduction après 21 jours d'encagement sur les différents sites en 2018 et 2019.

Les lettres représentent les différences significatives entre les groupes au sein d'une même année, selon les résultats des tests de Tukey ou de Nemenyi ($\alpha = 5\%$). Une absence de lettre signifie une absence de différence significative pour l'année considérée. AChE : activité acétylcholinestérase ; VTG : vitellogénine ; SPG : spigine.

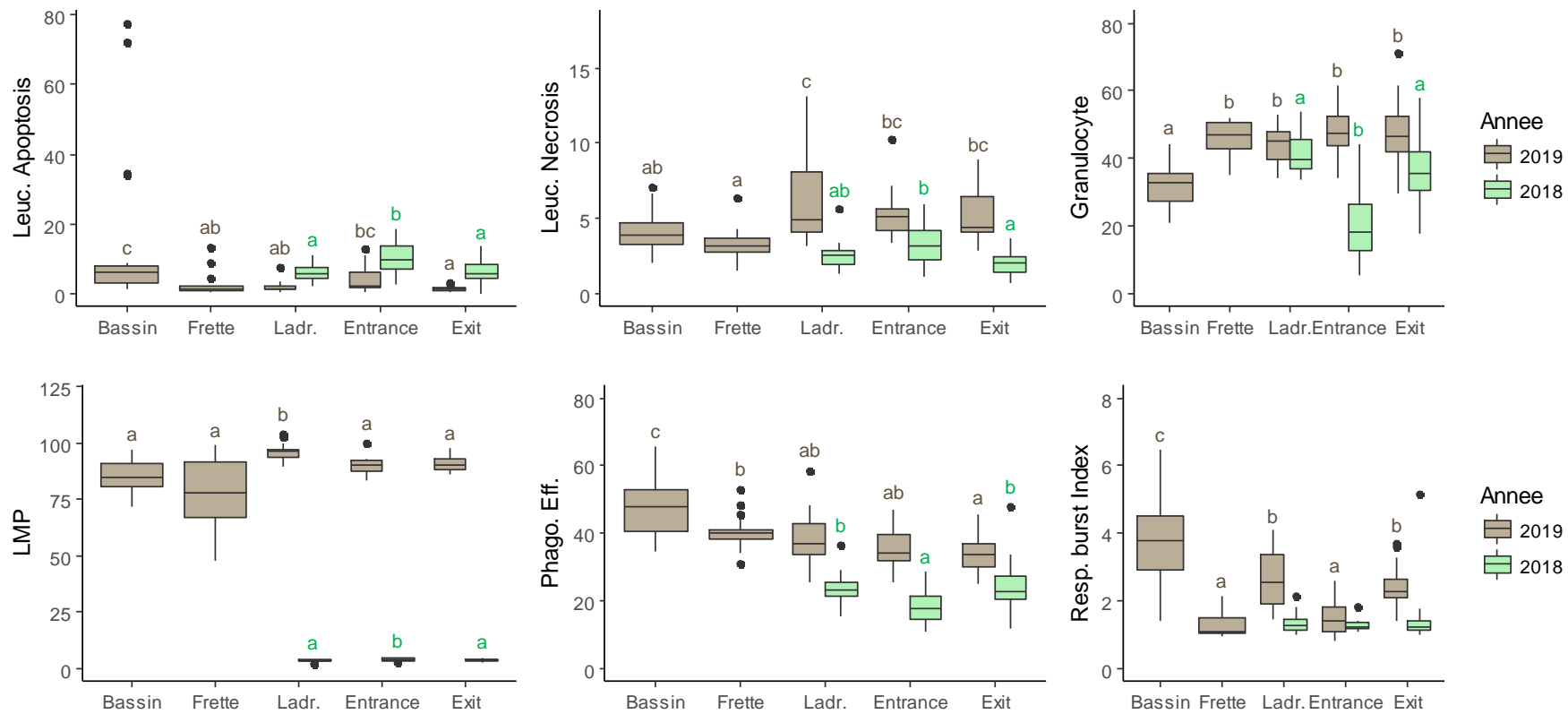


Figure 15 : Réponses des biomarqueurs associés à l'immunité innée après 21 jours d'encagement sur les différents sites en 2018 et 2019. Les lettres représentent les différences significatives entre les groupes au sein d'une même année, selon les résultats des tests de Tukey ou de Nemenyi ($\alpha = 5\%$). Une absence de lettre signifie une absence de différence significative pour l'année considérée. Leuc. : leucocytes ; LMP : présence en lysosome ; Phago. Eff. : efficacité de phagocytose ; Resp. burst index : indice de flambée oxydative.

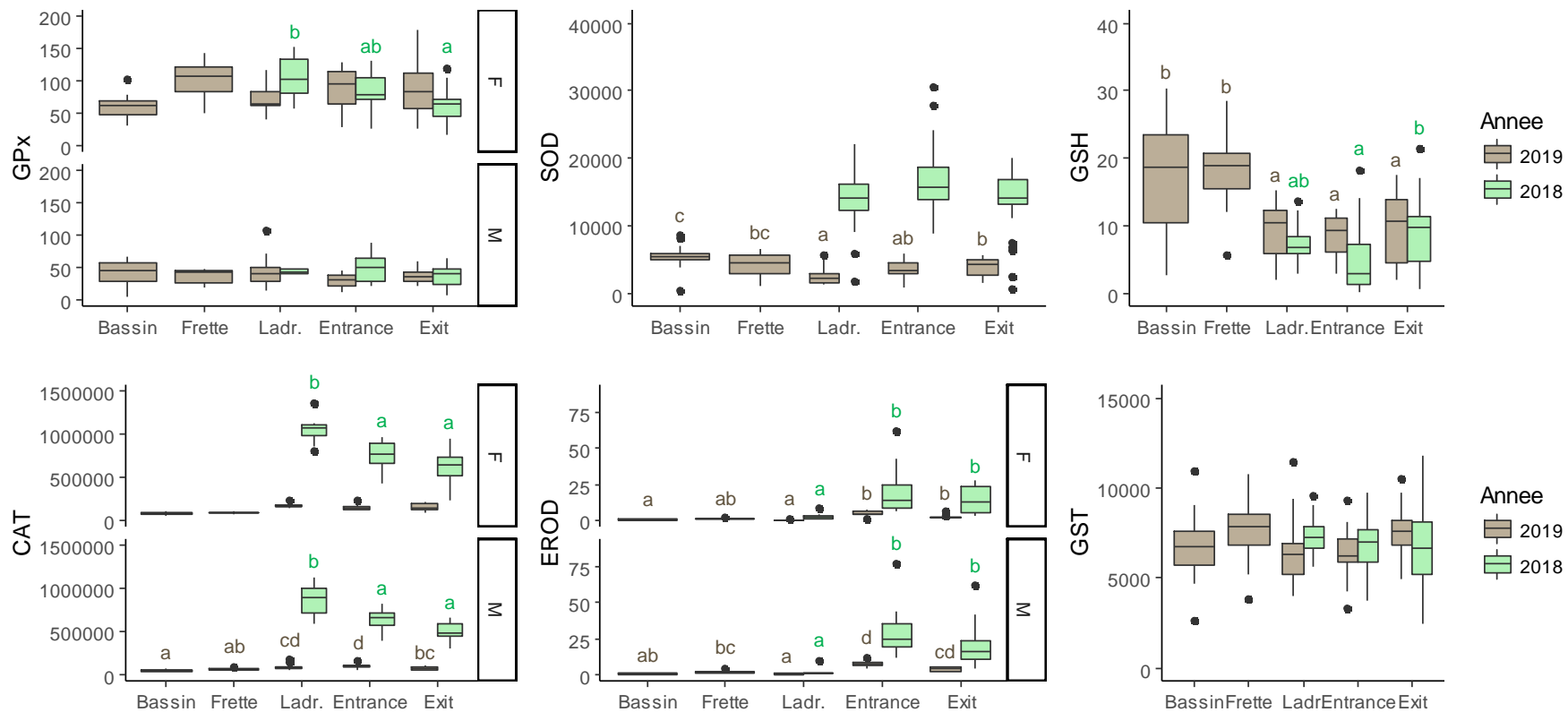


Figure 16 : Réponses des biomarqueurs associés aux défenses antioxydantes et à la biotransformation après 21 jours d'encagement sur les différents sites en 2018 et 2019.

Les lettres représentent les différences significatives entre les groupes au sein d'une même année, selon les résultats des tests de Tukey ou de Nemenyi ($\alpha = 5\%$). Une absence de lettre signifie une absence de différence significative pour l'année considérée. GPx : Glutathion Peroxydase ; SOD : Superoxide Dismutase ; GSH : Glutathion total ; CAT : Catalase ; EROD : Ethoxyrésorufine-O-dééthylase ; GST : Glutathion-S-Transférase.

2. APPLICATION DES OUTILS SUR LA MEUSE ET TROIS DE SES AFFLUENTS

2.1. Contexte et objectifs

La seconde application *in situ* des outils étudiés a été réalisée dans le cadre du projet Interreg DIADeM (Développement d'une approche intégrée pour le diagnostic des eaux de la Meuse). Il s'agit d'un programme européen transfrontalier impliquant la France et la Belgique. Ce projet a pour but de développer et de proposer une méthodologie visant à mesurer et prédire les conséquences écologiques liées aux rejets de substances pharmaceutiques dans les milieux aquatiques du bassin de la Meuse et ce, à travers une approche pluridisciplinaire. Le programme se découpe en plusieurs axes, dont un axe de biosurveillance *in situ*, visant à évaluer les impacts des rejets de STEU sur les organismes aquatiques.

Au-delà de l'évaluation des impacts des effluents de STEU, l'étude réalisée a permis de déployer pour la première fois l'approche active avec l'épinoche à trois épines sur plusieurs rivières d'un même bassin versant et ainsi d'évaluer la pertinence de ces outils dans l'évaluation des milieux à une plus large échelle.

2.2. Matériel et méthodes

Les encagements d'épinoches à trois épines dans le cadre du programme Interreg DIADeM se sont déroulés en septembre et octobre 2018. Deux cages contenant chacune 15 poissons (ratio mâle/femelle équilibré) ont été déposées en amont et en aval de stations d'épuration de 4 communes. Les caractéristiques de chaque site sont résumées dans le tableau 13. La STEU de Bouillon se jette dans la Semois, zone sensible à caractère touristique et, de ce fait, est la seule STEU disposant d'un traitement aux ultraviolets.

Tableau 13 : Caractéristiques des 4 sites étudiés dans le cadre du programme Interreg DIADeM

Commune (Pays)	Charleville-Mézières (France)	Namur (Belgique)	Avesnes-sur-Helpe (France)	Bouillon (Belgique)
Capacité STEU (EH)	117000	93100	19830	7500
Rivière réceptrice	Meuse	Meuse	Helpe-Majeure	Semois
Débit moyen de la rivière (m ³ /s)	230	230	3,86	26

En parallèle de ces encagements, 30 épinoches provenant de la population d'origine maintenue dans les bassins extérieurs à l'INERIS ont été prélevées afin de servir de référence pour l'ensemble de l'expérimentation.

L'ensemble des données a d'abord été analysé par des Analyses en Composantes Principales (ACP) suivi d'une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) qui a permis d'objectiver la séparation de différents groupes en prenant en compte l'intégralité des biomarqueurs. Ces résultats ont ensuite été complétés par des ANOVA mixtes (incluant l'effet « cage » en facteur aléatoire) suivi de tests post-hoc de Tukey ($\alpha = 5\%$) afin de comparer les niveaux des biomarqueurs de l'ensemble des sites entre eux.

2.3. Synthèse des principaux résultats

L'approche multibiomarqueurs a permis (i) de caractériser les effets des effluents des différentes STEU sur la physiologie des épinoches engagées en aval et (ii) de discriminer les différentes rivières étudiées dans le programme Interreg.

Les effets des effluents ont été essentiellement mesurés au travers d'altérations des paramètres immunitaires (augmentation de la mortalité leucocytaire et diminution de l'activité de phagocytose) sur les sites de Bouillon, Avesnes-sur-Helpe et Namur. Une augmentation modérée de l'activité EROD a également été mise en évidence chez les poissons engagés en aval de Namur et de Bouillon. Les autres biomarqueurs ont été peu voire pas du tout impactés par les effluents, quelle que soit la STEU considérée, ce qui met en évidence le faible impact de ces effluents sur des organismes exposés à court terme en aval des rejets.

En revanche, l'analyse par cluster a permis de montrer que la batterie de biomarqueurs étudiés était capable de séparer les différents sites d'étude selon les fonctions physiologiques modulées sur chacun d'entre eux :

- Sur la Meuse à Charleville-Mézières, la contamination des milieux est caractérisée par un stress oxydant important, possiblement lié à une contamination urbaine induite par les villes de Verdun et Sedan, en amont de Charleville-Mézières.
- Sur la Meuse à Namur (80km en aval de Charleville-Mézières), une réduction générale du système immunitaire inné a été mesurée, possiblement liée à la confluence avec la Sambre en amont du site qui apporte une contamination supplémentaire à celle déjà présente dans la Meuse.
- Sur l'Helpe-majeure, une forte induction du système immunitaire a été observée (essentiellement par l'induction de la flambée oxydative). Cette rivière présente une contamination essentiellement agricole.

- Enfin, les épinoches encagées à Bouillon sur la Semois ont présenté une diminution générale des capacités de défense (biotransformation et systèmes antioxydants). Cette rivière est essentiellement caractérisée par une contamination liée à la forte activité touristique de la région.

Globalement, d'importantes différences entre les épinoches encagées et la population d'origine ont été mises en évidence avec notamment une inhibition générale de l'activité AChE chez les poissons encagés, associée à une diminution du HSI montrant ainsi le caractère généralisé de la contamination.

Finalement, cette étude a permis de confirmer l'intérêt des biomarqueurs associés au système immunitaire inné dans la caractérisation d'une contamination aux effluents de station d'épuration. Les autres marqueurs ont été moins sensibles aux différents effluents étudiés.

Les outils utilisés dans ce travail apparaissent comme pertinents pour une comparaison de plusieurs sites sur une large échelle géographique. La biosurveillance active avec l'épinoche à trois épines offre donc de nombreuses perspectives quant à l'évaluation des milieux à l'aide d'une approche multibiomarqueurs combinant un ensemble de fonctions physiologiques.

L'ensemble des résultats de cette étude est présenté dans l'article 3 « Application of a multibiomarker approach to assess the water quality using caged three-spined stickleback: a proof of concept ».

ARTICLE 3: APPLICATION OF A MULTIBIOMARKER APPROACH TO ASSESS THE WATER QUALITY USING CAGED THREE-SPINED STICKLEBACK: A PROOF OF CONCEPT.

(in preparation)

Authors

Audrey Catteau^{1*}, Anne Bado-Nilles¹, Rémy Beaudouin¹, Cleo Tebby¹, Olivier Palluel¹, Cyril Turiès¹, Nina Chrétien^{1,2}, Alain Geffard², Jean-Marc Porcher^{1*}

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

²Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), UMR-I 02 SEBIO, UFR Sciences Exactes et Naturelles, Campus Moulin de la Housse, BP 1039, 51687 Reims, France.

*Corresponding authors:

audrey.catteau@ineris.fr, phone: +33 3 44 61 81 78;

jean-marc.porcher@ineris.fr, phone: +33 3 44 55 65 84

Abstract :

The use of a multi-biomarker approach with three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) through an active biomonitoring strategy appears to be a promising tool in water quality assessment. The present work proposes for the first time a proof of concept through the assessment of these tools' efficiency in the discrimination of some sites in a large scale on the Meuse basin in Europe. The study was a part of an EU program which aims to assess the Meuse quality across the French-Belgian border. Sticklebacks were caged 21 days upstream and downstream from the wastewater treatment plants (WWTPs) of Namur (Belgium), Charleville-Mézières (France), Bouillon (Belgium) and Avesnes-sur-Helpe (France). A battery of biomarkers was assessed to represent different physiological functions, such as innate immunity (leucocyte mortality and distribution, phagocytosis activity, respiratory burst, antioxidant system (GPx, CAT, SOD and GSH content) and oxidative damages (TBARS), biotransformation enzymes (EROD, GST), synaptic transmission (AChE) and reproduction system (spiggin and vitellogenin concentration). The study highlighted few effects of WWTPs effluents on the physiological parameters in caged stickleback. Only a decrease of innate immune system was observed downstream from the WWTPs, especially through an increase of leucocyte mortality and a decrease in phagocytosis activity. A slight induction of EROD activity was also noticed downstream from the WWTPs of Bouillon and Namur. However, the use of active biomonitoring clearly discriminated the different study sites from the reference but also amongst themselves and demonstrated its efficiency in assessing the quality of water and in characterizing types of physiological impacts on fish.

Keywords

biomonitoring, fish, caging, biomarkers, WWTP

1. Introduction

Nowadays, the chemical contamination of aquatic environments is spread out all around the globe. The presence of micropollutants in aquatic environments has become a widespread problem of increasing concern over several decades. These micropollutants carry many different molecules such as pharmaceuticals, personal care products, natural and synthetic hormones, pesticides and industrial chemicals (i.e. polychlorinated biphenyl, polycyclic aromatic hydrocarbons etc.) and come from multiple sources. Wastewater treatment plants (WWTPs) are not designed to treat all chemicals generated by human activities and found in wastewater. WWTPs are thus considered a major point where there is pollution to a source of water by micropollutants (Luo et al., 2014). In order to assess, limit and finally reduce the global contamination of aquatic environments, some laws have been promulgated across different countries. For Europe, the most important legal framework for aquatic environment protection is the Water Framework Directive (WFD) (2000/60/CE) which aims to ensure continental water bodies reach good ecological and chemical states by 2027. However, recommended tools for ecological and chemical states assessment in the WFD present some limitations. The ecological quality assessment is based on the study of biological communities (i.e. benthic invertebrate fauna, fish fauna) but is not informed by early indicators and can neither determine the origin of a community change nor avoid it. The chemical quality assessment is only based on the monitoring of the 45 chemicals (or chemical families) defined as “priority” in the WFD. This approach is thus inexhaustive. Over the past decade, some tools have been proposed to fill this lack of predictivity and comprehensiveness with an increasing interest in the multibiomarkers approach.

A lot of definitions can be found in literature (Kroon et al., 2017) but the most used is the one of Peakall and Walker (1994) who define biomarkers as a “change in biological response (ranging from molecular through cellular and physiological responses to behavioral changes) which can be related to the exposure of a sentinel organism to some chemicals or to the toxicant effect of these chemicals”. Aquatic organisms are often exposed to a wide range of pollutants. Thus, the study of many biomarkers allows us to integrate the overall contamination data to assess the global state of a study area through the assessment of the health status of individuals. The use of a battery of biomarkers representative of some major physiological functions is increasingly used for environmental monitoring programs (Flammarion et al., 2002; Sanchez et al., 2008b; Le Guernic et al., 2016a).

Two strategies of biomonitoring have been developed. The passive biomonitoring approach, which is based on the biomarker measurement using native individuals, was successfully used in the past (Galloway et al., 2004; Hinck et al., 2006; Sanchez et al., 2008b; Dalzochio et al.,

2016). However, the biomarker responses in the case of passive sampling can be driven by some confounding factors (i.e. length of individuals, sex ratio, food quantity and quality, migration) (Oikari, 2006; Dalzochio and Gehlen, 2016). Moreover, the spatial monitoring can be limited by the abundance of the sentinel species in the studied area (Conti and Cecchetti, 2001). To overcome the limits induced by the passive sampling, the active biomonitoring approach based on the caging of the sentinel species in the studied sites has been developed. In fact, standardization of used individuals is possible with this approach. Moreover, some abiotic factors can also be controlled to limit the variability of the response (distance from pollution source, depth of cage, time of caging). Caging is particularly useful when the sentinel species is absent in a study site. Even if the species is present, this approach limits the risk associated with the capture of endangered species. This active approach can be used with different aquatic species such as bivalve, crustaceans or fish (Besse et al., 2013; Cappello et al., 2013; Dey et al., 2016). Among fish, the three-spined stickleback is a species that has gained interest in biomonitoring for several years, particularly used in the active approach. In fact, its small size enables easy handling and caging and its tolerance to salinity and temperature variation (Wootton, 1984) enables its caging in a large geographical area in many hydrosystems. This fish was also found to be relatively tolerant to pollution (Pottinger et al., 2002; Sanchez et al., 2008b). Moreover, stickleback is known as a model species for endocrine perturbation, especially through the assessment of vitellogenin and spiggin protein (Katsiadaki et al., 2002). More than only endocrine perturbation, a lot of biomarkers representatives of different physiological functions (antioxidant defenses, innate immune system, biotransformation, synaptic transmission) were developed on this species and used both in passive (Sanchez et al., 2008b) and active biomonitoring (Le Guernic et al., 2016a, 2016b). Finally, some confounding factors induced by caging (density, transport, restriction of food access, confinement) have been well characterized on stickleback biomarkers (Le Guernic et al., 2016c; Catteau et al., 2019) which enables a thorough comparison between sites according to the chemical contamination using this species.

For all these reasons, the study of a well-known biomarker set in three-spined stickleback using an active approach seems to be a promising tool for environmental quality assessment. The present work proposes for the first time a proof of concept through the assessment of these tools efficiency in the discrimination of some sites in a large scale on the Meuse basin in Europe. Study sites have been chosen upstream and downstream of some WWTP effluents that flow in the Meuse and its tributaries, to assess the impacts of these municipal wastewater systems on the physiological response of fish.

2. Material and methods

2.1. Description of the study sites

This work was conducted within a cross-border research program (Interreg DIADeM program) which aims to assess the quality of the Meuse river basin on both sides of the French-Belgian border. Four WWTPs in France and Belgium have been selected with different treatment capacities. The most important studied WWTP is located in Charleville-Mézières (49°45'55.3"N 4°43'43.5"E, France). It has a capacity of 117000 population equivalent (PE) and flows directly into the Meuse river (average flow of 230 m³/s). Then, the WWTP of Namur (50°28'51.2"N 4°57'18.1"E, Belgium) presents a capacity of 93100 PE and also flows in the Meuse river 80km downstream of Charleville-Mézières. In addition, two little WWTPs flowing in Meuse tributaries were investigated: the WWTP of Avesnes-sur-Helpe (19830 PE, 50°07'48.5"N 3°55'13.6"E, France) flows into the Helpe Majeure river (average flow of 3.86 m³/s) and the WWTP of Bouillon (7500 PE, 49°47'24.0"N 5°03'00.0"E, Belgium) flows into the Semois river (average flow of 26 m³/s) (fig. 1). All the studied WWTPs present a supplementary treatment for nitrogen and phosphorus. Despite its small capacity, the WWTP of Bouillon is the only one that applies a UV treatment before releasing water into the river.

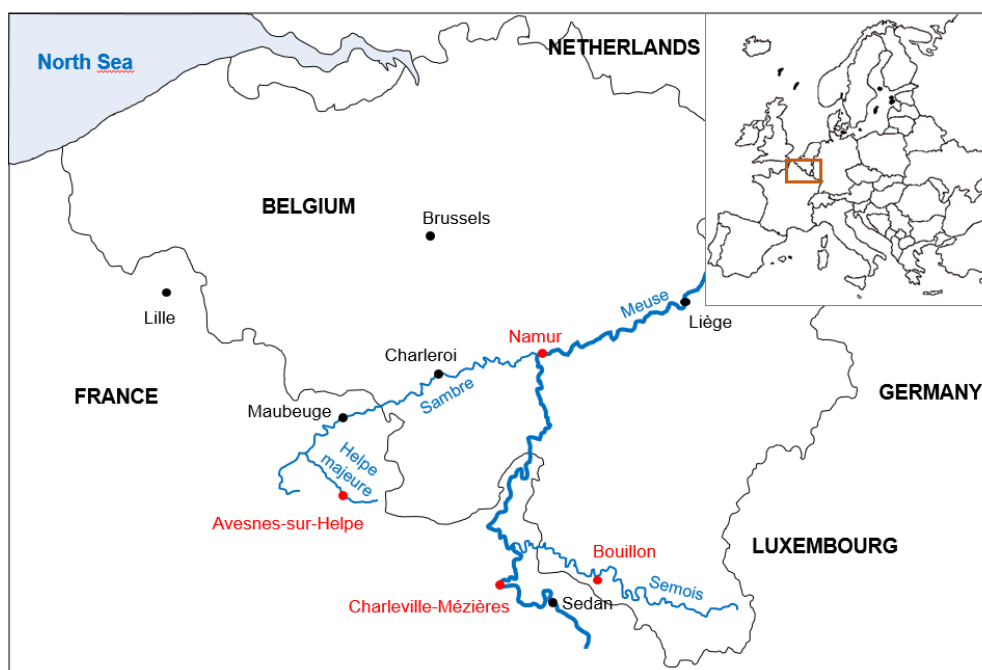


Fig. 1: Localization of studied sites in France and Belgium along the Meuse basin

2.2. Experimental design and biomarker analysis

Three-spined sticklebacks used during this study come from a well-characterized population used for some years in the French National Institute for Industrial Environment and Risks

(INERIS). Each experiment was conducted in accordance with the European directive 2010/63/UE on the protection of animals used for scientific purposes at INERIS facilities (registration number E60-769-02).

The experiment took place in Autumn 2018 as previously recommended to limit the impact on reproductive states (Catteau et al., 2019). One week before the start of the experiment, the sex of 240 adults sticklebacks (1-year-old; 4.40 ± 0.45 cm ; 1.07 ± 0.34 g) from natural outdoor ponds was determined using a head morphology model (De Kermoisan et al., 2013) to obtain a sample consisting of half males and half females. These were then maintained in separate tanks.

At the start of caging, fish were transported in specific tanks to limit stress. After notating fish length and weight, the cage containing 15 fish were placed in duplicate upstream and downstream of each WWTP, to effectively place 15 males and 15 females on each site. The fish received no external food during the entire experiment. The pH, oxygen concentration and conductivity were recorded three times in the different sites during the study and temperature was monitored continuously throughout the exposure and are summarized in the table 1.

Table 1: Physico-chemical parameters of studied sites.
Results are expressed with arithmetical mean \pm standard deviation.

		Temperature (°C)			Conductivity (μ S/cm)			pH			Oxygen rate (mg/L)		
		Mean	\pm	Sd	Mean	\pm	Sd	Mean	\pm	Sd	Mean	\pm	Sd
Avesnes-sur-Helpe	Upstream	12.5	\pm	1.5	505.8	\pm	122.2	8.0	\pm	0.4	9.1	\pm	0.9
	Downstream	12.6	\pm	1.5	379.0	\pm	20.5	7.9	\pm	0.2	9.0	\pm	0.9
Bouillon	Upstream	13.1	\pm	1.7	310.0	\pm	26.4	8.6	\pm	0.5	11.7	\pm	1.2
	Downstream	13.4	\pm	1.6	314.0	\pm	26.7	8.6	\pm	0.3	11.5	\pm	0.8
Namur	Upstream	15.0	\pm	0.9	685.3	\pm	46.4	8.1	\pm	0.2	9.9	\pm	0.4
	Downstream	15.2	\pm	1.0	707.0	\pm	39.6	8.0	\pm	0.2	9.9	\pm	0.5
Charleville-Mézières	Upstream	13.5	\pm	1.6	606.6	\pm	30.3	8.1	\pm	0.2	9.7	\pm	0.3
	Downstream	13.6	\pm	1.6	599.4	\pm	11.5	8.1	\pm	0.1	9.7	\pm	0.1

After 21 days of exposure, sticklebacks from each cage and 30 fish from the initial population (considered as the reference in this study) were anesthetized by balneation with MS222 (Tricaine methanesulfonate, 100 mg/L, Sigma-Aldrich, USA) before cervical dislocation. As previously described (Catteau et al., 2019), organs (spleen, liver, kidney, blood and muscle) of each fish were taken, measured and stored at -80°C into appropriate buffer before biomarker measurement. Table 2 summarized the description of each biomarker tested (condition index, innate immune responses, antioxidant system, oxidative damages, biotransformation, synaptic transmission, reproductive system).

Table 2: List of measured biomarkers in three-spined stickleback and references used for each method. GSH: total glutathione; GPx: Glutathione peroxidase; SOD: Superoxide dismutase; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; AChE: Acetylcholinesterase; VTG: Vitellogenin; SPG: Spiggin.

	Biomarkers	Organs	Units	Reference
Condition Index	Fulton's condition index	Whole body	E.U.	Fulton 1902
	Hepatosomatic index	Liver	E.U.	Slooff et al. 1983
Innate immune responses	Leucocyte necrosis		%	
	Leucocyte apoptosis		%	
	Granulocyte percentage	Spleen	%	Bado-Nilles et al. 2014a
	Phagocytosis capacity		%	
	Phagocytosis efficiency		%	
	Respiratory burst index		E.U.	
	Antioxidant system	GSH content		µmol/g of total protein
GPx activity		Liver	U/g of total protein	Paglia and Valentine 1967
Catalase activity			U/mg of total protein	Babo and Vasseur 1992
SOD activity			U/g of total protein	Paoletti et al. 1986
Oxidative damages	TBARS content	Liver	nmol/g of total protein	Ohkawa et al. 1979
Biotransformation	EROD activity	Liver	pmol/min/mg of total protein	Flammarion et al. 1998b
	GST activity		U/g of total protein	Habig et al. 1974
Synaptic transmission	AChE activity	Muscle	U/g of total protein	Ellman et al. 1961
Reproductive system	Gonadosomatic index	Gonad	E.U.	Zeyl et al. 2014
	VTG concentration	Blood	ng/mL of blood	Sanchez et al. 2008b
	SPG concentration	Kidney	U/g of total fish weight	Sanchez et al. 2008a

2.3. Statistical analysis

All statistical analyses were performed with R software version 3.3.2 (Foundation for *Statistical* Computing, Vienna, Austria).

To verify the general well-being of sticklebacks after 21 days of caging, the means of standard length, weight and Fulton's condition index were recorded on each cage and at the end of the experiment these were compared to those recorded at the start. These comparisons were realized thanks to Student or Wilcoxon tests ($\alpha = 5\%$), according to the respect of normality and homoscedasticity between groups assessed respectively by Shapiro-Wilk tests and Bartlett's tests ($\alpha = 5\%$).

Then, the data set has been integrated in a Principal Component Analysis (PCA) followed by a Hierarchical Agglomerative Clustering (HAC) (using Ward's criterion). This second analysis aims to gather the individuals into some defined groups characterized by the active variables

(the individual biomarker responses in this study) and was conducted with the R package “FactoMineR” through the HCPC function. The groups (mostly called “clusters”) can be described according to the percentage of individuals that are included in it but also with the active variables that contribute to the construction of the clusters. For the description with the active variables, the analysis gives the average of the variables in the cluster (“Mean in category”), the average of the variables for the whole data (“Overall mean”), the associated standard deviation and a v.test associated with a p value. This v.test corresponds to the test of the following hypothesis: “the mean of the category is equal to the overall mean”. A value of the v.test greater than 1.96 corresponds to a p-value lower than 0.05; the sign of the v.test indicates if the mean of the cluster is lower or greater than the overall mean (Husson et al. 2010).

These analyses were completed by the calculation of an Integrated Biomarker Response index (IBR) (Sanchez et al., 2013) to compare the global difference of biomarker levels upstream and downstream from the WWTP effluent from the reference population.

Finally, these global analyses were followed by the analysis of differences between sites for each biomarker. These analyses were carried out through ANOVA with random factor (with the replicates as the random factor) on raw data or log-transformed data, according to the respect of normality and homoscedasticity of ANOVA residuals (Shapiro-Wilk’s tests and Bartlett’s tests, $\alpha = 5\%$). These analyses were followed by Tukey analysis to compare each group to each other ($\alpha = 5\%$).

3. Results

A slight mortality rate was observed with at least one (Avesnes-sur-Helpe, Bouillon upstream, Charleville-Mézières) or two fish per cage (Bouillon downstream, Namur) corresponding to a minimal survival rate of 93.3%. Furthermore, during the experiment, no external sign of stress nor injury nor significant weight-loss have been observed. However, a significant decrease in Fulton condition index has been shown in 8 of the 16 cages, especially in of Namur and Avesnes-sur-Helpe (supp. data 1).

3.1. Effects of the WWTP on biomarker responses

Regardless of the rivers, the major impact of the effluent is the modification of immune responses especially an increase of leucocyte mortality due to necrosis factor (table 3). More specifically, the downstream of Bouillon WWTP was more impacted than the others and additionally it showed a reduction in phagocytosis activity, due to reduction of phagocytosis capacity and efficiency, and a decrease of respiratory burst due to combined reduction of ROS basal and activated. On the contrary, the WWTP of Charleville-Mézières seems to induce a significant increase in the respiratory burst by the combined action of ROS basal and activated. An increase and a decrease in ROS basal and activated was measured in sticklebacks respectively caged downstream of Avesnes-sur-Helpe and Namur effluents but without inducing any modification in the respiratory burst index. Additionally, downstream of Namur effluent, a modification of leucocyte distribution was measured in fish to the detriment of granulocyte percentage. In addition to the effects on the immune system, the EROD activity increased in stickleback caged downstream of Bouillon and Namur WWTP.

In Charleville-Mézières, an increase of GST activity, AChE activity and a decrease of VTG concentration were measured downstream of the WWTP compared to the upstream. However, the levels recorded for these three parameters downstream of the WWTP were similar or closer to the levels recorded in the reference population (). These results have thus suggested that caged stickleback downstream from the WWTP have presented a better physiological condition than those caged upstream. This observation is consistent with IBR calculations which indicate that the global physiological states of three-spined sticklebacks downstream the WWTP was closer to the reference than those caged upstream (fig. 4).

Table 3: Results of upstream/downstream difference in biomarker responses for each site. The “+” and the “-” respectively mean a significant induction and inhibition of the corresponding biomarkers was recorded in downstream compared with upstream, following results of ANOVA and tukey tests ($\alpha = 5\%$). K: Fulton condition index; HSI: Hepatosomatic index; Leuc.: leucocyte; Phago.: Phagocytosis; ROS B: Basal oxidative activity; ROS A: Active oxidative activity; Resp. burst index: Respiratory burst index; GSH: total glutathione; GPx: Glutathione peroxidase; CAT: Catalase; SOD: Superoxide dismutase; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; AChE: Acetylcholinesterase; GSI: Gonadosomatic index; VTG: Vitellogenin; SPG: Spiggin.

Physiological function	Biomarker	Bouillon	Avesnes-sur-Helpe	Namur	Charleville-Mézières
General condition	K				
	HSI				
Innate immune system	Leuc. Mortality		+	+	
	Leuc. Necrosis	+	+	+	
	Leuc. Apoptosis	-	+		
	Granulocyte				-
	Phago. Capacity	-			
	Phago. Efficiency	-			
	Resp. burst index	-			+
	ROS B	-	+	-	-
ROS A	-	+	-	-	
Antioxidant system	GSH content				
	GPx activity				
	CAT activity				
	SOD activity				
Oxidative damages	TBARS content				
Biotransformation	EROD activity	+		+	
	GST activity				+
Synaptic transmission	AChE activity				+
Reproductive system	GSI				
	VTG (log)				-
	SPG (log)				

Nevertheless, as shown with the ACP which explains only 26.2% of the overall variance, the WWTP effluents have a slight impact on the multi-biomarker analysis (fig. 2). Indeed, the cluster composition has highlighted that upstream and downstream caged fish in one site are globally grouped in the same cluster (fig. 3 ; table 4). The IBRs have also confirmed that, with a weak discrepancy between upstream and downstream values at each station: +1.1 at Bouillon, +0.6 at Avesnes-sur-Helpe, -0.4 at Namur and -3.9 at Charleville-Mézières (fig. 4). Overall, apart from the immune system, the results have indicated low impacts of the WWTP effluents whatever the size of the considered river. However, all these statistical tests confirm a high impact on biomarkers of the contamination due to station rather than WWTP effects.

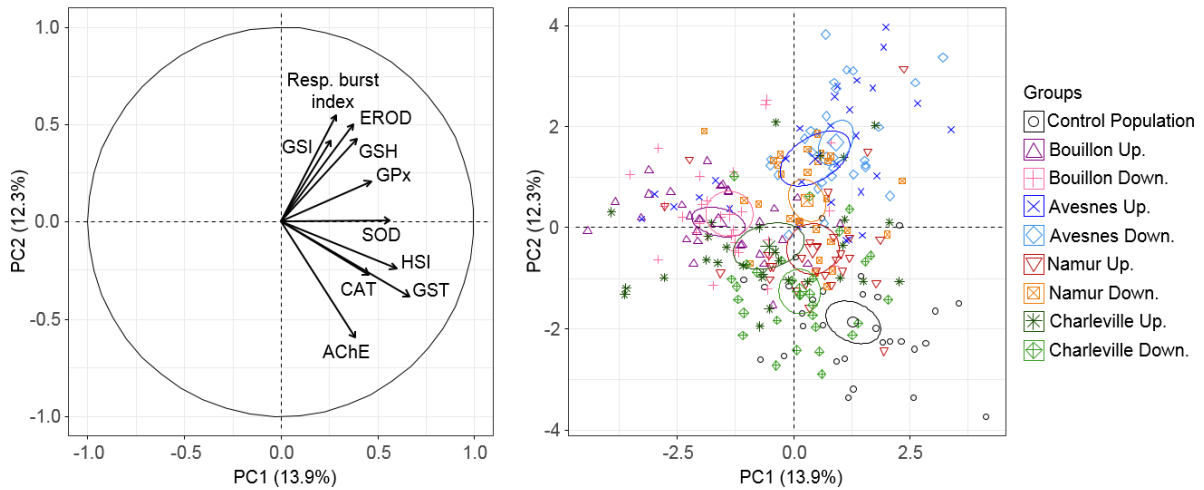


Fig. 2: Results of the principal component analysis (PCA).

Variable graphical is presented to the left. Only variable which contributes for more than 10% to the building of axis are indicated. Individual graphical is presented to the right. GSI: Gonadosomatic index; Resp. burst index: Respiratory burst index; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GSH: total glutathione; GPx: Glutathione peroxidase; SOD: Superoxide dismutase; HSI: Hepatosomatic index; GST: Glutathione-S-transferase; CAT: Catalase, AChE: Acetylcholinesterase; Up.: Upstream; Down.: Downstream.

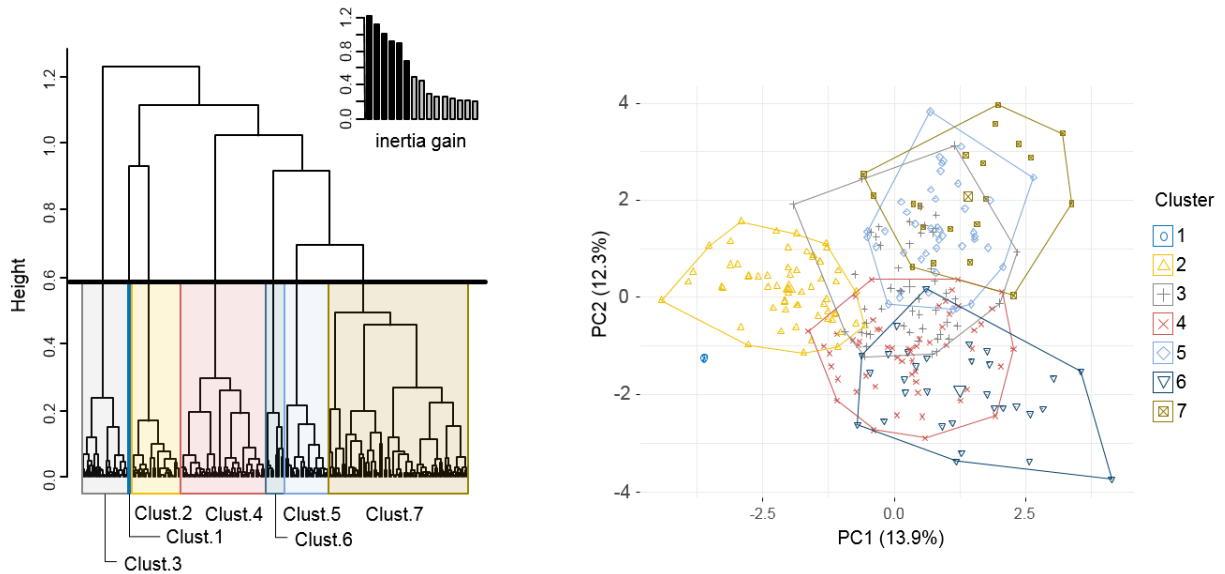


Fig. 3: Results of the hierarchical agglomerative clustering (HAC).

The generated dendrogram is presented to the left. The individual graphical with clusters is presented to the right. Clust. 1: n = 2 with 100% from Charleville-Mézières upstream; Clust. 2: n = 62 with 69.4% from Bouillon; Clust. 3: n = 49 with 77.6% from Namur and 20.4% from Bouillon; Clust. 4: n = 53 with 81.1% from Charleville-Mézières; Clust. 5: n = 41 with 100% from Avesnes-sur-Helpe; Clust. 6: n = 31 with 90.3% from the reference population; Clust. 7: n = 21 with 47.6% from Avesnes-sur-Helpe, 28.6% from Charleville-Mézières and 14.3% from Namur.

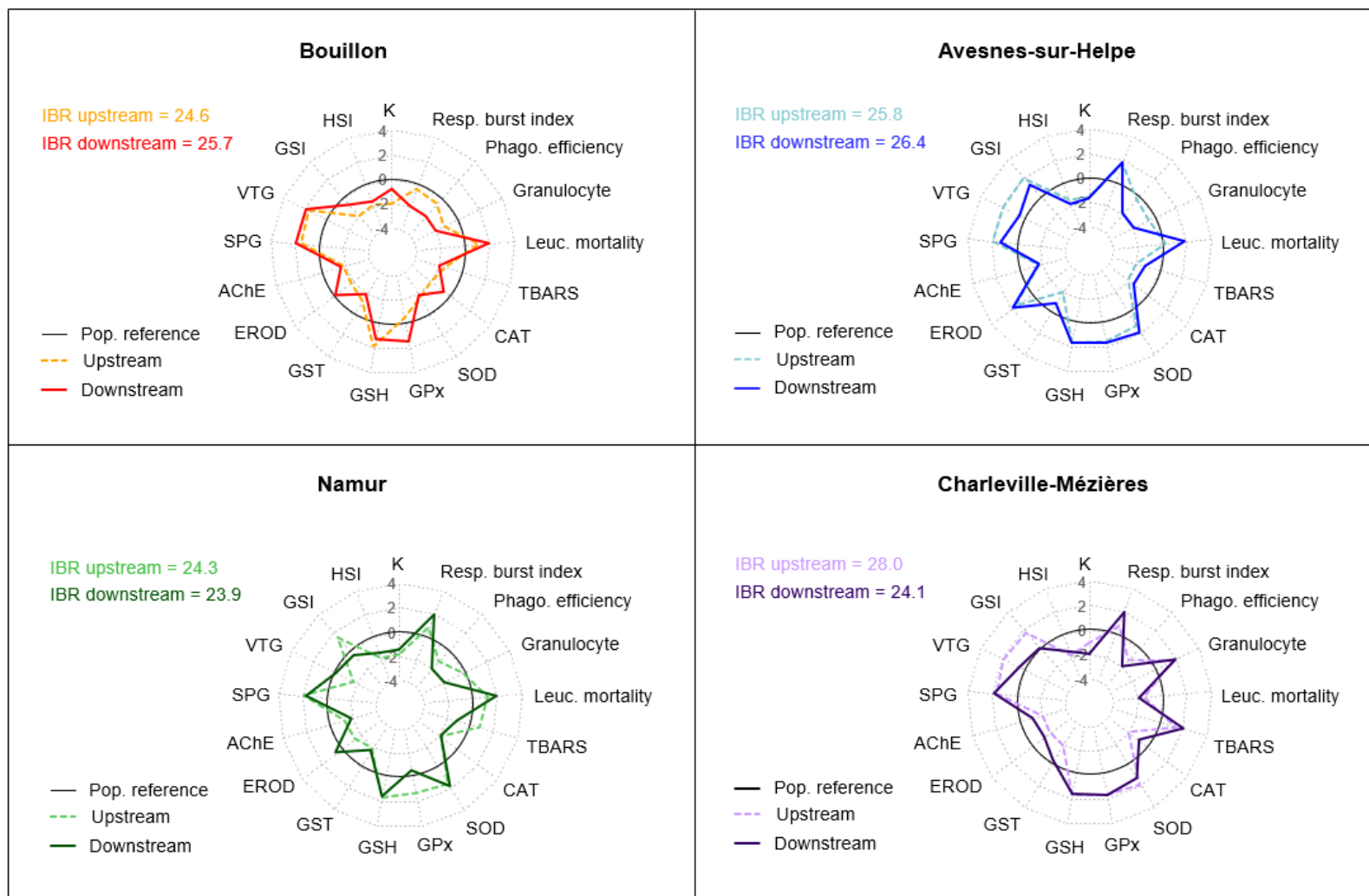


Fig. 4: Result of IBR calculations and star plot of deviation index from the population reference.

K: Fulton's condition index; Resp. burst index: Respiratory burst index; Phago. Efficiency: Phagocytosis efficiency; Leuc. mortality: leucocyte mortality; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; CAT: Catalase; SOD: Superoxide dismutase; GPx: Glutathione peroxidase; GSH: total glutathione; GST: glutathione-S-transferase; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; AChE: Acetylcholinesterase; SPG: Spiggin; VTG: Vitellogenin; GSI: Gonadosomatic index; HIS: Hepatosomatic index.

3.2. Effects of station specificity on biomarkers

Despite the low impacts of effluents measured in stickleback biomarker responses, the whole analyses, and especially the HAC, have highlighted differences in the global biomarker responses between the sites amongst themselves but also with the population reference. In fact, sticklebacks caged in the same site have been gathered in the same cluster and one cluster can be associated with one studied site (except for Namur). The sticklebacks from the reference population were clearly distinct from caged sticklebacks.

Thereby, cluster 2 (n = 62) has gathered most of individuals caged in Bouillon. More specifically, this cluster is respectively composed of 75.9% and 77.8% of the fish caged in the Semois upstream and downstream of the WWTP of Bouillon (table 4). This cluster was described by lower values for a high number of biomarkers in comparison with the overall mean (from the most to the least important in the cluster building : SOD, GST, HSI, CAT, TBARS, GSH, AChE, GPx, respiratory burst index, EROD, GSI and leucocyte mortality) (table 5). The modulated biomarkers were mainly included in defense systems (antioxidant and biotransformation). Oxidative damages are also lower in this group.

Most of the sticklebacks caged in the Helpe Majeure at Avesnes-sur-Helpe were gathered in cluster 5 (n = 41), which respectively contained 58.6% of upstream and 82.6% of downstream individuals (table 4). This group was mainly characterized through a very high respiratory burst index as well as a higher phagocytosis efficiency which suggests an induction of immune system, despite the slightly switch in leucocytes composition to the detriment of granulocytes. This cluster is also defined by higher defense capacities (GSH content, SOD, EROD and GST activities) and a lower AChE activity (table 5).

The sticklebacks caged in the Meuse at Namur, especially downstream, were spread in two different clusters (3 and 4). Cluster 3 (n = 49) has gathered the main part of the fish caged upstream the WWTP of Namur (96.4%), 39.3% of the fish caged downstream as well as the main part of individuals from the Semois which were not included in cluster 2 (table 4). This cluster was mainly described by a strong inhibition of immune capacity compared with other groups. High leucocyte mortality and low phagocytosis efficiency were reported for this cluster associated with a switch in leucocyte distribution (to the detriment of granulocytes). The mean of catalase activity was also lower for individuals included in this cluster (table 5).

Cluster 4 (n = 53) was mainly composed of fish caged in the Meuse at Charleville-Mézières. Indeed, this group has respectively gathered 56.7% and 89.7% of the sticklebacks caged upstream and downstream from the WWTP of Charleville-Mézières. This cluster is also composed of 32.1% of the fish caged upstream the WWTP of Namur (table 4). This group has presented a lower leucocyte mortality, phagocytosis efficiency and respiratory burst index as

well as a switch in leucocyte distribution to the detriment of granulocytes compared with the overall mean. In addition, the individuals of this cluster have presented higher levels of antioxidant defenses (SOD and GPx activities, GSH content). Higher oxidative damages were also recorded which suggests a high oxidative stress on these individuals (table 5).

Finally, nearly all of sticklebacks from the reference population (93.3%) were included in the cluster 6 (n = 31) (table 4). This cluster is defined through a higher AChE activity and a high HSI in fish. The modulations of these two parameters are confirmed by the statistical analysis (supp. data 3) which highlighted an inhibition of AChE activity for all caged fish compared with reference groups associated with a decrease in HSI. The cluster 6 was also characterized by lower leucocyte mortality, respiratory burst index, GSH content and SPG in female concentration as well as a high phagocytosis efficiency, CAT activity and GST activity (table 5).

Two other clusters have been defined. Cluster 1 contained only two individuals from the Meuse caged upstream the WWTP of Charleville-Mézières. These individuals are male fish which have been separated from others because of the high VTG concentration and switch in leucocyte distribution to the benefit of granulocytes (table 4 and table 5). Cluster 7 (n = 21) contained individuals from all sites, even if a high number of them were sticklebacks caged in the Helpe Majeure at Avesnes-sur-Helpe (34.5%). These individuals have presented higher GSI and GPx activity. In fact, the fish of this group are in majority female sticklebacks (16 among the 21 individuals, data not shown) which have probably not quite completed their breeding (table 4 and table 5)

Table 4: Compositions of clusters. Results are presented in percentage of individuals in each site which are included in the corresponding cluster.
Up.: Upstream; Down.: Downstream.

	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7
Control population		3.3				93.3	3.3
Avesnes Up.		20.7			58.6		20.7
Avesnes Down.			3.4		82.8		13.8
Bouillon Up.		75.9	17.2	3.4		3.4	
Bouillon Down.		77.8	18.5				3.7
Namur Up.		10.7	39.3	32.1		7.1	10.7
Narmur. Down.		3.6	96.4				
Charleville Up.	6.7	20.0		56.7			16.7
Charleville Down.		6.9		89.7			3.4
Total number of individuals	2	62	49	53	41	31	21

Table 5: The contribution of each biomarker to the building of the clusters in the AHC.

This table is a summary of supp. data 2. The numbers correspond to the v.test calculated for each biomarker and each cluster. Only significant v.test were presented in the table. For all $|v.test| > 3.3$, $p.value < 0.001$. The v.test of the most contributive variable ($|v.test| \geq 5$) are represented in red. K: Fulton condition index; HSI: Hepatosomatic index; Phago.: Phagocytosis; Resp. burst index: Respiratory burst index; GSH: total glutathione; GPx: Glutathione peroxidase; CAT: Catalase; SOD: Superoxide dismutase; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; AChE: Acetylcholinesterase; GSI: Gonadosomatic index; VTG: Vitellogenin; SPG: Spiggin.

Physiological function	Biomarker	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3	Cluster 4	Cluster 5	Cluster 6	Cluster 7
General condition	K			-2.9		-2.1	3.6	2.5
	HSI		-5.9				8.7	
Innate immune system	Leucocytes mortality		-2.0	9.0	-4.1		-3.2	
	Granulocytes	2.4		-6.2	8.9	-3.0		
	Phago. Efficiency			-3.9	-5.2	4.9	4.3	2.8
	Resp. burst index			-3.8	-3.4	-2.8	12.7	-2.8
Antioxidant system	GSH content		-5.0			3.2	2.4	-4.6
	GPx activity		-4.7			2.9		7.7
	CAT activity		-5.3	5.7			4.0	
	SOD activity		-9.6			6.4	3.3	
Oxidative damages	TBARS content		-5.1		7.5			
Biotransformation	EROD activity		-3.6		-3.8	5.0		
	GST activity		-8.2			3.4	2.9	4.6
Synaptic transmission	AChE activity		-4.8			-2.9	11.1	
Reproductive system	GSI		-2.4				-2.1	13.2
	VTG (log)	15.5						
	SPG (log)				4.8		-3.0	-2.5

4. Discussion

4.1. The multibiomarker approach to assess the effect of the different WWTPs effluents.

The biomarker set in three-spined sticklebacks was chosen to be representative of the major physiological functions of the organisms. Some parameters can be categorized as “defense biomarkers” (i.e. phagocytosis activity, respiratory burst, antioxidant and biotransformation enzymes) and some others can be defined as “damage biomarkers” (i.e. leucocyte mortality, oxidative damages, neurotoxicity with AChE activity or reproductive parameters). Regarding their many different physiological functions (i.e. biotransformation, antioxidant, immune and reproductive systems), WWTPs effluents are known to induce deleterious effects on fish (Kakuta, 1997; Ménard et al., 2010; Scarcia et al., 2012; Kim and Jung, 2016; McGovarin et al., 2018; Palas et al., 2018; Pérez et al., 2018; Blanco et al., 2019). Thus, the use of this complete battery of complementary biomarkers should help to assess the whole effects of the contaminants mixture brought by the WWTP effluents.

Surprisingly, few effects of effluents were highlighted in the whole organisms. Only an increase was measured in EROD activity (only at Bouillon and Namur) as well as a recurrent decrease in the innate immune system. Other functions were not significantly impacted by the effluents.

The cytochrome P4501A (CYP1A) is involved in phase I reaction and works mainly in liver. Its induction is mediated through the binding of xenobiotic (especially dioxin-like or polycyclic aromatic hydrocarbon compounds) to an aryl hydrocarbon receptor (AhR) which induces gene expressed, ARNm transcription and proteins synthesis. The catalytic activity of synthesized protein can be assessed by measurement of EROD activity, which is considered to be the most sensitive biomarker for this pathway (Whyte et al., 2000). The increase of EROD activity in organisms exposed downstream of WWTPs was already described in literature (Garric et al., 1996; Kosmala et al., 1998), which attests the interest of these parameters in this context of contamination. However, the present EROD induction factor downstream the WWTPs was only $\times 2.16$ and $\times 1.95$ in Bouillon and in Namur respectively, to reach mean activities only equal to 1.45 and 1.81 pmol/min/mg of total protein in the two sites. These induction factors were very low compared to inductions measured when fish were exposed to known CYP1A1 inducers for which the factor of induction can range from 15 fold to 88-fold (Morrow et al., 2004; Sanchez et al., 2008d; Stepić et al., 2012; Sturve et al., 2017). Moreover, Kosmala and al. (1998) have found an increase in EROD activity of $\times 24$ and $\times 6$ in the mirror carp (*Cyprinus carpio*) exposed 16 days to a wastewater effluent respectively in Spring and in Autumn. Consequently, the values recorded in the present study can be considered as a moderate variation of EROD activity.

However, the measured effects on the innate immune system are recurrent and indicate some immunosuppressive effect. This immunosuppressive effects of WWTPs effluents were also measured upstream from the WWTPs effluents but were more pronounced in fish caged in the downstream sites. This fact was already observed in literature. Especially, the decrease of phagocytosis activity is a known phenomenon (Kakuta, 1997; Salo et al., 2007; Ménard et al., 2010). Moreover, some authors have highlighted the absence of immune response after an injection of *Aeromonas salmonicida* in goldfish (*Carassius auratus*) and in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to a WWTP effluent prior the pathogen injection (Kakuta, 1997; Hoeger et al., 2005). WWTPs effluents are known to contain a variety of organic (i.e. polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides) and inorganic (i.e. arsenic, cadmium, lead) xenobiotics which are known for the impairment they cause to fish immunity (Ahmed, 2000; Bols et al., 2001). The present results suggest the presence of chemicals that modulate the innate immune system, especially in the effluents of Bouillon, Avesnes-sur-Helpe and Namur WWTPs. These results have highlighted the interest in immune biomarkers in biomonitoring. Indeed, without considering these parameters, the conclusion would be that there is a total absence of deleterious effects of the effluents. The importance of immune parameters to assess the toxicity of WWTPs effluents has already been highlighted in a previous study using caged three-spined sticklebacks (Catteau et al. submitted).

The WWTPs effluents have been shown to induce a strong oxidative stress in fish caged directly in the effluent (Cazenave et al., 2014; McGovarin et al., 2018; Pérez et al., 2018) or downstream from the effluent (Jasinska et al., 2015). These effects have not been found in the present study. This absence of oxidative stress could be linked with the transitional nature of the antioxidant response. Antioxidant enzymes are known to be quickly induced in the presence of contaminants and to return to a normal activity after some days of exposure (Sanchez et al., 2005). Three weeks of exposure could be too long to measure the induction of these enzymes in comparison with 96h (Cazenave et al., 2014) or 15 days (McGovarin et al., 2018; Pérez et al., 2018). Moreover, the sensibility of the used species and stage (juvenile) used in other studies in literature could also explain the higher oxidative stress in the WWTPs effluent than the one measured in adults three-spined sticklebacks.

The WWTPs effluents were known to bring a lot of estrogenic compounds (Luo et al., 2014) and were highlighted to induce the VTG concentration (Larsson et al., 1999; Jasinska et al., 2015; McGovarin et al., 2018). Surprisingly, no impact on the VTG was measured in sticklebacks caged 21 days downstream from the WWTP, whatever the study site. Two hypotheses can be proposed to explain this absence of VTG induction: the concentration of estrogenic compounds was too low (because of the strong dilution factor of the low initial concentration in the effluent) or the caging time was too short to induce the VTG production in

male adult sticklebacks. In all cases, even if the VTG as biomarker was proved to be pertinent in passive biomonitoring with the three-spined stickleback (Sanchez et al., 2008c), the absence of VTG induction raises some questions about the pertinence of this biomarker in active biomonitoring with adult stickleback.

Finally, although the Bouillon WWTP was the only plant using a tertiary treatment with UV disinfection, the measured effects downstream from the effluent were as important as on the other sites. Moreover, the Semois (Bouillon) and the Helpe Majeure (Avesnes-sur-Helpe) are smaller than the Meuse. A small river can be considered as a more sensible ecosystem because of the weaker dilution effluent factor than in a greater river. Living or caged organisms downstream from the effluents of small rivers (the Semois and the Helpe Majeure) should thus have presented more biomarker modulations than in the great river (the Meuse). However, the effects measured downstream from the effluents were not stronger in the small rivers than in the Meuse. Finally, in the present study, biomarker responses enabled us to detect the moderate impacts of the WWTP in caged fish downstream from the effluents, whatever the study site.

4.2. The multibiomarker approach to discriminate the rivers in the Meuse basin

However, the weak effects of effluents highlighted by the battery of biomarkers do not question the deployed tools (caging and chosen biomarkers). The whole biomarker responses have helped to efficiently discriminate the different rivers from the Meuse basin. The results have highlighted the capacity of the biomarker responses to distinguish the Semois in Bouillon from the Helpe Majeure in Avesnes-sur-Helpe, and even on the river Meuse two different sites distant from 80 km (Namur and Charleville-Mézières). The study of a large biomarkers set representative of several physiological functions appeared to be a very relevant approach to identify the impacted functions and to highlight the differences in the global contamination of the sites.

Thereby, the global inhibition of acetylcholinesterase activity is an indicator of neurotoxicity in sticklebacks caged in all sites. In fact, cholinesterase enzymes are responsible for the degradation of the neurotransmitter acetylcholine from the synaptic cleft. This neurotransmitter is implied in the transmission of nervous messages. A modification in cholinesterase activities can induce adverse effects on the normal nervous system function (Fulton and Key 2001). Associated with this neurotoxicity, fish caged in the Meuse at Charleville-Mézières have presented a strong oxidative stress as well as a slightly increased sign of endocrine perturbation. This deleterious effect observed in the Meuse can be linked with an urban contamination coming from the city crossed by the river upstream Charleville-Mézières (Verdun 18139 inhabitants and Sedan 16846 inhabitants). On the other hand, the Meuse at

Namur is rather characterized by a general inhibition of the innate immune system of caged fish. The differences highlighted between Namur and Charleville-Mézières can be linked with the additional contamination brought by the Sambre just upstream of the Namur site. In fact, this tributary crosses two urban areas (Maubeuge, 29392 inhabitants and Charleroi, 204150 inhabitants) as well as areas bringing agricultural pressure. In the Helpe Majeure, the river contamination is reflected by an induction of the innate immune systems of caged sticklebacks, especially the respiratory burst index which corresponds to the oxygen-dependent route of elimination of phagocytosed substance (Bols et al. 2001). The Helpe Majeure is a river with strong agricultural pressure which mainly suggests an agricultural contamination. Finally, in the Semois at Bouillon, the global contamination results in a general weakening of defense systems in caged sticklebacks (antioxidant and biotransformation). The anthropogenic pressures put on this river are rather linked to the high touristic activities of the region.

Associated with all these effects on the physiological functions, the whole caged sticklebacks have presented weaker condition index and hepatosomatic index than the reference population. It was shown that this decrease was not related to caging when it occurred at non-breeding periods (Catteau et al. 2019). These decreases of physiological parameters can thus be linked with a general weakening of individuals caused by the general contamination of the rivers. The strong contamination along the rivers could explain the global absence of difference in physiological condition of caged sticklebacks upstream and downstream the WWTPs effluents. In fact, the contamination brought by the effluents is probably diluted in the initial contamination and is consequently undetectable through biomarker measurement. The study of a biomarker set in caged sticklebacks has finally demonstrated their ability to discriminate sites suffering of anthropogenic pressures from different origins.

Finally, this study has demonstrated the possibility, effectiveness and relevance of using the active biomonitoring approach with adult three-spined stickleback. Even if there is a low effect of WWTP effluents measured, the deployed tools have efficiently helped to discriminate the studied sites from the reference but also amongst themselves. This multivariate analysis has enabled us to clearly identify the impacted physiological functions in each site. Active biomonitoring has demonstrated an important efficiency in distinguishing environmental sites. It could be considered a promising tool to assess the quality of water and it can highlight the effect of contamination on fish physiology.

Supplementary data

Supp. data 1: Results of the comparisons between the stickleback's morphometric parameters at T0 and T21.
Statistical difference between T0 and T21 are expressed with letters following the Student or Wilcoxon tests ($\alpha = 5\%$).

	Standard length T0			Standard length T21			Weight T0			Weight T21			Fulton's condition index T0			Fulton's condition index T21				
	Mean	±	Sd	Mean	±	Sd	Mean	±	Sd	Mean	±	Sd	Mean	±	Sd	Mean	±	Sd		
Avesnes Upstream 1	4.23	±	0.34	4.28	±	0.30	0.96	±	0.19	0.90	±	0.18	1.26	±	0.15	b	1.14	±	0.13	a
Avesnes Upstream 2	4.40	±	0.42	4.46	±	0.40	1.13	±	0.32	1.09	±	0.26	1.30	±	0.16		1.21	±	0.18	
Avesnes Downstream 1	4.39	±	0.36	4.51	±	0.35	1.13	±	0.30	1.11	±	0.27	1.31	±	0.14	b	1.18	±	0.11	a
Avesnes Downstream 2	4.29	±	0.41	4.34	±	0.40	1.07	±	0.31	0.97	±	0.27	1.33	±	0.14	b	1.16	±	0.08	a
Bouillon Upstream 1	4.29	±	0.40	4.26	±	0.41	1.02	±	0.30	0.92	±	0.29	1.26	±	0.12	b	1.16	±	0.10	a
Bouillon Upstream 2	4.53	±	0.33	4.44	±	0.30	1.22	±	0.25	1.08	±	0.21	1.31	±	0.14		1.23	±	0.21	
Bouillon Downstream 1	4.49	±	0.46	4.47	±	0.45	1.15	±	0.36	1.14	±	0.32	1.24	±	0.12		1.25	±	0.10	
Bouillon Downstream 2	4.29	±	0.39	4.34	±	0.36	1.01	±	0.26	1.08	±	0.36	1.26	±	0.15		1.28	±	0.20	
Charleville Upstream 1	4.17	±	0.61	4.16	±	0.55	1.01	±	0.44	0.98	±	0.44	1.34	±	0.21		1.29	±	0.12	
Charleville Upstream 2	4.25	±	0.60	4.23	±	0.56	1.02	±	0.39	0.95	±	0.35	1.29	±	0.15		1.22	±	0.16	
Charleville Downstream 1	4.62	±	0.57	4.57	±	0.52	1.29	±	0.40	1.14	±	0.33	1.28	±	0.14	b	1.17	±	0.09	a
Charleville Downstream 2	4.39	±	0.59	4.34	±	0.57	1.15	±	0.39	1.04	±	0.34	1.31	±	0.13		1.23	±	0.13	
Namur Upstream 1	4.36	±	0.51	4.39	±	0.53	1.11	±	0.41	1.00	±	0.38	1.28	±	0.12	b	1.13	±	0.11	a
Namur upstream 2	4.35	±	0.61	4.50	±	0.59	1.19	±	0.50	1.12	±	0.45	1.36	±	0.13	b	1.19	±	0.23	a
Namur Downstream 1	4.29	±	0.34	4.33	±	0.28	1.01	±	0.24	0.98	±	0.19	1.27	±	0.12		1.20	±	0.11	
Namur Downstream 2	4.35	±	0.57	4.42	±	0.51	1.14	±	0.48	1.07	±	0.44	1.33	±	0.09	b	1.19	±	0.11	a

Supp. data 2: Description to the clusters obtained with AHC analysis according to the biomarker responses of each biomarker.

K: Fulton condition index; HSI: Hepatosomatic index; Leuc.: leucocyte; Phago.: Phagocytosis; ROS B: Basal oxidative activity; ROS A: Active oxidative activity; Resp. burst index: Respiratory burst index; GSH: total glutathione; GPx: Glutathione peroxidase; CAT: Catalase; SOD: Superoxide dismutase; TBARS: Thiobarbituric acid reactive substances; EROD: 7-ethoxyresorufin-O-deethylase; GST: glutathione-S-transferase; AChE: Acetylcholinesterase; GSI: Gonadosomatic index; VTG: Vitellogenin; SPG: Spiggin.

Cluster	Biomarker	v.test	Mean in category	Overall mean	Sd in category	Overall sd	p.value
1	VTG	15.5	61708.2	1636.8	2701.6	5504.2	6.0E-54
	Granulocyte among leucocytes	2.4	64.4	39.0	4.2	15.1	1.7E-02
2	Leuc. Mortality	-2.0	11.1	14.3	6.6	14.1	4.4E-02
	GSI	-2.4	1.5	2.1	0.9	2.4	1.5E-02
	EROD	-3.6	1.0	1.4	0.6	1.2	2.7E-04
	Resp. burst index	-3.8	1.2	4.5	1.8	7.9	1.4E-04
	GPx	-4.7	19.0	26.3	8.9	14.1	2.7E-06
	AChE	-4.8	24.9	35.5	14.8	20.0	1.8E-06
	GSH	-5.0	3.3	5.7	2.5	4.4	4.6E-07
	TBARS	-5.1	24.3	33.2	10.7	15.7	3.0E-07
	CAT	-5.3	100.9	133.6	39.1	55.1	9.1E-08
	HSI	-5.9	2.1	2.8	0.8	1.1	4.2E-09
	GST	-8.2	4283.8	6650.2	1767.3	2592.0	1.9E-16
SOD	-9.6	1824.4	3923.4	1232.4	1977.2	1.1E-21	
3	Leuc. Mortality	9.0	30.3	14.3	19.9	14.1	3.4E-19
	CAT	5.7	173675.0	133587.8	64374.7	55077.6	1.1E-08
	K	-2.9	1.2	1.2	0.1	0.1	3.4E-03
	SI	-3.4	1.1	4.5	1.0	7.9	6.2E-04
	Phago. Efficiency	-3.9	22.7	28.0	7.8	10.7	9.9E-05
	Granulocyte among leucocytes	-6.2	27.1	39.0	10.6	15.1	6.9E-10
4	Granulocyte among leucocytes	8.9	55.5	39.0	9.6	15.1	6.8E-19
	TBARS	7.5	47.6	33.2	17.7	15.7	8.4E-14
	SOD	6.4	5469.6	3923.4	1800.0	1977.2	1.9E-10
	SPG	4.8	2.2	1.8	1.0	0.7	1.9E-06
	GST	3.4	7723.2	6650.2	1901.6	2592.0	7.4E-04
	GSH	3.2	7.5	5.7	3.5	4.4	1.4E-03
	GPx	2.9	31.3	26.3	13.4	14.1	4.2E-03
	Resp. burst index	-2.8	1.8	4.5	1.0	7.9	4.4E-03
	EROD	-3.8	0.9	1.4	0.8	1.2	1.5E-04
	Leuc. Mortality	-4.1	7.3	14.3	4.7	14.1	4.9E-05
Phago. Efficiency	-5.2	21.1	28.0	8.0	10.7	1.6E-07	

Cluster	Biomarker	v.test	Mean in category	Overall mean	Sd in category	Overall sd	p.value
5	Resp. burst index	12.7	18.9	4.5	9.6	7.9	1.1E-36
	EROD	5.0	2.3	1.4	1.2	1.2	6.4E-07
	Phago. Efficiency	4.9	35.5	28.0	9.4	10.7	1.0E-06
	SOD	3.3	4867.2	3923.4	873.2	1977.2	8.8E-04
	GST	2.9	7725.4	6650.2	1774.3	2592.0	3.9E-03
	GSH	2.4	7.3	5.7	3.5	4.4	1.5E-02
	K	-2.1	1.2	1.2	0.1	0.1	3.3E-02
	AChE	-2.9	27.1	35.5	9.4	20.0	3.6E-03
	Granulocyte among leucocytes	-3.0	32.5	39.0	12.4	15.1	2.9E-03
6	AChE	11.1	72.9	35.5	16.9	20.0	1.1E-28
	HSI	8.7	4.4	2.8	1.0	1.1	4.6E-18
	GST	4.6	8653.8	6650.2	2847.7	2592.0	4.7E-06
	Phago. Efficiency	4.3	35.6	28.0	9.2	10.7	2.0E-05
	CAT	4.0	170.5	133.6	59.1	55.1	7.1E-05
	K	3.6	1.3	1.2	0.1	0.1	2.8E-04
	GSI	-2.1	1.3	2.1	0.3	2.4	3.6E-02
	Resp. burst index	-2.8	0.8	4.5	0.2	7.9	5.7E-03
	SPG	-3.0	1.5	1.8	0.4	0.7	2.7E-03
	Leuc. Mortality	-3.2	6.7	14.3	3.5	14.1	1.3E-03
7	GSH	-4.6	2.3	5.7	3.9	4.4	3.4E-06
	GSI	13.2	9.0	2.1	4.0	2.4	5.2E-40
	GPx	7.7	49.9	26.3	16.2	14.1	9.6E-15
	GSH	5.2	10.6	5.7	5.7	4.4	2.1E-07
	Phago. Efficiency	2.8	34.3	28.0	13.1	10.7	5.8E-03
	K	2.5	1.3	1.2	0.2	0.1	1.4E-02
	SPG	-2.5	1.4	1.8	0.7	0.7	1.2E-02
	GST	-3.4	4734.8	6650.2	1569.9	2592.0	6.0E-04

References

- Ahmed, S.A., 2000. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology* 150, 191–206. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(00\)00259-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(00)00259-6)
- 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. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(92\)90036-M](https://doi.org/10.1016/0166-445X(92)90036-M)
- Bado-Nilles, A., Jolly, S., Porcher, J.-M., Palluel, O., Geffard, A., Gagnaire, B., Betoulle, S., Sanchez, W., 2014. Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus* sp. *Environmental Pollution* 184, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.07.049>
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47, 650–660. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>
- Blanco, M., Rizzi, J., Fernandes, D., Colin, N., Maceda-Veiga, A., Porte, C., 2019. Assessing the impact of waste water effluents on native fish species from a semi-arid region, NE Spain. *Sci. Total Environ.* 654, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.115>
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., Lee, L.E.J., 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25, 853–873. [https://doi.org/10.1016/S0145-305X\(01\)00040-4](https://doi.org/10.1016/S0145-305X(01)00040-4)
- Cappello, T., Maisano, M., D'Agata, A., Natalotto, A., Mauceri, A., Fasulo, S., 2013. Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar. Environ. Res.* 91, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.12.010>
- Catteau, A., Le Guernic, A., Marchand, A., Hani, Y.M.I., Palluel, O., Turiès, C., Bado-Nilles, A., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., Porcher, J.-M., 2019. Impact of confinement and food access restriction on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) during caging: a multi-biomarker approach. *Fish Physiol Biochem.* <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00670-1>
- Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M.J., 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators* 38, 104–112. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.10.029>
- Conti, M.E., Cecchetti, G., 2001. Biological monitoring: lichens as bioindicators of air pollution assessment — a review. *Environmental Pollution* 114, 471–492. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(00\)00224-4](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00224-4)
- Dalzochio, T., Gehlen, G., 2016. Confounding factors in biomonitoring using fish. *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 11, 53–61. <https://doi.org/10.5132/eec.2016.01.08>
- Dalzochio, T., Rodrigues, G.Z.P., Petry, I.E., Gehlen, G., da Silva, L.B., 2016. The use of biomarkers to assess the health of aquatic ecosystems in Brazil: a review. *Int Aquat Res* 8, 283–298. <https://doi.org/10.1007/s40071-016-0147-9>
- De Kermoyan, G., Pery, A., Porcher, J.-M., Beaudouin, R., 2013. A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions. *Mathematical Biosciences* 244, 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2013.05.001>
- Dey, S., Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Kole, D., Ghosh, A.R., 2016. Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). *Emerging Contaminants* 2, 191–203. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.12.002>

- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres jr., V., Featherstone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology* 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Flammarion, P., Migeon, B., Garric, J., 1998. Statistical analysis of cyprinid ethoxyresorufin-O-deethylase data in a large French watershed. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 144–153. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1655>
- Flammarion, P., Noury, P., Garric, J., 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution* 120, 325–330. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00137-9](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00137-9)
- Fulton, M.H., Key, P.B., 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 37–45. <https://doi.org/10.1002/etc.5620200104>
- Fulton, T.W., 1902. *Rate of Growth of Sea Fishes*. Neill & Company.
- Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., Depledge, M.H., 2004. A Multibiomarker Approach To Environmental Assessment. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1723–1731. <https://doi.org/10.1021/es030570+>
- Garric, J., Vollat, B., Nguyen, D.K., Bray, M., Migeon, B., Kosmala, A., 1996. Ecotoxicological and chemical characterization of municipal wastewater treatment plant effluents. *Water Science and Technology, Hazard Assessment and Control of Environmental Contaminants in Water* 33, 83–91. [https://doi.org/10.1016/0273-1223\(96\)00272-7](https://doi.org/10.1016/0273-1223(96)00272-7)
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249, 7130–7139.
- Hinck, J.E., Schmitt, C.J., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Bartish, T.M., Anderson, P.J., Coyle, J.J., Dethloff, G.M., Tillitt, D.E., 2006. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Columbia River and its tributaries: Spatial and temporal trends. *Science of The Total Environment* 366, 549–578. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.11.008>
- Hoeger, B., Hitzfeld, B., Köllner, B., Dietrich, D.R., van den Heuvel, M.R., 2005. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aquat. Toxicol.* 73, 79–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.004>
- Husson, F., Josse, J., Pages, J., 2010. Principal component methods - hierarchical clustering - partitional clustering: why would we need to choose for visualizing data?
- Jasinska, E.J., Goss, G.G., Gillis, P.L., Van Der Kraak, G.J., Matsumoto, J., de Souza Machado, A.A., Giacomini, M., Moon, T.W., Massarsky, A., Gagné, F., Servos, M.R., Wilson, J., Sultana, T., Metcalfe, C.D., 2015. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Science of The Total Environment* 530–531, 140–153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.080>
- Kakuta, I., 1997. Effect of sewage on blood parameters and the resistance against bacterial infection of goldfish, *Carassius auratus*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12, 43–51. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2256\(1997\)12:1<43::AID-TOX7>3.0.CO;2-8](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:1<43::AID-TOX7>3.0.CO;2-8)
- Katsiadaki, I., Scott, A.P., Mayer, I., 2002. The potential of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a combined biomarker for oestrogens and androgens in European waters. *Marine Environmental Research* 54, 725–728. [https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(02\)00110-1](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(02)00110-1)
- Kim, W.-K., Jung, J., 2016. In situ impact assessment of wastewater effluents by integrating multi-level biomarker responses in the pale chub (*Zacco platypus*). *Ecotox. Environ. Safe.* 128, 246–251. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.02.028>

- Kosmala, A., Migeon, B., Flammarion, P., Garric, J., 1998. Impact Assessment of a Wastewater Treatment Plant Effluent Using the Fish Biomarker Ethoxyresorufin-O-Deethylase: Field and On-Site Experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41, 19–28. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1662>
- Kroon, F., Streten, C., Harries, S., 2017. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PLoS one* 12, e0174762.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E., Förlin, L., 1999. Ethinylloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* 45, 91–97. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00112-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00112-X)
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Bado-Nilles, A., Palluel, O., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Delahaut, L., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.-M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016a. In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). *Ecotoxicology* 25, 1234–1259. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1677-z>
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Floriani, M., Turies, C., Chadili, E., Vedova, C.D., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.-M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016b. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25, 1478–1499. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1699-6>
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.-M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016c. In situ experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 42, 643–657. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0166-2>
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C., 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment* 473–474, 619–641. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.12.065>
- McGovarin, S., Sultana, T., Metcalfe, C., 2018. Biological Responses in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) Caged Downstream from Municipal Wastewater Treatment Plants in the Credit River, ON, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100, 106–111. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2242-z>
- Ménard, L., Escarné, R., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Fournier, M., Gagné, F., 2010. The impacts of urban pollution on the immune system of spottail shiners. *Fresenius Environmental Bulletin* 19, 1369–1374.
- Morrow, M.D., Higgs, D., Kennedy, C.J., 2004. The effects of diet composition and ration on biotransformation enzymes and stress parameters in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 137, 143–154. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2004.01.001>
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95, 351–358. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)
- Oikari, A., 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 78, 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.010>
- Paglia, D.E., Valentine, W.N., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.* 70, 158–169.
- Palas, S., Hyungjoon, I., Yoo, J., Hwanggoo, L., Nan-Young, K., Wonky, K., Soon-Jin, H., Woo-Keun, K., Jinho, J., 2018. Comparative assessment of the adverse outcome of wastewater effluents by

- integrating oxidative stress and histopathological alterations in endemic fish. *J. Hazard. Mater.* 344, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.10.016>
- 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(86\)90026-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6)
- Peakall, D.B., Walker, C.H., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (3). *Vertebrates. Ecotoxicology* 3, 173–179. <https://doi.org/10.1007/BF00117082>
- Pérez, M.R., Rossi, A.S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carrquiriborde, P., Cazenave, J., 2018. In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators* 84, 345–353. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.09.004>
- Pottinger, T.G., Carrick, T.R., Yeomans, W.E., 2002. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish Biology* 61, 207–229. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2002.tb01747.x>
- Salo, H., Hebert, N., Dautremepuits, C., Cejka, P., Cyr, D., Fournier, M., 2007. Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 84, 406–414. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.06.014>
- Sanchez, W., Burgeot, T., Porcher, J.-M., 2013. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. *Environ Sci Pollut Res* 20, 2721–2725. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1359-1>
- Sanchez, W., Goin, C., Brion, F., Olsson, P.E., Goksøyr, A., Porcher, J.M., 2008a. A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2007.08.007>
- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditché, J.-M., Porcher, J.-M., 2008b. 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. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.11.003>
- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditché, J.-M., Porcher, J.-M., 2008c. 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. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2007.11.003>
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 177–183. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2004.07.003>
- Sanchez, W., Piccini, B., Porcher, J.-M., 2008d. Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 43, 65–70. <https://doi.org/10.1080/03601230701735151>
- Scarcia, P., Calamante, G., de la Torre, F., 2012. Responses of biomarkers of a standardized (*Cyprinus carpio*) and a native (*Pimelodella laticeps*) fish species after in situ exposure in a periurban zone of Lujan river (Argentina). *Environ. Toxicol.* 29, 545–557. <https://doi.org/10.1002/tox.21780>
- Slooff, W., Van Kreijl, C.F., Baars, A.J., 1983. Relative liver weights and xenobiotic-metabolizing enzymes of fish from polluted surface waters in the Netherlands. *Aquatic Toxicology* 4, 1–14. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(83\)90057-7](https://doi.org/10.1016/0166-445X(83)90057-7)

- Stepić, S., Hackenberger, B.K., Hackenberger, D.K., Velki, M., Lončarić, Ž., 2012. Impact of Oxidative Stress Indicated by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Protein Carbonyl Levels (PC) on Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) Induction in Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Water, Air, & Soil Pollution* 223, 4785–4793. <https://doi.org/10.1007/s11270-012-1234-1>
- Sturve, J., Hultman, M.T., Wassmur, B., Almroth, B.C., 2017. Determining oxidative stress and EROD activity in dab (*Limanda limanda*) in the North and Baltic Seas. *Marine Environmental Research* 124, 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2016.10.008>
- 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 Biol Toxicol* 10, 415–421. <https://doi.org/10.1007/BF00755791>
- Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30, 347–570. <https://doi.org/10.1080/10408440091159239>
- Wootton, R.J., 1984. *A Functional Biology of Sticklebacks*. University of California Press.
- Zeyl, J.N., Love, O.P., Higgs, D.M., 2014. Evaluating gonadosomatic index as an estimator of reproductive condition in the invasive round goby, *Neogobius melanostomus*. *Journal of Great Lakes Research* 40, 164–171. <https://doi.org/10.1016/j.jglr.2013.12.004>

CHAPITRE 4 : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES



Le besoin d'indicateurs précoces et prédictifs d'effets sur les écosystèmes a favorisé le développement de nombreux biomarqueurs. Ces biomarqueurs ont d'abord été largement utilisés dans le cadre de programmes de biosurveillance passive, consistant à mesurer ces paramètres physiologiques chez des organismes prélevés directement dans les milieux d'intérêts. Cependant, certaines limites ont rapidement émergé. La mobilité des espèces (migration, fuite) et l'incertitude qu'elle engendre concernant les conditions d'exposition (durée, stade de vie) figurent parmi les limites le plus souvent évoquées. Associée à cela, la mise en place de mécanismes d'adaptation en cas d'exposition chronique est susceptible de masquer les effets d'une contamination sur les réponses physiologiques. Enfin, l'absence naturelle ou la disparition liée à une pollution de l'espèce modèle sur les sites d'études est également un facteur limitant pour l'utilisation de cette approche. Ainsi, la biosurveillance active, à savoir l'encagement d'individus provenant d'un élevage sur un site d'intérêt, s'est développée dans un second temps pour s'affranchir des limites associées à l'approche passive.

Cette transition de l'approche passive vers l'approche active est particulièrement intéressante chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). En effet, cette espèce classiquement utilisée dans des études comportementales a démontré par le passé tout son intérêt en écotoxicologie pour évaluer la contamination de différents sites à travers des approches en biosurveillance passive (Sanchez et al. 2007, 2008b; Santos et al. 2016). Cependant, malgré l'ubiquité théorique de cette espèce modèle, ses préférences en terme de conditions de vie (faible courant, faible profondeur, herbiers) la rendent assez spécifique des petits cours d'eau ce qui limite son utilisation pour l'évaluation d'autres types de milieux (lacustres, grandes rivières). La biosurveillance active permet de s'affranchir de ces limitations géographiques car l'épinoche peut être transplantée dans un milieu où elle est normalement absente. L'encagement permet aussi d'utiliser des épinoches élevées et maintenues en laboratoire et ainsi de limiter les impacts de la pêche sur des populations déjà fragilisées. De plus, la possibilité d'une part, de travailler sur une souche génétiquement définie et stable, et d'autre part, de standardiser certains paramètres comme la taille, le sexe ou l'âge des individus, permet de diminuer la variabilité naturelle des réponses et d'augmenter ainsi la sensibilité de la méthode. Cette thèse avait donc pour objectif d'évaluer la faisabilité et la pertinence de l'approche de biosurveillance active avec l'épinoche à trois épines comme espèce modèle.

1. L'ENCAGEMENT : UNE TECHNIQUE MAITRISEE AVEC L'ÉPINOCHÉ A TROIS ÉPINES

L'encagement, en particulier chez les poissons, est connu pour générer un stress chez les organismes pouvant induire une modification des réponses physiologiques mesurées, indépendamment de toute contamination chimique du milieu dans lequel ils sont exposés (Oikari 2006; Brydges et al. 2009; Trevisan et al. 2013; Vargas-Chacoff et al. 2014; Andrade et al. 2015). Ces facteurs confondants peuvent compliquer l'interprétation finale des réponses et conduire à des biais dans les conclusions des études. Ceci souligne la nécessité de caractériser les effets de ces différents facteurs confondants sur les niveaux des biomarqueurs chez l'épinoche en amont des études sur le terrain, dans l'objectif de se placer dans des conditions qui limitent au maximum leurs impacts sur les réponses mesurées. Ce travail avait été initié précédemment par Le Guernic et al. (2016b) qui s'étaient intéressés aux effets (i) de la densité d'épinoches par cage et (ii) du transport avant dissection sur les niveaux des biomarqueurs après 14 jours d'encagement. Il a ainsi été montré qu'une densité d'individus trop importante (supérieure à 2,31 g/L) augmentait significativement la mortalité leucocytaire ainsi que la flambée oxydative des épinoches. De plus, le transport des individus avant dissection induisait un stress oxydant important (taux d'ERO basal, GSH, CAT, TBARS). Ce travail de caractérisation des facteurs de stress liés à l'encagement s'est poursuivi dans la présente thèse, où les effets de la restriction d'accès à la nourriture, du confinement seul mais également de la saison d'encagement ont été évalués après 21 jours d'encagement (Article 1). Les résultats ont mis en évidence que le confinement seul n'induisait pas de modification des niveaux des biomarqueurs, quelle que soit la saison. En revanche, des effets de la restriction d'accès alimentaire ont été mesurés, avec une diminution des activités EROD, SOD, et amylase ainsi que du contenu en GSH en automne. Au printemps, en plus de ces observations, une diminution de l'état général des individus a été constatée avec une diminution du poids, de l'indice de condition de Fulton et de l'indice hépatosomatique. Ces effets nettement plus marqués au printemps sont à mettre en relation avec la demande énergétique des individus qui est plus importante à cette saison, durant laquelle les épinoches sont en période de reproduction (Wootton 1976).

Ainsi, l'ensemble de ces travaux de caractérisation des facteurs de stress liés à l'encagement a permis de formuler des recommandations pour le déploiement de l'approche active avec l'épinoche à trois épines. Les études doivent ainsi s'effectuer préférentiellement **en dehors de la période de reproduction**, à une **densité maximale de 2,31g/L**. Dans ces conditions, l'apport de **nourriture extérieure n'est pas indispensable** au maintien de l'ensemble des fonctions étudiées. En outre, l'amélioration des cages, et en particulier l'élargissement du

maillage, facilite le passage des aliments et ainsi réduit au minimum la compétition pour l'accès à la nourriture. Le **transport des individus au laboratoire avant dissection doit être limité au maximum**, et les dissections doivent s'effectuer au plus près du site d'étude afin de limiter les impacts physiologiques, en particulier sur les paramètres liés au stress oxydant.

Associé à ces travaux de caractérisation de facteurs confondants liés à la technique elle-même, il est apparu essentiel de calibrer certains facteurs très connus pour induire de fortes variations sur les niveaux des biomarqueurs comme la taille et le sexe des individus. Ainsi, la taille des épinoches utilisées en biosurveillance active a été fixée entre 38 et 50mm et un sexe-ratio équilibré a été privilégié, afin de limiter les biais liés à un déséquilibre du nombre de mâles et de femelles entre les sites. La détermination du sexe en amont des études peut être effectuée à l'aide d'une méthode non invasive basée sur la morphologie de la tête (De Kermoyan et al. 2013). En raison du stress généré par cette technique (maintien des poissons quelques secondes à l'air libre, éclairage très intense, isolement des individus le temps de l'analyse), la détermination du sexe doit s'effectuer au moins une semaine avant le transport des poissons sur les sites d'étude, afin de leur permettre de récupérer du stress généré.

Toutes ces recommandations ont été appliquées durant l'ensemble des expérimentations *in situ* et ont permis la réalisation des différentes études dans de bonnes conditions. Les taux de survie des épinoches encagées ont été systématiquement supérieurs à 90%, et ce, même dans les grands milieux *a priori* peu adaptés à leur préférendum de vie (Namur, Charleville-Mézières). L'observation visuelle du contenu stomacal des épinoches après 21 jours d'encagement a mis en évidence un accès à la nourriture tout à fait satisfaisant, même lorsque les cages étaient positionnées dans la colonne d'eau, et plusieurs types d'aliments ont pu être identifiés (copépodes, chironomes, coquille de gastéropode, crustacés). Aucune perte de poids significative n'a pu être mise en évidence entre le début et la fin des encagements, ce qui confirme le bon état général des épinoches et valide les recommandations émises précédemment. La faisabilité de l'approche avec cette espèce modèle a donc pu être démontrée en milieu dulcicole.

L'épinoche est une espèce euryhaline, connue pour être très tolérante à une large gamme de salinité. Une des perspectives de ce travail pourrait être de valider la faisabilité de l'approche en milieux estuariens et marins afin de pouvoir utiliser l'épinoche comme espèce modèle le long d'un continuum eau douce – eau salée. Cette question va notamment être investiguée dans le cadre du programme SASHIMI (Surveillance active de l'impact de la pression chimique par des biomarqueurs) dont les principaux objectifs sont i) le développement d'une méthodologie active pour plusieurs espèces de groupes zoologiques différents et ii) la

définition chez les différentes espèces des valeurs basales et seuils pour les différents marqueurs ciblés.

2. L'APPROCHE MULTIBIOMARQUEURS CHEZ L'ÉPINOCHÉ

Dans le milieu naturel, les organismes sont exposés à une multitude de contaminants, susceptibles d'interagir entre eux et d'impacter des cibles différentes par des mécanismes d'action variés. En l'absence de connaissances sur le type de contamination rencontrée, le choix des biomarqueurs les plus pertinents dans un contexte donné, peut s'avérer difficile. L'utilisation d'une batterie de biomarqueurs représentatifs des grandes fonctions physiologiques permet de contourner cette difficulté et d'éviter, dans la mesure du possible, de passer à côté d'un effet non attendu. Ainsi, durant toutes les expérimentations de cette thèse, une batterie de biomarqueurs développés et mesurés en routine chez l'épinoche à trois épines a été utilisée. Cinq fonctions physiologiques majeures ont été prises en compte : **le système immunitaire inné** (à travers la mortalité et la distribution leucocytaire, l'activité de phagocytose, la flambée oxydative et la présence en lysosomes), **le système antioxydant** (enzymatique : catalase, GPx, SOD ; et non enzymatique : glutathion total) ainsi que les dommages oxydatifs aux membranes (TBARS), **la biotransformation** (l'EROD comme enzyme de phase I et la GST comme enzyme de phase II), **le système reproducteur** (à travers l'indice gonadosomatique, la concentration en vitellogénine chez les mâles et en spiggin chez les femelles) et **la transmission synaptique** (AChE).

2.1. Pertinence dans l'évaluation de la qualité des milieux en aval d'effluents de STEU

L'encagement d'épinoches a été déployé dans une problématique amont/aval, afin de caractériser les impacts d'effluents de station d'épuration des eaux usées (STEU) en aval des rejets. Dans ce contexte, le système immunitaire inné des épinoches a été la fonction physiologique la plus discriminante. Des modulations de ces paramètres ont en effet été presque systématiquement observées chez les épinoches encagées en aval des STEU par rapport à celles encagées en amont. Cette modulation s'est surtout traduite par une augmentation de la mortalité leucocytaire et une diminution de la capacité de phagocytose, ce qui indique une tendance des poissons à être immunodéprimés. Le système immunitaire est une fonction physiologique centrale qui détermine le maintien de l'intégrité des organismes. Cette fonction s'est avérée particulièrement sensible aux contaminants environnementaux. En effet, de nombreuses molécules organiques (HAP, PCB, pesticides) et inorganiques (arsenic, cadmium, cuivre, chrome) potentiellement retrouvées dans les effluents de STEU présentent

des effets immunotoxiques chez les poissons (Fournier et al. 2000; Bols et al. 2001; Reynaud and Deschaux 2006). Ces effets immunosuppresseurs peuvent, à long terme, induire une baisse de la résistance envers les infections ainsi qu'une augmentation de la susceptibilité à certains cancers. En plus de ces effets sur les biomarqueurs de l'immunité, l'activité EROD a également été régulièrement induite chez les épinoches encagées en aval des STEU (Sacy-le-Grand, Bouillon, Namur), même si le niveau d'induction varie d'un site à l'autre. L'activité enzymatique EROD est caractéristique de l'activité catalytique des cytochromes P450 1A (CYP 4501A), qui est le plus souvent induite en présence de xénobiotiques analogues structuraux de la dioxine. Ceux-ci se fixent sur les récepteurs aux hydrocarbures aromatiques (AhR), entraînant une cascade de réactions qui débouche sur la synthèse *de novo* de CYP4501A. L'induction de l'activité EROD avait déjà été mesurée chez des organismes encagés en aval d'effluents de STEU (Garric et al. 1996; Kosmala et al. 1998; Whatley 2010). Ainsi, ce biomarqueur historiquement utilisé comme un marqueur de contamination aux HAP, PCB et pesticides (Whyte et al. 2000), a démontré à nouveau tout son intérêt dans une approche multibiomarqueurs déployée en aval de STEU.

Les autres fonctions physiologiques ont été peu impactées chez les poissons encagés en aval des différents STEU. Contrairement à ce qui a souvent été mis en avant dans la littérature (Cazenave et al. 2014; Jasinska et al. 2015; McGovarin et al. 2018; Pérez et al. 2018), aucune induction des systèmes antioxydants n'a pu être mise en évidence chez les épinoches encagées en aval des différents rejets dans le cadre de cette thèse. Cette absence d'induction des systèmes antioxydants après 21 jours d'encagement peut être liée au caractère transitoire de ces biomarqueurs, qui répondent rapidement après le début de l'exposition à des stressseurs et qui reviennent à des niveaux de référence après quelques jours (Sanchez et al. 2005). Cependant, et quel que soit l'effluent considéré, aucune induction des dommages oxydatifs aux membranes n'a été observée chez les épinoches encagées en aval des STEU. L'ensemble de ces résultats suggère une absence de stress oxydatifs chez les épinoches en aval des rejets par rapport à l'amont, en tout cas après 21 jours d'encagement dans le panache de l'effluent.

Les effluents sont connus pour véhiculer des composés à effets perturbateurs endocriniens (Luo et al. 2014) et des inductions de VTG chez des poissons en aval des STEU ou exposés directement aux effluents ont été régulièrement reportées (Larsson et al. 1999; Kerr et al. 2008; McGovarin et al. 2018). Cependant, et contrairement à la littérature, aucune induction de la concentration en vitellogénine n'a pu être observée chez les épinoches encagées en aval des effluents dans les différentes expérimentations réalisées durant cette thèse. Cette absence d'induction en aval des rejets étudiés pourrait s'expliquer par (i) une présence faible en composés perturbateurs endocriniens, (ii) une forte dilution de ces molécules dans le milieu et

(iii) un temps d'encagement trop court pour permettre l'induction de la VTG chez les mâles. En effet, les composés considérés comme perturbateurs endocriniens peuvent induire des impacts de nature et d'intensité variables, via une multitude de mécanismes d'actions. Ainsi, même si 21 jours d'exposition à de l'éthinylestradiol suffisent à induire une production de VTG chez des épinoches adultes mâles (Andersson et al. 2007), ce n'est pas le cas de composés modérément oestrogéniques comme le nonylphénol (Sanchez et al. 2006). Il est donc possible que cette absence d'induction de la VTG chez les épinoches mâles encagées en aval des STEU soit due à un temps d'exposition trop court, qui ne permet pas de détecter la présence de composés faiblement oestrogéniques. De plus, les effluents de STEU sont connus pour présenter de fortes fluctuations dans leur composition chimique, ce qui inclue les composés perturbateurs endocriniens. Dans une étude chez le gardon, Rodgers-Gray et al. (2000) ont mis en évidence qu'une exposition de 30 et 60 jours à un effluent dilué (9,38% et 17,53%) ne permettait pas de détecter une induction de la production de VTG chez les mâles alors que cette induction pouvait être mesurée après 120 jours d'exposition. Ainsi, un allongement du temps d'encagement des épinoches pourrait permettre de mettre en évidence la présence de composés faiblement oestrogéniques.

2.2. Pertinence dans la discrimination des différents sites d'étude

Malgré le peu d'effets amont/aval mesurés, l'intérêt de la démarche a été mis en évidence au travers de sa capacité à discriminer les différents sites d'études du programme Interreg DIADeM. En particulier, une inhibition générale de l'activité acétylcholinestérase a été mesurée chez l'ensemble des poissons encagés par rapport aux niveaux mesurés dans la population d'origine, mettant en évidence une contamination globale de tous les sites à des composés inhibiteurs de cette enzyme, tels que des organophosphorés ou des carbamates (Sturm et al. 1999; Fulton and Key 2001). Les poissons encagés ont également présenté une diminution des capacités immunitaires par rapport à la référence, vraisemblablement liée à la contamination des milieux.

Outre cette distinction nette par rapport à la référence, la batterie de biomarqueurs a permis la discrimination des différentes rivières entre elles à travers les fonctions physiologiques impactées. Ainsi, les épinoches encagées à Bouillon dans la Semois ont présenté une diminution générale des capacités de défense (biotransformation et systèmes antioxydants) alors que les épinoches encagées à Avesnes-sur-Helpe dans l'Helpe Majeure ont présenté une forte induction du système immunitaire, essentiellement mesurée à travers une induction de la flambée oxydative, caractéristique de la digestion oxygène dépendante lors de la phagocytose. Sans analyses chimiques, il est impossible de conclure quant aux molécules responsables de ces modulations, mais ces deux rivières se distinguent par leur type de

contamination qui est plutôt de type agricole sur l'Helpe majeure alors que la Semois subit une pression anthropique importante liée aux activités touristiques. Les deux sites sur la Meuse (Namur et Charleville-Mézières), distants d'environ 80km, ont également été bien discriminés entre eux. Les épinoches engagées sur le site de Charleville-Mézières présentaient un stress oxydant important alors que les individus engagés à Namur présentaient une inhibition générale du système immunitaire inné. Le stress oxydant mesuré à Charleville-Mézières pourrait provenir d'une contamination urbaine induite par Verdun et Sedan, deux villes traversées par la Meuse en amont du site d'étude. Les observations différentes à Namur étaient potentiellement liées à un apport de contaminants par la Sambre, un affluent majeur de la Meuse dont la confluence se trouve un peu en amont du site d'étude. Ainsi, la batterie de biomarqueurs développée chez l'épinoche à trois épines a démontré son intérêt dans la discrimination de sites géographiquement éloignées. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de cette approche dans d'autres programmes à plus large échelle.

2.3. Une batterie de biomarqueurs à compléter

L'intérêt de l'actuelle batterie de biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines a été largement démontré lors de l'ensemble des études *in situ*. Cependant, afin de la rendre plus exhaustive et de permettre une meilleure caractérisation de l'état de santé des individus, certaines fonctions mériteraient de venir compléter la batterie déjà existante. En particulier, le métabolisme énergétique constitue une fonction physiologique souvent étudiée en écotoxicologie mais actuellement non intégrée dans l'approche multibiomarqueurs. Pourtant, ces paramètres peuvent être indicateurs d'effets toxiques chez les organismes alors même que les niveaux des autres biomarqueurs ne sont pas affectés. Les travaux menés par Kerambrun et al. (2012) illustrent parfaitement cette idée. Des juvéniles de bar commun (*Dicentrarchus labrax*) ont été exposés à différentes concentrations de pétrole issu d'une marée noire pendant une période de 48 à 96h, suivi d'une période de dépuración de 4 semaines. A l'issue de ces 4 semaines, les auteurs ont mis en évidence une diminution du taux de croissance, de l'indice de condition et du ratio ARN/ADN alors que les niveaux des biomarqueurs associés à d'autres fonctions physiologiques étaient revenus aux niveaux des témoins. Cet exemple illustre l'importance de la répartition de l'énergie, qui est nécessaire au maintien des organismes mais également à leur croissance et à leur reproduction. Si trop d'énergie est allouée à la maintenance, l'énergie disponible pour la croissance et la reproduction sera réduite et des effets directs sur les populations pourraient être observés. Ainsi, les marqueurs associés à cette fonction présentent potentiellement une grande pertinence écologique. Dans le cadre de la thèse de Younes Hani (2018), les enzymes digestives (amylase, phosphatase alcaline et trypsine) ont été développées et proposées

comme biomarqueurs de l'état de santé des épinoches. Ces paramètres ont montré leur intérêt lors d'études en conditions contrôlées en laboratoire. Cependant, ces enzymes sont fortement influencées par la quantité et le type de nourriture ingérée par les individus (composition des aliments) (Chakrabarti et al. 1995; Zambonino and Cahu 1994; Hidalgo et al. 1999). Même s'il a été démontré dans l'article 1 qu'en conditions contrôlées, la quantité de nourriture affectait peu les enzymes digestives de l'épinoche (même en automne ou seule l'amylase a été modulée), il est impossible de déterminer précisément le type d'aliment présent sur les différents sites lors d'études *in situ*. Ce lien direct entre la qualité des aliments disponibles sur les différents sites et l'activité des enzymes digestives, indépendamment de la contamination chimique, est une limite majeure à leur utilisation en biosurveillance. D'autres marqueurs associés au métabolisme énergétique existent cependant, plus en aval du processus d'acquisition de l'énergie et mériteraient d'être investigués (métabolisme des glucides, enzymes impliquées dans le fonctionnement du cycle de Krebs ou dans la respiration mitochondriale).

En plus du métabolisme énergétique, d'autres paramètres régulièrement utilisés en biosurveillance comme les biomarqueurs de génotoxicité sont absents de la batterie. En effet, concernant les dommages liés au stress oxydant, seuls les dommages oxydatifs aux membranes sont actuellement pris en compte. Or, les espèces réactives de l'oxygène peuvent également induire des effets à des niveaux d'organisation inférieurs. Au-delà d'une génotoxicité induite par un stress oxydatif, d'autres molécules à effet clastogènes existent (substances radioactives, benzène, certains pesticides). Il pourrait ainsi être intéressant d'inclure des paramètres associés aux dommages à l'ADN qui seraient complémentaires de la batterie déjà existante (cassures des brins d'ADN, oxydation de bases). Le développement et la validation *in situ* de marqueurs de génotoxicité constituera le cœur de la thèse d'Amélie Cant qui a débutée en octobre 2019. La batterie de biomarqueurs pourrait également être ponctuellement accompagnée de marqueurs plus spécifiques à certains types de contaminants (i.e. métallothionéines, protéines de choc thermique, activité des cytochromes P450 3A4) lorsque l'approche est utilisée pour déterminer des impacts d'une contamination bien identifiée.

Enfin en plus de compléter la batterie d'un point de vue des fonctions physiologiques étudiées, des questions se posent également sur les biomarqueurs mesurés pour décrire les fonctions déjà investiguées, en particulier les paramètres liés à la perturbation endocrinienne. Les mesures de vitellogénine chez les mâles et de spiggin chez les femelles permettent de mettre en évidence des molécules à effets oestrogéniques et androgéniques respectivement mais l'ensemble des mécanismes d'action des perturbateurs endocriniens ne peut pas être résumé par ces deux seuls paramètres. De nombreux mécanismes sont en effet susceptibles d'être

impactés, via par exemples, des interactions entre les xénobiotiques et les récepteurs hormonaux ou encore des altérations de la synthèse et du métabolisme des hormones. La recherche de biomarqueurs caractéristiques de ces mécanismes est un enjeu important pour la biosurveillance, et une des clés réside peut-être dans le développement des techniques de génomique et transcriptomique pour cibler de nouveaux paramètres à intégrer dans la batterie.

3. L'IBR COMME OUTIL DE SYNTHÈSE DES RESULTATS

L'approche déployée permet de visualiser l'état physiologique des individus exposés et d'indiquer une éventuelle contamination des sites étudiés. Cependant, la quantité de données ainsi générée rend difficile l'interprétation de l'ensemble des résultats. L'agrégation de toutes les données au sein d'un seul indice permet d'envisager leur utilisation dans un objectif de gestion de l'environnement. Ainsi, dans le cadre de ce travail, c'est l'IBR (Integrated biomarker response) modifiée par Sanchez et al. (2013) qui a été utilisé. Cet indicateur est composé de deux éléments : une valeur chiffrée qui traduit la distance par rapport à une référence et qui permet de classer les différents sites entre eux et une représentation graphique qui permet de visualiser les effets biologiques. Ce mode de représentation permet de comparer les sites entre eux selon l'intensité et le type de fonction physiologique modulé.

Lors de l'utilisation de cet indice, une problématique concernant les biomarqueurs à intégrer dans le calcul a émergé. En effet, certains biomarqueurs mesurés dans la batterie sont très corrélés entre eux d'un point de vue mécanistique et donnent des informations très similaires qui répondent souvent dans le même sens. Or, l'utilisation de paramètres redondants peut induire un biais dans le résultat final, en donnant un poids trop important à une fonction ou un mécanisme spécifique par rapport aux autres. Le choix a donc été fait de limiter au maximum les redondances dans les biomarqueurs utilisés pour le calcul des indices. Par exemple, la capacité et l'efficacité de phagocytose indiquent respectivement la capacité d'adhésion et la capacité d'internalisation des éléments étrangers au niveau des cellules phagocytaires. Ces deux paramètres sont la plupart du temps modulés de la même façon. Ainsi, dans le calcul de l'IBR, seul l'efficacité d'internalisation a été prise en compte. Dans le même objectif, l'apoptose et la nécrose leucocytaire sont deux indicateurs de la mortalité leucocytaire même si les mécanismes sous jacents sont différents. Ces deux biomarqueurs ont donc été additionnés pour former un nouveaux paramètre appelé « mortalité leucocytaire ».

Lors de l'évaluation de l'efficacité de la zone humide tampon (ZHT) à Sacy-le-Grand, de nombreux biomarqueurs dont les réponses étaient très fortement modulées par l'effluent de STEU, avaient retrouvés des niveaux identiques à la référence chez les épinoches encagées en sortie du lagunage. Ces résultats se reflètent dans les IBR calculés, avec une note globale

qui passe de 25,2 en entrée de ZHT à 17,4 en sortie, ce qui montre l'amélioration de la qualité de l'eau. Lors de la campagne d'encagement en amont et en aval des STEU sur la Meuse, les faibles différences dans les niveaux de biomarqueurs entre l'amont et l'aval se retrouvent dans les résultats des différents IBR avec une faible différence dans la note globale attribuée à l'amont et l'aval des différents sites. Ainsi, pour les deux expérimentations *in situ*, les résultats chiffrés des IBR semblent refléter assez justement les réponses physiologiques obtenues chez les épinoches. Un point d'attention doit toutefois être souligné concernant la représentation graphique de la déviation par rapport à la référence des biomarqueurs. En effet, certains biomarqueurs peuvent présenter un indice de déviation élevé (visible à travers une déviation importante de la ligne de base sur le graphique) sans pour autant que la différence entre le site considéré et la référence soit statistiquement significative. Cette représentation qui peut paraître trompeuse et induire des biais de compréhension des résultats est liée à la méthode de calcul de l'IBR, qui se base sur la moyenne des niveaux des biomarqueurs des individus sur le site. La méthode de calcul gomme ainsi la variabilité de réponse interindividuelle qui n'est pas prise en compte sur la représentation graphique de l'IBR. Cet indice biomarqueur reste cependant un précieux outil de synthèse permettant le classement des sites sur la base d'un large panel de réponses physiologiques.

Le nombre et le type de biomarqueurs utilisés dans le calcul de l'IBR est également un élément important à prendre en compte. Lors de l'utilisation de l'IBR dans le cadre de cette thèse, 18 biomarqueurs ont été pris en compte, ce qui est beaucoup par rapport au développement initial de la méthode qui n'en incluait que 8 (Sanchez et al. 2013). Or, plus il y a de paramètres, moins le poids de chacun d'entre eux dans l'indice final est important. Une forte modulation d'un ou deux paramètres sur un site n'aura alors que peu d'importance sur l'indice final calculé. Parallèlement au nombre global de paramètres, le nombre de biomarqueurs pris en compte dans chaque fonction physiologique est également un élément clé du résultat final. Plus le nombre de biomarqueurs dans une fonction est important, plus cette fonction aura de poids dans l'IBR. En particulier, si un site présente une contamination qui impacte majoritairement un type de fonction dont le nombre de biomarqueurs est important (i.e. stress oxydant, système immunitaire), l'IBR sera plus important que si la contamination impacte une fonction moins bien représentée (i.e. reproduction, neurotoxicité). Ce déséquilibre dans le nombre de biomarqueurs par fonction pourrait ainsi potentiellement induire des biais dans les résultats finaux des IBR et dans la classification des sites étudiés. Une des possibilités pour pallier ce problème pourrait être de regrouper les biomarqueurs dans un seul indicateur par fonction et de construire l'IBR à partir de ces indicateurs de fonction.

4. LES VALEURS DE REFERENCE : UN ENJEU POUR LA BIOSURVEILLANCE

La sélection de la référence utilisée pour construire la ligne de base de l'IBR constitue un second élément fondamental pour le résultat final de l'indice. L'application de l'IBR développé par Sanchez et al. (2013) est en effet directement reliée à la notion de valeurs de référence. Cette stratégie de comparaison à une référence est similaire à celle utilisée dans le cadre de la DCE, par exemple pour le calcul de l'indice poisson rivière (IPR) qui va mesurer l'écart entre un peuplement observé et un peuplement de référence. Deux options peuvent être choisies pour l'établissement des valeurs de référence : (i) les niveaux de référence des biomarqueurs peuvent être établis sur la base de poissons encagés sur un site considéré comme témoin, c'est-à-dire le moins anthropisé possible ou (ii) des valeurs de références génériques peuvent être établies dans des conditions contrôlées.

Concernant la première option, il est aujourd'hui de plus en plus difficile de trouver des sites non anthropisés. Ce problème de la non-validité d'un site de référence a été rencontré dans le cadre de cette thèse, lors de l'expérimentation dans les Marais de Sacy en 2018. En effet, les épinoches encagés sur le site de Ladrancourt, considéré comme référence lors de cette étude, ont présenté une inhibition significative de l'activité AChE et une augmentation des défenses antioxydantes, ce qui suggère la présence de contaminants. Durant les encagements menés dans le cadre du programme Interreg DIADeM, les niveaux de biomarqueurs mesurés dans la population d'origine, maintenue en conditions écosystémiques dans des bassins extérieurs exempts de toute contamination ont été choisis comme référence. Cette stratégie a permis une bonne discrimination des niveaux des biomarqueurs mesurés entre la population d'origine et les sites étudiés, avec des impacts mesurés sur les sites d'études à travers plusieurs paramètres qui dépendent des sites (i.e. inhibition des capacités immunitaires à Namur, diminution de l'activité des systèmes antioxydants et des enzymes de biotransformation à Bouillon). L'approche a donc permis de mettre clairement en évidence une contamination de ces sites, et des hypothèses ont pu être émises concernant les origines des différents effets observés (Article 3). Cependant, une partie des différences observées pourrait également être liée aux différences physico-chimiques existantes entre l'eau qui alimente les bassins de stabulation de la population d'origine et l'eau des rivières étudiées (i.e. dureté, matières en suspension, oxygénation). Durant sa thèse, Wilfried Sanchez (2007) avait en effet attiré l'attention sur la variabilité pouvant exister entre différentes écorégions dans les niveaux de base des biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines. De plus, la plupart des biomarqueurs sont connus pour être fortement modulés par plusieurs facteurs abiotiques, même si les effets de certains facteurs confondants sur les niveaux de biomarqueurs restent peu étudiés (i.e. pH,

conductivité). Ces facteurs pourraient avoir artificiellement augmenté la différence entre les niveaux de biomarqueurs mesurés chez la population d'origine et ceux mesurés chez les poissons encagés, indépendamment de la contamination chimique.

L'idée d'utiliser des valeurs théoriques de référence apparaît alors comme une solution intéressante pour s'affranchir de la problématique liée à la difficulté de trouver un site témoin. Ainsi, durant l'ensemble de ce travail de thèse, une démarche a été amorcée pour définir des valeurs de référence génériques sur la base de données historiques collectées au laboratoire. Les résultats ont mis en évidence l'importance de la saison dans la modulation des fonctions physiologiques de l'épinoche à trois épines, liée en grande partie au statut reproducteur des individus, ce qui a confirmé les observations déjà réalisées dans le cadre de la thèse de Wilfried Sanchez (2007). De façon plus surprenante, les résultats ont mis en évidence des différences dans les niveaux de nombreux paramètres hors de la période de reproduction entre les mois d'octobre et de février, alors que les poissons présentaient à priori le même statut reproducteur. Les travaux et essais concernant l'établissement de valeurs de référence génériques mettent également en évidence qu'une importante variabilité interannuelle peuvent être mesurées chez des poissons du même âge et maintenus dans les mêmes conditions. Le même constat a été fait chez la perche (*Perca fluviatilis*) qui présente des valeurs de biomarqueurs très différentes d'une année à l'autre sur un même site de référence (Hanson et al. 2010). Ainsi, l'établissement de valeurs de référence robustes doit passer par des mesures répétées sur plusieurs années. De plus, le rôle des facteurs confondants probablement impliqués dans la modulation interannuelle des réponses physiologiques (i.e. température, conductivité, pH) doit être parfaitement connu, caractérisé et pris en compte dans la définition des valeurs basales. Dans cet objectif, le modèle développé pour l'épinoche à trois épines et appliqué aux marqueurs de l'immunité innée dans le cadre de la thèse d'Adrien Marchand (2018) présente un intérêt considérable. Ce modèle, obtenu pour chaque immunomarqueur, permet en effet d'obtenir une valeur moyenne de référence en fonction de trois facteurs confondants (saison, taille, et sexe des individus) ainsi qu'une plage de référence de ces marqueurs en laboratoire et en conditions écosystémiques. Ce modèle pourrait être optimisé afin de prendre en compte des variables liées à la physicochimie du milieu considéré pour un meilleur ajustement des références aux études. Il pourrait ensuite être appliqué à l'ensemble des biomarqueurs de la batterie pour définir de façon robuste des valeurs de références fiables pour ces paramètres chez l'épinoche à trois épines. Cette démarche ne pourra cependant être initiée qu'après avoir caractérisé finement la variabilité des biomarqueurs liée aux paramètres physicochimiques (température, conductivité, pH).

Les biomarqueurs utilisés dans le cadre de cette approche sont intégrateurs de l'ensemble des contaminants susceptibles d'être présents dans le milieu mais peu prédictifs des effets écologiques potentiels. De ce fait, les résultats issus de ces études ne représentent qu'un signal d'alarme précoce, à un instant donné, de possibles effets à long terme. Dans ce contexte d'interprétation, et malgré toutes les limites énoncées précédemment, l'approche multibiomarqueurs en biosurveillance active avec l'épinoche à trois épines a démontré toute son utilité dans la caractérisation des sites potentiellement impactés par des effluents de stations de traitement des eaux usées, mais également dans la discrimination de plusieurs sites sur la base des fonctions physiologiques impactées. Ces résultats sont très prometteurs et permettent d'envisager le déploiement de cette approche dans d'autres contextes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES



(Source : Pixabay)

Aarab, N., Champeau, O., Mora, P., Daubeze, M., Garrigues, P., and Narbonne, J.-F. 2004. Scoring approach based on fish biomarkers applied to French river monitoring. *Biomarkers* 9(3): 258–270. doi:10.1080/13547500400015626.

Abarnou, A., Guillaud, J.-F., and Batt, A. 1990. La chloration des effluents urbains avant rejet en mer. : 168.

Adams, S.M., Brown, A.M., and Goede, R.W. 1993. A Quantitative Health Assessment Index for Rapid Evaluation of Fish Condition in the Field. *Transactions of the American Fisheries Society* 122: 63–73. doi:10.1577/1548-8659(1993)122<0063:AQHAIF>2.3.CO;2.

Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F., and Hinton, D.E. 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research* 28(1): 459–464. doi:10.1016/0141-1136(89)90284-5.

Aerle, R. van, Nolanusan, M., Jobling, S., Christiansen, L.B., Sumpter, J.P., and Tyler, C.R. 2001. Sexual disruption in a second species of wild cyprinid fish (the gudgeon, *Gobio gobio*) in United Kingdom Freshwaters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(12): 2841–2847. doi:10.1002/etc.5620201225.

Agence de l'eau Rhône Méditerranée Corse. (n.d.). Deux siècles d'histoire du droit de l'eau. Available from https://www.eaurmc.fr/jcms/vmr_6417/fr/deux-siecles-d-histoire-du-droit-de-l-eau?cid=vmr_36652&portal=ppi_5780 [accessed 7 August 2019].

Ahmad, I., Pacheco, M., and Santos, M.A. 2003. Naphthalene-induced differential tissue damage association with circulating fish phagocyte induction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 54(1): 7–15. doi:10.1016/S0147-6513(02)00036-2.

Akcha, F., Leday, G., and 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. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 552(1–2): 197–207. doi:10.1016/j.mrfmmm.2004.06.020.

Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Roig, B., and Gonzalez, C. 2006. A “toolbox” for biological and chemical monitoring requirements for the European Union’s Water Framework Directive. *Talanta* 69(2): 302–322. doi:10.1016/j.talanta.2005.09.043.

- Almeida, J.R., Gravato, C., and Guilhermino, L. 2015. Effects of Temperature in Juvenile Seabass (*Dicentrarchus labrax* L.) Biomarker Responses and Behaviour: Implications for Environmental Monitoring. *Estuaries and Coasts* 38(1): 45–55. doi:10.1007/s12237-014-9792-7.
- Amara, R., Meziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., and Laffargue, P. 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 351: 201–208. doi:10.3354/meps07154.
- Amiard, J.-C. 2011. Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Lavoisier.
- Amiard, J.-C., and Amiard-Triquet, C. 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Lavoisier.
- Amiard-Triquet, C., Amiard, J.-C., and Rainbow, P.S. 2013. *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press.
- Anderson, J.C., Carlson, J.C., Low, J.E., Challis, J.K., Wong, C.S., Knapp, C.W., and Hanson, M.L. 2013. Performance of a constructed wetland in Grand Marais, Manitoba, Canada: Removal of nutrients, pharmaceuticals, and antibiotic resistance genes from municipal wastewater. *Chem Cent J* 7: 54. doi:10.1186/1752-153X-7-54.
- Anderson, M.J., Miller, M.R., and Hinton, D.E. 1996. In vitro modulation of 17- β -estradiol-induced vitellogenin synthesis: Effects of cytochrome P4501A1 inducing compounds on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells. *Aquatic Toxicology* 34(4): 327–350. doi:10.1016/0166-445X(95)00047-8.
- Andersson, C., Katsiadaki, I., Lundstedt-Enkel, K., and Örberg, J. 2007. Effects of 17 α -ethynylestradiol on EROD activity, spiggin and vitellogenin in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* 83(1): 33–42. doi:10.1016/j.aquatox.2007.03.008.
- Andersson, T., and Förlin, L. 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquatic Toxicology* 24(1–2): 1–19. doi:10.1016/0166-445X(92)90014-E.
- Andrade, T., Afonso, A., Pérez-Jiménez, A., Oliva-Teles, A., de las Heras, V., Mancera, J.M., Serradeiro, R., and 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. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.12.034.

Atli, G., and Canli, M. 2008. Responses of metallothionein and reduced glutathione in a freshwater fish *Oreochromis niloticus* following metal exposures. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 25(1): 33–38. doi:10.1016/j.etap.2007.08.007.

Auffret, M., Rousseau, S., Boutet, I., Tanguy, A., Baron, J., Moraga, D., and Duchemin, M. 2006. A multiparametric approach for monitoring immunotoxic responses in mussels from contaminated sites in Western Mediterranean. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63(3): 393–405. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.10.016.

B

Bado-Nilles, A. 2008. Effets de pollutions par hydrocarbures sur les capacités de défense d'organismes marins. Université de la Rochelle. Available from <https://archimer.ifremer.fr/doc/2008/these-7401.pdf>.

Bado-Nilles, A., Betoulle, S., Geffard, A., Porcher, J.-M., Gagnaire, B., and 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* 20(5): 2692–2704. doi:10.1007/s11356-012-1410-2.

Bado-Nilles, A., Jolly, S., Porcher, J.-M., Palluel, O., Geffard, A., Gagnaire, B., Betoulle, S., and Sanchez, W. 2014a. Applications in environmental risk assessment of leucocyte apoptosis, necrosis and respiratory burst analysis on the European bullhead, *Cottus* sp. *Environmental Pollution* 184: 9–17. doi:10.1016/j.envpol.2013.07.049.

Bado-Nilles, A., Quentel, C., Auffret, M., Le Floch, S., Gagnaire, B., Renault, T., and Thomas-Guyon, H. 2009. Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(5): 1446–1454. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.001.

Bado-Nilles, A., Techer, R., Porcher, J.M., Geffard, A., Gagnaire, B., Betoulle, S., and 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(2): 672–683. doi:10.1016/j.etap.2014.08.002.

Bado-Nilles, A., Villeret, M., Geffard, A., Palluel, O., Blanchard, C., Le Rohic, C., Besson, S., Porcher, J.-M., Minier, C., and Sanchez, W. 2015. Recommendations to design environmental monitoring in the European bullhead, *Cottus* sp., based on reproductive cycle and

immunomarker measurement. *Mar. Pollut. Bull.* 95(2): 576–581.
doi:10.1016/j.marpolbul.2014.12.055.

Bahamonde, P.A., Fuzzen, M.L., Bennett, C.J., Tetreault, G.R., McMaster, M.E., Servos, M.R., Martyniuk, C.J., and Munkittrick, K.R. 2015. Whole organism responses and intersex severity in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part A. *Aquatic Toxicology* 159: 290–301.
doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.023.

Ballesteros, M.L., Rivetti, N.G., Morillo, D.O., Bertrand, L., Ame, M.V., and Bistoni, M.A. 2017. Multi-biomarker responses in fish (*Jenynsia multidentata*) to assess the impact of pollution in rivers with mixtures of environmental contaminants. *Sci. Total Environ.* 595: 711–722.
doi:10.1016/j.scitotenv.2017.03.203.

Balon, E.K. 1975. Reproductive Guilds of Fishes: A Proposal and Definition. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 32(6): 821–864. doi:10.1139/f75-110.

Barjhoux, I., Fechner, L.C., Lebrun, J.D., Anzil, A., Ayrault, S., Budzinski, H., Cachot, J., Charron, L., Chaumot, A., Clérandeau, C., Dedourge-Geffard, O., Faburé, J., François, A., Geffard, O., George, I., Labadie, P., Lévi, Y., Munoz, G., Noury, P., Oziol, L., Quéau, H., Servais, P., Uher, E., Urien, N., and Geffard, A. 2016. Application of a multidisciplinary and integrative weight-of-evidence approach to a 1-year monitoring survey of the Seine River. *Environmental Science and Pollution Research*. doi:10.1007/s11356-016-6993-6.

Bartell, S.M. 2006. Biomarkers, Bioindicators, and Ecological Risk Assessment—A Brief Review and Evaluation. *Environmental Bioindicators* 1(1): 60–73.
doi:10.1080/15555270591004920.

Basmadjian, E., Perkins, E.M., Phillips, C.R., Heilprin, D.J., Watts, S.D., Diener, D.R., Myers, M.S., Koerner, K.A., Mengel, M.J., Robertson, G., Armstrong, J.L., Lissner, A.L., and Frank, V.L. 2008. Liver lesions in demersal fishes near a large ocean outfall on the San Pedro Shelf, California. *Environ Monit Assess* 138(1–3): 239–253. doi:10.1007/s10661-007-9794-z.

Beliaeff, B., and Burgeot, T. 1997. Sampling design optimization for EROD measurements in fish. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 153: 239–246. doi:10.3354/meps153239.

Beliaeff, B., and Burgeot, T. 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(6): 1316–1322.
doi:10.1002/etc.5620210629.

Bell, M.A., and Foster, S.A. 1994. *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback*. Oxford University Press.

- Bello, A.R.R., Fortes, E., Bello-Klein, A., Bello, A.A., Llesuy, S.F., Robaldo, R.B., and Bianchini, A. 2000. Lipid peroxidation induced by *Clinostomum detrunctum* in muscle of the freshwater fish *Rhamdia quelen*. *Dis. Aquat. Org.* 42(3): 233–236. doi:10.3354/dao042233.
- Berg, L.R., Raven, P.H., and Hassenzahl, D.M. 2009. *Environnement*. De Boeck Supérieur.
- Bessa, M.L., Antunes, S.C., Pereira, R., Goncalves, F.J.M., and Nunes, B. 2016. Multibiomarker toxicity characterization of uranium mine drainages to the fish *Carassius auratus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23(13): 13355–13367. doi:10.1007/s11356-016-6426-6.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., and Geffard, O. 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47(2): 650–660. doi:10.1016/j.watres.2012.10.024.
- Besse, J.-P., Geffard, O., and Coquery, M. 2011. Etat de l'art sur les approches de biosurveillance et application dans le cadre de la DCE. : 100.
- Besse, J.-P., Geffard, O., and Coquery, M. 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 36: 113–127. doi:10.1016/j.trac.2012.04.004.
- Björkblom, C., Högfors, E., Salste, L., Bergelin, E., Olsson, P.-E., Katsiadaki, I., and Wiklund, T. 2009. Estrogenic and androgenic effects of municipal wastewater effluent on reproductive endpoint biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 28(5): 1063–1071. doi:10.1897/08-337.1.
- Björkblom, C., Mustamäki, N., Olsson, P.-E., Katsiadaki, I., and Wiklund, T. 2011. Assessment of reproductive biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) from sewage effluent recipients. *Environmental Toxicology* 28(4): 229–237. doi:10.1002/tox.20715.
- Blackwell, B.G., Brown, M.L., and Willis, D.W. 2000. Relative Weight (Wr) Status and Current Use in Fisheries Assessment and Management. *Reviews in Fisheries Science* 8(1): 1–44. doi:10.1080/10641260091129161.
- Blanco, M., Rizzi, J., Fernandes, D., Colin, N., Maceda-Veiga, A., and Porte, C. 2019. Assessing the impact of waste water effluents on native fish species from a semi-arid region, NE Spain. *Sci. Total Environ.* 654: 218–225. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.115.
- Blankvoort, B.M.G., Rodenburg, R.J.T., Murk, A.J., Koeman, J.H., Schilt, R., and Aarts, J. 2005. Androgenic activity in surface water samples detected using the AR-LUX assay: indications for mixture effects. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19(2): 263–272. doi:10.1016/j.etap.2004.08.004.

- Blum, K.M., Andersson, P.L., Ahrens, L., Wiberg, K., and Haglund, P. 2018. Persistence, mobility and bioavailability of emerging organic contaminants discharged from sewage treatment plants. *Science of The Total Environment* 612: 1532–1542. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.006.
- Bolger, T., and Connolly, P.L. 1989. The selection of suitable indices for the measurement and analysis of fish condition. *J Fish Biology* 34(2): 171–182. doi:10.1111/j.1095-8649.1989.tb03300.x.
- Bols, N.C., Brubacher, J.L., Ganassin, R.C., and Lee, L.E.J. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25(8): 853–873. doi:10.1016/S0145-305X(01)00040-4.
- Bonanse, R.I., Wunderlin, D.A., and Amé, M.V. 2016. Behavioral swimming effects and acetylcholinesterase activity changes in *Jenynsia multidentata* exposed to chlorpyrifos and cypermethrin individually and in mixtures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 129: 311–319. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.03.043.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C., and Devaux, A. 2008. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquat. Toxicol.* 89(3): 197–203. doi:10.1016/j.aquatox.2008.06.017.
- Bouaoun, D., and Aoun, J. 2004. Élimination du phosphore, de l’ammonium et des nitrates par alternance de phases dans des réacteurs biologiques. *Déchets, sciences et techniques* (35). doi:10.4267/dechets-sciences-techniques.2117.
- Bouleau, G., and Pont, D. 2014. Les conditions de référence de la directive cadre européenne sur l’eau face à la dynamique des hydrosystèmes et des usages. *Natures Sciences Sociétés* 22(1): 3–14. doi:10.1051/nss/2014016.
- Broeg, K., Westernhagen, H. v., Zander, S., Körting, W., and Koehler, A. 2005. The “bioeffect assessment index” (BAI): A concept for the quantification of effects of marine pollution by an integrated biomarker approach. *Marine Pollution Bulletin* 50(5): 495–503. doi:10.1016/j.marpolbul.2005.02.042.
- Brousseau, P., Dunier, M., Deschaux, P., De Guise, S., Krystyniak, K., and Fournier, M. 1997. Marqueurs immunologiques. In *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*, Elsevier Mason SAS. L. Lagadic, T. Caquet, J.C. Amiard, F. Ramade, Issy-les-Moulineaux (France). pp. 171–184.

Brown, M., Hablützel, P., Friberg, I.M., Thomason, A.G., Stewart, A., Pachebat, J.A., and Jackson, J.A. 2016. Seasonal immunoregulation in a naturally-occurring vertebrate. *BMC Genomics* 17(1). doi:10.1186/s12864-016-2701-7.

Brydges, N.M., Boulcott, P., Ellis, T., and Braithwaite, V.A. 2009. Quantifying stress responses induced by different handling methods in three species of fish. *Applied Animal Behaviour Science* 116(2): 295–301. doi:10.1016/j.applanim.2008.09.003.

Byrns, G. 2001. The fate of xenobiotic organic compounds in wastewater treatment plants. *Water Res.* 35(10): 2523–2533.

C

Cachot, J., Cherel, Y., Larcher, T., Pfohl-Leszkowicz, A., Laroche, J., Quiniou, L., Morin, J., Schmitz, J., Burgeot, T., and Pottier, D. 2013. Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. *Environ Sci Pollut Res Int* 20(2): 723–737. doi:10.1007/s11356-012-1287-0.

Cao, R., Wang, D., Wei, Q., Wang, Q., Yang, D., Liu, H., Dong, Z., Zhang, X., Zhang, Q., and Zhao, J. 2018. Integrative Biomarker Assessment of the Influence of Saxitoxin on Marine Bivalves: A Comparative Study of the Two Bivalve Species Oysters, *Crassostrea gigas*, and Scallops, *Chlamys farreri*. *Front. Physiol.* 9. doi:10.3389/fphys.2018.01173.

Cappello, T., Maisano, M., D'Agata, A., Natalotto, A., Mauceri, A., and Fasulo, S. 2013. Effects of environmental pollution in caged mussels (*Mytilus galloprovincialis*). *Mar. Environ. Res.* 91: 52–60. doi:10.1016/j.marenvres.2012.12.010.

CAS. 2017. Homepage of the Chemical Abstracts Service. Available from <https://www.cas.org> [accessed 8 August 2019].

Cazenave, J., Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., and Parma, M.J. 2014. Deleterious effects of wastewater on the health status of fish: A field caging study. *Ecological Indicators* 38: 104–112. doi:10.1016/j.ecolind.2013.10.029.

Chakrabarti, I., Gani, Md.A., Chaki, K.K., Sur, R., and Misra, K.K. 1995. Digestive enzymes in 11 freshwater teleost fish species in relation to food habit and niche segregation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 112(1): 167–177. doi:10.1016/0300-9629(95)00072-F.

Chang, H., Wan, Y., Wu, S., Fan, Z., and Hu, J. 2011. Occurrence of androgens and progestogens in wastewater treatment plants and receiving river waters: comparison to estrogens. *Water Res.* 45(2): 732–740. doi:10.1016/j.watres.2010.08.046.

Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., and Thomson, R.Y. 1989. Annual variation in energy reserves in male three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatm* L. (Pisces, Gasterosteidae). *Journal of Fish Biology* 35(2): 275–286.

Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., and Thomson, R.Y. 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology* 47(5): 775–787. doi:10.1111/j.1095-8649.1995.tb06002.x.

Choubert, J.-M., Penru, Y., Mathon, B., Guillon, A., Cretollier, C., Dherret, L., Daval, A., Lagarrigue, C., Miege, C., and Coquery, M. 2017. Rapport final du projet MICROPOLIS-PROCEDES. : 167.

Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., and Kroiss, H. 2005. Removal of selected pharmaceuticals, fragrances and endocrine disrupting compounds in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Research* 39(19): 4797–4807. doi:10.1016/j.watres.2005.09.015.

Connon, R.E., Geist, J., and Werner, I. 2012. Effect-based tools for monitoring and predicting the ecotoxicological effects of chemicals in the aquatic environment. *Sensors (Basel)* 12(9): 12741–12771. doi:10.3390/s120912741.

Cooper, R.U., Clough, L.M., Farwell, M.A., and West, T.L. 2002. Hypoxia-induced metabolic and antioxidant enzymatic activities in the estuarine fish *Leiostomus xanthurus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 279(1–2): 1–20. doi:10.1016/S0022-0981(02)00329-5.

Costalago, D., Tecchio, S., Palomera, I., Álvarez-Calleja, I., Ospina-Álvarez, A., and Raicevich, S. 2011. Ecological understanding for fishery management: Condition and growth of anchovy late larvae during different seasons in the Northwestern Mediterranean. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 93(4): 350–358. doi:10.1016/j.ecss.2011.05.005.

D

Dagnino, A., Allen, J.I., Moore, M.N., Broeg, K., Canesi, L., and Viarengo, A. 2007. Development of an expert system for the integration of biomarker responses in mussels into an animal health index. *Biomarkers* 12(2): 155–172. doi:10.1080/13547500601037171.

- Dautremepuits, C., Betoulle, S., and Vernet, G. 2003. Stimulation of antioxidant enzymes levels in carp (*Cyprinus carpio* L.) infected by *Ptychobothrium* sp (Cestoda). *Fish Shellfish Immunol.* 15(5): 467–471. doi:10.1016/S1050-4648(03)00007-X.
- Davies, K.J. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem. Soc. Symp.* 61: 1–31.
- De Kermoisan, G., Pery, A., Porcher, J.-M., and Beaudouin, R. 2013. A non-invasive method based on head morphology to sex mature three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) in rearing conditions. *Mathematical Biosciences* 244(2): 148–153. doi:10.1016/j.mbs.2013.05.001.
- De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., and Chan, H.M. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50(1–2): 51–71. doi:10.1016/S0166-445X(99)00094-6.
- Deblonde, T., Cossu-Leguille, C., and Hartemann, P. 2011. Emerging pollutants in wastewater: A review of the literature. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214(6): 442–448. doi:10.1016/j.ijheh.2011.08.002.
- Décret n° 89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles | Legifrance. 1989, January 3. Available from <https://www.legifrance.gouv.fr/eli/decret/1989/1/3/89-3/jo/texte> [accessed 7 August 2019].
- Dedourge, O., Geffard, A., and Amiard-Triquet, C. 2008. Origine des perturbations du métabolisme énergétique. In *Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques*. Lavoisier.
- Depledge, M.H., and Fossi, M.C. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Invertebrates. Ecotoxicology* 3(3): 161–172. doi:10.1007/BF00117081.
- Deronzier, G., and Choubert, J.-M. 2004. Traitement du phosphore dans les petites stations d'épuration à boues activées: comparaisons techniques et économiques des voies de traitement biologique et physico-chimique. In *Unité de recherche Qualité et fonctionnement hydrologique des systèmes aquatiques*. CEMAGREF; Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche et des affaires rurales, Paris.
- Devin, S., Burgeot, T., Giambérini, L., Minguez, L., and Pain-Devin, S. 2014. The integrated biomarker response revisited: optimization to avoid misuse. *Environmental Science and Pollution Research* 21(4): 2448–2454. doi:10.1007/s11356-013-2169-9.

Dey, S., Samanta, P., Pal, S., Mukherjee, A.K., Kole, D., and Ghosh, A.R. 2016. Integrative assessment of biomarker responses in teleostean fishes exposed to glyphosate-based herbicide (Excel Mera 71). *Emerging Contaminants* 2(4): 191–203. doi:10.1016/j.emcon.2016.12.002.

Diaz, J.P. 2001. Application des membranes au traitement des eaux usées. : 21.

Dong, M., Zhu, L., Shao, B., Zhu, S., Wang, J., Xie, H., Wang, J., and Wang, F. 2013. The effects of endosulfan on cytochrome P450 enzymes and glutathione S-transferases in zebrafish (*Danio rerio*) livers. *Ecotox. Environ. Safe.* 92: 1–9. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.10.019.

Du, S.N.N., Choi, J.A., McCallum, E.S., McLean, A.R., Borowiec, B.G., Balshine, S., and Scott, G.R. 2019. Metabolic implications of exposure to wastewater effluent in bluegill sunfish. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 224: 108562. doi:10.1016/j.cbpc.2019.108562.

Durieux, E.D.H., Farver, T.B., Fitzgerald, P.S., Eder, K.J., and Ostrach, D.J. 2011. Natural factors to consider when using acetylcholinesterase activity as neurotoxicity biomarker in Young-Of-Year striped bass (*Morone saxatilis*). *Fish Physiology and Biochemistry* 37(1): 21–29. doi:10.1007/s10695-010-9412-9.

Dwivedi, A.K. 2017. Researches in water pollution: a review. doi:10.13140/rg.2.2.12094.08002.

E

EE Commission. 2013, August 24. Directive n°2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. Available from <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj/eng> [accessed 8 August 2019].

El-Boshy, M.E., and 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(12): 7–15.

Eme, C., and Boutin, C. 2015. Composition des eaux usées domestiques par source d'émission à l'échelle de l'habitation. Cemagref.

Ernst, W.R., and Doe, K.G. 1989. A Comparison of the Aquatic Toxicity of Fenitrothion Flowable and Fenitrothion Liquid Technical Formulations. *Water Quality Research Journal* 24(4): 553–568. doi:10.2166/wqrj.1989.034.

Ernst, W.R., Jonah, P., Doe, K., Julien, G., and Hennigar, P. 1991. Toxicity to aquatic organisms of off-target deposition of endosulfan applied by aircraft. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10(1): 103–114. doi:10.1002/etc.5620100112.

EU Commission. 1980, July 15. Directive 80/778/CEE du Conseil, du 15 juillet 1980, relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. text/html; charset=UNICODE-1-1-UTF-8. Available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:31980L0778> [accessed 7 August 2019].

EU Commission. 1991, May 21. Directive 91/271/CEE du 21 mai 1991 relative au traitement des eaux urbaines résiduaires. Available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/HTML/?uri=CELEX:31991L0271> [accessed 13 May 2019].

EU Commission. 2000, October 23. Directive n° 2000/60/CE du 23/10/00 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau | AIDA. Available from http://www.ineris.fr/aida/consultation_document/995#Annexe_V [accessed 19 May 2017].

EU Commission. 2008. Directive 2008/56/CE du Parlement Européen et du Conseil du 17 juin 2008 établissant un cadre d'action communautaire dans le domaine de la politique pour le milieu marin (directive-cadre stratégie pour le milieu marin). Available from <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/ALL/?uri=CELEX%3A32008L0056> [accessed 8 August 2019].

EU Commission. 2013, August 24. Directive n°2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE. Available from <http://data.europa.eu/eli/dir/2013/39/oj/eng> [accessed 8 August 2019].

F

Fabrizi, L., Gemma, S., Testai, E., and Vittozzi, L. 1999. Identification of the cytochrome P450 isoenzymes involved in the metabolism of diazinon in the rat liver. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 13(1): 53–61. doi:10.1002/(SICI)1099-0461(1999)13:1<53::AID-JBT7>3.0.CO;2-2.

Farombi, E.O., Adelowo, O.A., and Ajimoko, Y.R. 2007. Biomarkers of Oxidative Stress and Heavy Metal Levels as Indicators of Environmental Pollution in African Cat Fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River. *Int J Environ Res Public Health* 4(2): 158–165.

Férard, J.-F. 2013. Ecotoxicology: Historical Overview and Perspectives. In *Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology*. Edited by J.-F. Férard and C. Blaise. Springer Netherlands, Dordrecht. pp. 377–386. doi:10.1007/978-94-007-5704-2_36.

Filipović, V., and Raspor, 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(13): 3253–3262. doi:10.1016/S0043-1354(03)00162-3.

Firidin, G. 2018. Oxidative Stress Parameters, Induction of Lipid Peroxidation, and ATPase Activity in the Liver and Kidney of *Oreochromis niloticus* Exposed to Lead and Mixtures of Lead and Zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100(4): 477–484. doi:10.1007/s00128-018-2281-0.

Flammarion, P., Devaux, A., and Garric, J. 2001. Marqueurs biochimiques de pollution dans les écosystèmes aquatiques continentaux. Exemples d'utilisation et perspectives pour le gestionnaire. *Bull. Fr. Pêche Piscic.* (357–360): 209–226. doi:10.1051/kmae/2001045.

Flammarion, P., and Garric, J. 1997. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker? *Chemosphere* 35(10): 2375–2388.

Flammarion, P., Garric, J., and Monod, G. 1998. Utilisation de l'activité enzymatique EROD chez les poissons des hydrosystèmes continentaux. In *Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement*, Lavoisier, Technique et Documentation. Paris. pp. 57–75. Available from <http://prodinra.inra.fr/?locale=fr#!ConsultNotice:133272> [accessed 31 August 2017].

Flammarion, P., Noury, P., and Garric, J. 2002. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. *Environmental Pollution* 120(2): 325–330. doi:10.1016/S0269-7491(02)00137-9.

Fonseca, V.F., França, S., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M.J., and Cabral, H.N. 2011. Multi-biomarker responses to estuarine habitat contamination in three fish species: *Dicentrarchus labrax*, *Solea senegalensis* and *Pomatoschistus microps*. *Aquat. Toxicol.* 102(3–4): 216–227. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.018.

Fontaine, L.P., Whiteman, K.W., Li, P., Burr, G.S., Webb, K.A., Goff, J., Gatlin, D.M., Neill, W.H., Davis, K.B., and Vega, R.R. 2007. Effects of temperature and feed energy on the performance of juvenile red drum. *Trans. Am. Fish. Soc.* 136(5): 1193–1205. doi:10.1577/T06-136.1.

Forbes, V.E., and Forbes, T.L. 1997. *Ecotoxicologie: théorie et applications*. Editions Quae.

Forbes, V.E., Palmqvist, A., and Bach, L. 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 25(1): 272–280.

Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., and Brousseau, P. 2000. Phagocytosis as a Biomarker of Immunotoxicity in Wildlife Species Exposed to Environmental Xenobiotics. *Integr Comp Biol* 40(3): 412–420. doi:10.1093/icb/40.3.412.

Friberg, N., Bonada, N., Bradley, D.C., Dunbar, M.J., Edwards, F.K., Grey, J., Hayes, R.B., Hildrew, A.G., Lamouroux, N., Trimmer, M., and Woodward, G. 2011. Biomonitoring of Human Impacts in Freshwater Ecosystems: The Good, the Bad and the Ugly. In *Advances in Ecological Research*, Vol 44. Edited by G. Woodward. Elsevier Academic Press Inc, San Diego. pp. 1–68.

Fulton, M.H., and Key, P.B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(1): 37–45. doi:10.1002/etc.5620200104.

Fulton, T.W. 1902. *Rate of Growth of Sea Fishes*. Neill & Company.

G

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., and Depledge, M.H. 2004. A Multibiomarker Approach To Environmental Assessment. *Environ. Sci. Technol.* 38(6): 1723–1731. doi:10.1021/es030570+.

Garric, J., Morin, S., and Vincent-Hubert, F. 2010. Les biomarqueurs en écotoxicologie : définition, intérêt, limite, usage. *Sciences Eaux and Territoires : la Revue du IRSTEA* (1): 12–17. doi:10.14758/SET-REVUE.2010.1.03.

Garric, J., Vollat, B., Nguyen, D.K., Bray, M., Migeon, B., and Kosmala, A. 1996. Ecotoxicological and chemical characterization of municipal wastewater treatment plant effluents. *Water Science and Technology* 33(6): 83–91. doi:10.1016/0273-1223(96)00272-7.

Geffard, O., Ferrari, B., Chaumot, A., and Montuelle, B. 2010. Les expérimentations in situ : principes et perspectives. *Sciences Eaux & Territoires Numéro 1*(1): 20–25.

George, S., and Henderson, J. 1992. Influence of dietary PUFA content on cytochrome P450 and transferase activities in atlantic salmon (*salmo salar*). *Marine Environmental Research* 34(1): 127–131. doi:10.1016/0141-1136(92)90096-5.

Gerba, C.P., and Pepper, I.L. 2009. Chapter 24 - Wastewater Treatment and Biosolids Reuse. In *Environmental Microbiology (Second Edition)*. Edited by R.M. Maier, I.L. Pepper, and C.P. Gerba. Academic Press, San Diego. pp. 503–530. doi:10.1016/B978-0-12-370519-8.00024-9.

Gerba, C.P., and Pepper, I.L. 2015. Chapter 25 - Municipal Wastewater Treatment. In *Environmental Microbiology (Third Edition)*. Edited by I.L. Pepper, C.P. Gerba, and T.J. Gentry. Academic Press, San Diego. pp. 583–606. doi:10.1016/B978-0-12-394626-3.00025-9.

Gerhardt, A. 2000. Biomonitoring of Polluted Water: Reviews on Actual Topics. *Trans Tech*.

Ghisi, N.C., Oliveira, E.C., Mendonca Mota, T.F., Vanzetto, G.V., Roque, A.A., Godinho, J.P., Bettim, F.L., da Silva de Assis, H.C., and Prioli, A.J. 2016. Integrated biomarker response in catfish *Hypostomus ancistroides* by multivariate analysis in the Pirapo River, southern Brazil. *Chemosphere* 161: 69–79. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.06.113.

Gillet, P. 2018. Histoire de l'écotoxicologie. *SMETox Journal* 1(1–4): 4.

Gómez, M.J., Herrera, S., Solé, D., García-Calvo, E., and Fernández-Alba, A.R. 2012. Spatio-temporal evaluation of organic contaminants and their transformation products along a river basin affected by urban, agricultural and industrial pollution. *Science of The Total Environment* 420: 134–145. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.01.029.

Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Martínez, S., Martínez-Sánchez, M.J., Pérez-Sirvent, C., and Esteban, M.A. 2013. Accumulation, histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish & Shellfish Immunology* 35(3): 792–800. doi:10.1016/j.fsi.2013.06.011.

H

Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jakoby, W.B. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of biological Chemistry* 249(22): 7130–7139.

Hagger, J.A., Jones, M.B., Lowe, D., Leonard, D.R.P., Owen, R., and Galloway, T.S. 2008. Application of biomarkers for improving risk assessments of chemicals under the Water Framework Directive: A case study. *Marine Pollution Bulletin* 56(6): 1111–1118. doi:10.1016/j.marpolbul.2008.03.040.

Hai, D.Q., Varga, Sz.I., and Matkovics, B. 1997. Organophosphate Effects on Antioxidant System of Carp (*Cyprinus carpio*) and Catfish (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 117(1): 83–88. doi:10.1016/S0742-8413(96)00234-4.

Hani, Y. 2018, May 9. Étude des paramètres digestifs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*): intérêt en tant que biomarqueurs. Available from <http://www.theses.fr/s119804> [accessed 4 September 2019].

Hanson, N., Förlin, L., and Larsson, A. 2010. Spatial and annual variation to define the normal range of biological endpoints: an example with biomarkers in perch. *Environ. Toxicol. Chem.* 29(11): 2616–2624. doi:10.1002/etc.300.

Hanson, N., Guttman, E., and Larsson, A. 2006. The effect of different holding conditions for environmental monitoring with caged rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Environ. Monit.* 8(10): 994–999. doi:10.1039/b608862g.

Harford, A., Ohalloran, K., and Wright, P. 2005. The effects of in vitro pesticide exposures on the phagocytic function of four native Australian freshwater fish. *Aquatic Toxicology* 75(4): 330–342. doi:10.1016/j.aquatox.2005.09.005.

Hazel, J. 1969. Effect of Thermal Acclimation Upon Brain Acetylcholinesterase Activity. *Life Sciences Part 1 Physiology and Pharmacology and Part 2 Biochemistry General and Molecular Biology* 8(14P2): 775-. doi:10.1016/0024-3205(69)90015-0.

Hernandez-Moreno, D., Perez-Lopez, M., Soler, F., Gravato, C., and Guilhermino, L. 2011. Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*): Study of biomarkers and behaviour alterations. *Ecotox. Environ. Safe.* 74(7): 1905–1912. doi:10.1016/j.ecoenv.2011.07.016.

Hidalgo, M.C., Urea, E., and Sanz, A. 1999. Comparative study of digestive enzymes in fish with different nutritional habits. Proteolytic and amylase activities. *Aquaculture* 170(3): 267–283. doi:10.1016/S0044-8486(98)00413-X.

Hinck, J.E., Schmitt, C.J., Blazer, V.S., Denslow, N.D., Bartish, T.M., Anderson, P.J., Coyle, J.J., Dethloff, G.M., and Tillitt, D.E. 2006. Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Columbia River and its tributaries: Spatial and temporal trends. *Science of The Total Environment* 366(2–3): 549–578. doi:10.1016/j.scitotenv.2005.11.008.

Hoeger, B., Hitzfeld, B., Köllner, B., Dietrich, D.R., and van den Heuvel, M.R. 2005. Sex and low-level sampling stress modify the impacts of sewage effluent on the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immune system. *Aquat. Toxicol.* 73(1): 79–90. doi:10.1016/j.aquatox.2005.03.004.

Hsieh, C.Y., Liaw, E.T., and Fan, K.M. 2015. Removal of veterinary antibiotics, alkylphenolic compounds, and estrogens from the Wuluo constructed wetland in southern Taiwan. *J Environ*

I

Ifremer. 2010. Evaluation de la contamination chimique des eaux côtières en Méditerranée occidentale par biointégrateurs (MYTILOS). Available from <http://www.ifremer.fr/medicis/projets/mytilos.html> [accessed 8 August 2019].

Ifremer. 2018. Le Réseau d'Observation de la Contamination Chimique (ROCCH). Available from <https://wwz.ifremer.fr/lerpc/Activites-et-Missions/Surveillance/ROCCH> [accessed 8 August 2019].

Ings, J.S., Servos, M.R., and Vijayan, M.M. 2011. Hepatic Transcriptomics and Protein Expression in Rainbow Trout Exposed to Municipal Wastewater Effluent. *Environ. Sci. Technol.* 45(6): 2368–2376. doi:10.1021/es103122g.

Isik, I., and Celik, I. 2008. Acute effects of methyl parathion and diazinon as inducers for oxidative stress on certain biomarkers in various tissues of rainbowtrout (*Oncorhynchus mykiss*). *Pesticide Biochemistry and Physiology* 92(1): 38–42. doi:10.1016/j.pestbp.2008.06.001.

J

Jasinska, E.J., Goss, G.G., Gillis, P.L., Van Der Kraak, G.J., Matsumoto, J., de Souza Machado, A.A., Giacomini, M., Moon, T.W., Massarsky, A., Gagné, F., Servos, M.R., Wilson, J., Sultana, T., and Metcalfe, C.D. 2015. Assessment of biomarkers for contaminants of emerging concern on aquatic organisms downstream of a municipal wastewater discharge. *Science of The Total Environment* 530–531: 140–153. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.05.080.

Jee, J.H., and Kang, J.C. 2004. Effect of phenanthrene on haematological parameters in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminch et Schlegel). *Aquac. Res.* 35(14): 1310–1317. doi:10.1111/j.1365-2109.2004.01152.x.

Jifa, W., Yu, Z., Xiuxian, S., and You, W. 2006. Response of integrated biomarkers of fish (*Lateolabrax japonicus*) exposed to benzo[a]pyrene and sodium dodecylbenzene sulfonate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65(2): 230–236. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.08.002.

Jobling, S., Burn Robert. W., Thorpe Karen, Williams Richard, and Tyler Charles. 2009. Statistical Modeling Suggests that Antiandrogens in Effluents from Wastewater Treatment

Works Contribute to Widespread Sexual Disruption in Fish Living in English Rivers. *Environmental Health Perspectives* 117(5): 797–802. doi:10.1289/ehp.0800197.

Jobling, S., Nolan, M., Tyler, C.R., Brighty, G., and Sumpter, J.P. 1998. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environ. Sci. Technol.* 32(17): 2498–2506. doi:10.1021/es9710870.

Jolly, S., Bado-Nilles, A., Lamand, F., Turies, C., Chadili, E., Porcher, J.-M., Betoulle, S., and 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(7): 675–683. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.055.

Jolly, S., Jaffal, A., Delahaut, L., Palluel, O., Porcher, J.-M., Geffard, A., Sanchez, W., and Betoulle, S. 2014. Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus L.* *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21(22): 13103–13117. doi:10.1007/s11356-014-3227-7.

Jones, D., and Candido, E.P. 1999. Feeding is inhibited by sublethal concentrations of toxicants and by heat stress in the nematode *Caenorhabditis elegans*: relationship to the cellular stress response. *J. Exp. Zool.* 284(2): 147–157.

Jordanova, M., Rebok, K., Naskovska, M., Kostov, V., and Rocha, E. 2016. Splenic Pigmented Macrophage Aggregates in Barbel (*Barbus peloponnesius*, Valenciennes, 1844) from River Bregalnica - Influences of Age, Sex and Season on a Pollution Biomarker. *Turk. J. Fish. Quat. Sci.* 16(4): 881–890. doi:10.4194/1303-2712-v16_4_15.

Jouany, J.M. 1971. Nuisances et Ecologie. *Actualités Pharmaceutiques* 69: 11–22.

K

Kakuta, I. 1997. Effect of sewage on blood parameters and the resistance against bacterial infection of goldfish, *Carassius auratus*. *Environmental Toxicology and Water Quality* 12(1): 43–51. doi:10.1002/(SICI)1098-2256(1997)12:1<43::AID-TOX7>3.0.CO;2-8.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., and Guwy, A.J. 2009. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research* 43(2): 363–380. doi:10.1016/j.watres.2008.10.047.

Katsiadaki, I., Morris, S., Squires, C., Hurst, M.R., James, J.D., and Scott, A.P. 2006. Use of the Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) As a Sensitive in Vivo Test for

Detection of Environmental Antiandrogens. *Environ Health Perspect* 114(Suppl 1): 115–121. doi:10.1289/ehp.8063.

Katsiadaki, I., Scott, A.P., Hurst, M.R., Matthiessen, P., and Mayer, I. 2002. Detection of environmental androgens: a novel method based on enzyme-linked immunosorbent assay of spiggin, the stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) glue protein. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(9): 1946–1954. doi:https://doi.org/10.1002/etc.5620210924.

Kavlock, R.J., Daston, G.R., DeRosa, C., Gray, L.E., Kaattari, S., Lucier, G., Luster, M., Mac, M.J., Maczka, C., Miller, R., Rolland, R., Sheehan, M., Sinks, T., and Tilson, H.A. 1996. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environmental Health Perspectives* 104: 26.

Kerambrun, E., Le Floch, S., Sanchez, W., Thomas Guyon, H., Meziane, T., Henry, F., and Amara, R. 2012. Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphere* 87(7): 692–702. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.059.

Kerr, J.L., Guo, Z., Smith, D.W., Goss, G.G., and Belosevic, M. 2008. Use of goldfish to monitor wastewater and reuse water for xenobiotics. *Journal of Environmental Engineering and Science* 7(4): 369–383. doi:10.1139/S08-011.

Khoshbavar-Rostami, H.A., Soltani, M., and Hassan, H.M.D. 2007. Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. *J. Fish Biol.* 70(6): 1931–1938. doi:10.1111/j.10959-8649.2007.01468.x.

Kim, M.-K., Zoh, K.-D., Kim, M.-K., and Zoh, K.-D. 2016. Occurrence and removals of micropollutants in water environment. *Environmental Engineering Research* 21(4): 319–332. doi:10.4491/eer.2016.115.

Kim, W.-K., and Jung, J. 2016. In situ impact assessment of wastewater effluents by integrating multi-level biomarker responses in the pale chub (*Zacco platypus*). *Ecotox. Environ. Safe.* 128: 246–251. doi:10.1016/j.ecoenv.2016.02.028.

Kirby, M.F., Neall, P., Bateman, T.A., and Thain, J.E. 2004. Hepatic ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in flounder (*Platichthys flesus*) from contaminant impacted estuaries of the United Kingdom: continued monitoring 1999–2001. *Marine Pollution Bulletin* 49(1–2): 71–78. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.01.009.

- Kirk, L.A., Tyler, C.R., Lye, C.M., and Sumpter, J.P. 2002. Changes in estrogenic and androgenic activities at different stages of treatment in wastewater treatment works. *Environmental toxicology and chemistry* 21(5): 972–979. doi:10.1002/etc.5620210511.
- Kopecka, J., and Pempkowiak, J. 2008. Temporal and spatial variations of selected biomarker activities in flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Baltic proper. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70(3): 379–391. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.05.017.
- Kosmala, A., Migeon, B., Flammarion, P., and Garric, J. 1998. Impact Assessment of a Wastewater Treatment Plant Effluent Using the Fish Biomarker Ethoxyresorufin-O-Deethylase: Field and On-Site Experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 41(1): 19–28. doi:10.1006/eesa.1998.1662.
- Kostic, J., Kolarevic, S., Kracun-Kolarevic, M., Aborgiba, M., Gacic, Z., Paunovic, M., Visnjic-Jeftic, Z., Raskovic, B., Poleksic, V., Lenhardt, M., and Vukovic-Gacic, B. 2017. The impact of multiple stressors on the biomarkers response in gills and liver of freshwater breams during different seasons. *Sci. Total Environ.* 601: 1670–1681. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.05.273.
- Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., dos Santos, E.D., Pivato, M., and Zanatta, R. 2012. Innate immune response of silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to atrazine. *Fish & Shellfish Immunology* 33(4): 1055–1059. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.006.
- Kristensen, P., Whalley, C., Néry, F., Zal, N., Christiansen, T., and European Environment Agency. 2018. European waters: assessment of status and pressures 2018. Available from <https://data.europa.eu/doi/10.2800/303664> [accessed 9 April 2019].
- Kroon, F., Streten, C., and Harries, S. 2017. A protocol for identifying suitable biomarkers to assess fish health: A systematic review. *PloS one* 12(4): e0174762.
- Kumari, J., Kumar, D., Mathur, A., Naseer, A., Kumar, R.R., Thanjavur Chandrasekaran, P., Chaudhuri, G., Pulimi, M., Raichur, A.M., Babu, S., Chandrasekaran, N., Nagarajan, R., and Mukherjee, A. 2014. Cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles towards freshwater sediment microorganisms at low exposure concentrations. *Environmental Research* 135: 333–345. doi:10.1016/j.envres.2014.09.025.
- Kuzmina, V.V. 1996. Influence of age on digestive enzyme activity in some freshwater teleosts. *Aquaculture* 148(1): 25–37. doi:10.1016/S0044-8486(96)01370-1.

- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., and Geffard, O. 2011. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* 159(6): 1682–1691. doi:10.1016/j.envpol.2011.02.038.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.-C., and Ramade, F. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux. Masson.
- Larsson, D.G.J., Adolfsson-Erici, M., Parkkonen, J., Pettersson, M., Berg, A.H., Olsson, P.-E., and Förlin, L. 1999. Ethinyloestradiol — an undesired fish contraceptive? *Aquatic Toxicology* 45(2–3): 91–97. doi:10.1016/S0166-445X(98)00112-X.
- Lazaro-Côté, A., Sadoul, B., Jackson, L.J., and Vijayan, M.M. 2018. Acute stress response of fathead minnows caged downstream of municipal wastewater treatment plants in the Bow River, Calgary. *PLOS ONE* 13(6): e0198177. doi:10.1371/journal.pone.0198177.
- Le Gal, Y., Lagadic, L., Le Bras, S., and Caquet, T. 1997. Charge énergétique en adénylates (CEA) et autres biomarqueurs associés au métabolisme énergétique. In *Biomarqueurs en écotoxicologie : aspects fondamentaux*. L. Lagadic, T. Caquet, J-C. Amiard & F. Ramade.
- Le Guernic, A. 2015, November 24. 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. Université de Reims.
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Bado-Nilles, A., Palluel, O., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Delahaut, L., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.-M., Geffard, A., Betoulle, S., and Gagnaire, B. 2016a. In situ effects of metal contamination from former uranium mining sites on the health of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.). *Ecotoxicology* 25(6): 1234–1259. doi:10.1007/s10646-016-1677-z.
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Turies, C., Chadili, E., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.-M., Geffard, A., Betoulle, S., and Gagnaire, B. 2016b. In situ experiments to assess effects of constraints linked to caging on ecotoxicity biomarkers of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Fish Physiol. Biochem.* 42(2): 643–657. doi:10.1007/s10695-015-0166-2.
- Lee, K.T., Hong, S., Lee, J.S., Chung, K.H., Hilscherová, K., Giesy, J.P., and Khim, J.S. 2013. Revised relative potency values for PCDDs, PCDFs, and non-ortho-substituted PCBs for the optimized H4IIE-luc in vitro bioassay. *Environ Sci Pollut Res Int* 20(12): 8590–8599. doi:10.1007/s11356-013-1770-2.

Lee, S., Shin, W.-H., Hong, S., Kang, H., Jung, D., Yim, U.H., Shim, W.J., Khim, J.S., Seok, C., Giesy, J.P., and Choi, K. 2015. Measured and predicted affinities of binding and relative potencies to activate the AhR of PAHs and their alkylated analogues. *Chemosphere* 139: 23–29. doi:10.1016/j.chemosphere.2015.05.033.

Lenhardt, M., Jaric, I., Cakic, P., Cvijanovic, G., Gacic, Z., and Kolarevic, J. 2009. Seasonal changes in condition, hepatosomatic index and parasitism in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 33(3): 209–214. doi:10.3906/vet-0710-14.

Linde-Arias, A.R., Inácio, A.F., Novo, L.A., de Albuquerque, C., and Moreira, J.C. 2008. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. *Environ. Pollut.* 156(3): 974–979. doi:10.1016/j.envpol.2008.05.006.

Liney, K.E., Hagger, J.A., Tyler, C.R., Depledge, M.H., Galloway, T.S., and Jobling, S. 2006. Health Effects in Fish of Long-Term Exposure to Effluents from Wastewater Treatment Works. *Environ Health Perspect* 114(Suppl 1): 81–89. doi:10.1289/ehp.8058.

Locher, F., and Quenet, G. 2009. L'histoire environnementale : origines, enjeux et perspectives d'un nouveau chantier. *Revue d'histoire moderne et contemporaine* 56–4(4): 7. doi:10.3917/rhmc.564.0007.

Loi du 8 avril 1898 sur le régime des eaux. 1898, April 8. Available from <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000006074261&dateTexte=18980410> [accessed 7 August 2019].

Loi n° 64-1245 du 16 décembre 1964 relative au régime et à la répartition des eaux et à la lutte contre leur pollution. 1964, December 16. Available from https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do;jsessionid=E58509987E46E7D13915668CFBD B8EA1.tplgfr21s_2?cidTexte=JORFTEXT000000509753&dateTexte=20070322 [accessed 7 August 2019].

Loi n° 92-3 du 3 janvier 1992 sur l'eau. 1992, January 3. [accessed 7 August 2019].

Loi n° 2006-1772 du 30 décembre 2006 sur l'eau et les milieux aquatiques. 2006, December 30. [accessed 7 August 2019].

Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., and Wang, X.C. 2014. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science of The Total Environment* 473–474: 619–641. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065.

Lushchak, V.I. 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101(1): 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006.

Lushchak, V.I. 2016. Contaminant-induced oxidative stress in fish: a mechanistic approach. *Fish Physiol. Biochem.* 42(2): 711–747. doi:10.1007/s10695-015-0171-5.

Lushchak, V.I., and Bagnyukova, T.V. 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(4): 390–397. doi:10.1016/j.cbpb.2007.07.007.

Lushchak, V.I., Bagnyukova, T.V., Husak, V.V., Luzhna, L.I., Lushchak, O.V., and Storey, K.B. 2005. Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37(8): 1670–1680. doi:10.1016/j.biocel.2005.02.024.

Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., and Hermes-Lima, M. 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 280(1): R100–R107.

M

Magnadóttir, B. 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20(2): 137–151. doi:10.1016/j.fsi.2004.09.006.

Mailler, R., Gasperi, J., Coquet, Y., Buleté, A., Vulliet, E., Deshayes, S., Zedek, S., Mirand-Bret, C., Eudes, V., Bressy, A., Caupos, E., Moilleron, R., Chebbo, G., and Rocher, V. 2016. Removal of a wide range of emerging pollutants from wastewater treatment plant discharges by micro-grain activated carbon in fluidized bed as tertiary treatment at large pilot scale. *Science of The Total Environment* 542: 983–996. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.153.

Marchand, A. 2018a, December 17. Pertinence écologique des biomarqueurs d'immunotoxicité en surveillance environnementale. Université de Reims Champagne-Ardenne. Available from <http://www.theses.fr/s150258> [accessed 9 August 2019].

Marchand, A. 2018b, December 17. Pertinence écologique des biomarqueurs d'immunotoxicité en surveillance environnementale. Université de Reims Champagne-Ardenne. Available from <http://www.theses.fr/s150258> [accessed 9 August 2019].

Marchand, A., Porcher, J.-M., Turies, C., Chadili, E., Palluel, O., Baudoin, P., Betoulle, S., and Bado-Nilles, A. 2017. Evaluation of chlorpyrifos effects, alone and combined with lipopolysaccharide stress, on DNA integrity and immune responses of the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 145: 333–339. doi:10.1016/j.ecoenv.2017.07.025.

- Marchand, A., Tebby, C., Beaudouin, R., Hani, Y.M.I., Porcher, J.-M., Turies, C., and Bado-Nilles, A. 2019. Modelling the effect of season, sex, and body size on the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, cellular innate immunomarkers: A proposition of laboratory reference ranges. *Science of The Total Environment* 648: 337–349. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.07.381.
- Marigómez, I., Garmendia, L., Soto, M., Orbea, A., Izagirre, U., and Cajaraville, M.P. 2013. Marine ecosystem health status assessment through integrative biomarker indices: a comparative study after the Prestige oil spill “Mussel Watch.” *Ecotoxicology* 22(3): 486–505. doi:10.1007/s10646-013-1042-4.
- Marquis, O., Miaud, C., Ficetola, G.F., Bocher, A., Mouchet, F., Guittonneau, S., and Devaux, A. 2009. Variation in genotoxic stress tolerance among frog populations exposed to UV and pollutant gradients. *Aquat. Toxicol.* 95(2): 152–161. doi:10.1016/j.aquatox.2009.09.001.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., and Sanz, A. 2005. Antioxidant Defenses in Fish: Biotic and Abiotic Factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 15(1–2): 75–88. doi:10.1007/s11160-005-7846-4.
- Mason, S.A., Garneau, D., Sutton, R., Chu, Y., Ehmann, K., Barnes, J., Fink, P., Papazissimos, D., and Rogers, D.L. 2016. Microplastic pollution is widely detected in US municipal wastewater treatment plant effluent. *Environ. Pollut.* 218: 1045–1054. doi:10.1016/j.envpol.2016.08.056.
- Matviishyn, T.M., Kubrak, O.I., Husak, V.V., Storey, K.B., and Lushchak, V.I. 2014. Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Mild in brain and moderate in liver and kidney. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37(2): 861–869. doi:10.1016/j.etap.2014.02.007.
- Mayer, I., Borg, B., Páll, and Páll, M. 2004. Hormonal Control of Male Reproductive Behaviour in Fishes: A Stickleback Perspective. *Behav* 141(11–12): 1499–1510. doi:10.1163/1568539042948141.
- McFarland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., and McCant, D.D. 1999. Biomarkers of Oxidative Stress and Genotoxicity in Livers of Field-Collected Brown Bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37(2): 236–241. doi:10.1007/s002449900510.
- McGovarin, S., Sultana, T., and Metcalfe, C. 2018. Biological Responses in Brook Trout (*Salvelinus fontinalis*) Caged Downstream from Municipal Wastewater Treatment Plants in the

Credit River, ON, Canada. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100(1): 106–111. doi:10.1007/s00128-017-2242-z.

Ménard, L., Escarné, R., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Fournier, M., and Gagné, F. 2010. The impacts of urban pollution on the immune system of spottail shiners. *Fresenius Environmental Bulletin* 19(7): 1369–1374.

Metcalf, C., Hoque, M.E., Sultana, T., Murray, C., Helm, P., and Kleywegt, S. 2014. Monitoring for contaminants of emerging concern in drinking water using POCIS passive samplers. *Environmental Science: Processes & Impacts* 16(3): 473. doi:10.1039/c3em00508a.

Ministère de l'Environnement, de l'Énergie et de la Mer. 2016. Guide technique relatif à l'évaluation de l'état des eaux de surface continentales.

Miquel, G. 2003. Rapport sur la qualité de l'eau et l'assainissement en France. Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.

Modesto, K.A., and Martinez, C.B.R. 2010. Roundup (R) causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 78(3): 294–299. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.10.047.

Morcillo, P., Cordero, H., Meseguer, J., Esteban, M.Á., and Cuesta, A. 2015. In vitro immunotoxicological effects of heavy metals on European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) head-kidney leucocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 47(1): 245–254. doi:10.1016/j.fsi.2015.09.011.

Mourente, G., Díaz-Salvago, E., Bell, J.G., and Tocher, D.R. 2002. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidised oil: attenuation by dietary vitamin E. *Aquaculture* 214(1–4): 343–361. doi:10.1016/S0044-8486(02)00064-9.

Muldoon, B.M., and Hogan, N.S. 2016. Biomarker responses to estrogen and androgen exposure in the brook stickleback (*Culaea inconstans*): A new bioindicator species for endocrine disrupting compounds. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 180: 1–10. doi:10.1016/j.cbpc.2015.10.013.

Murk, A.J., Legler, J., van Lipzig, M.M.H., Meerman, J.H.N., Belfroid, A.C., Spenkeliink, A., van der Burg, B., Rijs, G.B.J., and Vethaak, D. 2002. Detection of estrogenic potency in wastewater and surface water with three in vitro bioassays. *Environ. Toxicol. Chem.* 21(1): 16–23.

N

Nakada, N., Nyunoya, H., Nakamura, M., Hara, A., Iguchi, T., and Takada, H. 2004. Identification of estrogenic compounds in wastewater effluent. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(12): 2807–2815. doi:10.1897/03-699.1.

Nowell, L.H., Moran, P.W., Schmidt, T.S., Norman, J.E., Nakagaki, N., Shoda, M.E., Mahler, B.J., Van Metre, P.C., Stone, W.W., Sandstrom, M.W., and Hladik, M.L. 2018. Complex mixtures of dissolved pesticides show potential aquatic toxicity in a synoptic study of Midwestern U.S. streams. *Science of The Total Environment* 613–614: 1469–1488. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.06.156.

NRC. 1987. Biological markers in environmental health research. Committee on Biological Markers of the National Research Council. *Environ Health Perspect* 74: 3–9.

O

OECD. 2000. Essai n° 215: Poisson, essai sur la croissance des juvéniles. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. Available from <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264070219-fr> [accessed 2 May 2017].

Oehlers, L.P., Perez, A.N., and Walter, R.B. 2007. Detection of hypoxia-related proteins in medaka (*Oryzias latipes*) brain tissue by difference gel electrophoresis and de novo sequencing of 4-sulfophenyl isothiocyanate-derivatized peptides by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 145(1): 120–133. doi:10.1016/j.cbpc.2006.06.005.

Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* 95(2): 351–358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.

Oikari, A. 2006. Caging techniques for field exposures of fish to chemical contaminants. *Aquatic Toxicology* 78(4): 370–381. doi:https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.03.010.

Orbea, A., Fahimi, H.D., and Cajaraville, M.P. 2000. Immunolocalization of four antioxidant enzymes in digestive glands of mollusks and crustaceans and fish liver. *Histochemistry and Cell Biology* 114(393–404): 12. doi:10.1007/s004180000207.

OSPAR Commission. 1992. Convention for the Protection of the Marine Environment of the North-East Atlantic (OSPAR Convention). Available from <https://www.ospar.org/convention/text> [accessed 8 August 2019].

Östlund-Nilsson, S., Mayer, I., and Huntingford, F.A. (Editors). 2007. Biology of the three-spined stickleback. Taylor & Francis, Boca Raton.

P

Palas, S., Hyungjoon, I., Yoo, J., Hwanggoo, L., Nan-Young, K., Wonky, K., Soon-Jin, H., Woo-Keun, K., and Jinho, J. 2018. Comparative assessment of the adverse outcome of wastewater effluents by integrating oxidative stress and histopathological alterations in endemic fish. *J. Hazard. Mater.* 344: 81–89. doi:10.1016/j.jhazmat.2017.10.016.

Pandey, S., Ahmad, I., Parvez, S., Hafeez, B., Haque, R., and Raisuddin, S. 2001. Effect of Endosulfan on Antioxidants of Freshwater Fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection Against Lipid Peroxidation in Liver by Copper Preexposure. *Archives of environmental contamination and toxicology* 41: 345–52. doi:10.1007/s002440010258.

Parihar, M.S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A.K., and 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. *J. Therm. Biol.* 22(2): 151–156. doi:10.1016/S0306-4565(97)00006-5.

Parolini, M., Pedriali, A., and Binelli, A. 2013. Application of a Biomarker Response Index for Ranking the Toxicity of Five Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) to the Bivalve *Dreissena polymorpha*. *Arch Environ Contam Toxicol* 64(3): 439–447. doi:10.1007/s00244-012-9847-3.

Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., López-Barea, J., and Peinado, J. 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). *Chemico-Biological Interactions* 145(2): 191–199. doi:10.1016/S0009-2797(03)00002-4.

Peakall, D., and Walker, C. 1994. The Role of Biomarkers in Environmental Assessment .3. Vertebrates. *Ecotoxicology* 3(3): 173–179. doi:10.1007/BF00117082.

Peakall, D.B., Miller, D.S., and Kinter, W.B. 1975. Blood calcium levels and the mechanism of DDE-induced eggshell thinning. *Environmental Pollution* (1970) 9(4): 289–294. doi:10.1016/0013-9327(75)90061-0.

Pérez, M.R., Rossi, A.S., Bacchetta, C., Elorriaga, Y., Carriquiriborde, P., and Cazenave, J. 2018. In situ evaluation of the toxicological impact of a wastewater effluent on the fish *Prochilodus lineatus*: biochemical and histological assessment. *Ecological Indicators* 84: 345–353. doi:10.1016/j.ecolind.2017.09.004.

Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.-P., Brethes, D., Elie, P., and Massabuau, J.-C. 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* 81(3): 304–311. doi:10.1016/j.aquatox.2006.12.014.

Pignata, C., Fea, E., Rovere, R., Degan, R., Lorenzi, E., de Ceglia, M., Schilirò, T., and Gilli, G. 2012. Chlorination in a wastewater treatment plant: acute toxicity effects of the effluent and of the recipient water body. *Environ Monit Assess* 184(4): 2091–2103. doi:10.1007/s10661-011-2102-y.

Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A., and Regoli, F. 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere* 83(4): 475–485. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.12.064.

Pont, D., and Garric, J. 2010. Quelles nouvelles perspectives pour évaluer la qualité des milieux aquatiques? *Sciences Eaux and Territoires: la Revue du IRSTEA* (1): 52–53. doi:10.14758/SET-REVUE.2010.1.11.

Pottinger, T.G., Carrick, T.R., and Yeomans, W.E. 2002. The three-spined stickleback as an environmental sentinel: effects of stressors on whole-body physiological indices. *Journal of Fish Biology* 61(1): 207–229. doi:10.1111/j.1095-8649.2002.tb01747.x.

Purchase, C.F., and Brown, J.A. 2001. Stock-specific changes in growth rates, food conversion efficiencies, and energy allocation in response to temperature change in juvenile Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* 58(1): 36–52. doi:10.1111/j.1095-8649.2001.tb00497.x.

Q

Qu, R., Feng, M., Wang, X., Qin, L., Wang, C., Wang, Z., and 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. doi:10.1016/j.aquatox.2014.02.008.

R

Rao, J.V., Begum, G., Pallela, R., Usman, P.K., and Rao, R.N. 2005. Changes in Behavior and Brain Acetylcholinesterase Activity in Mosquito Fish, *Gambusia affinis* in Response to the Sub-Lethal Exposure to Chlorpyrifos. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2(3): 478–483. doi:10.3390/ijerph2005030013.

Ray, P.D., Huang, B.-W., and Tsuji, Y. 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* 24(5): 981–990. doi:10.1016/j.cellsig.2012.01.008.

Rehberger, K., Werner, I., Hitzfeld, B., Segner, H., and Baumann, L. 2017. 20 Years of fish immunotoxicology - what we know and where we are. *Crit. Rev. Toxicol.* 47(6): 509–535. doi:10.1080/10408444.2017.1288024.

Reyjol, Y., Spyrtos, V., and Basilico, L. 2013. Bioindication: des outils pour évaluer l'état écologique des milieux aquatiques. Perspectives en vue du 2e cycle DCE–Eaux de surface continentales. Les rencontres de l'Onema. Available from <http://www.gesteau.eaufrance.fr/sites/default/files/bioindication-outils-d-evaluation.pdf> [accessed 11 June 2015].

Reynaud, S., and Deschaux, P. 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquat. Toxicol.* 77(2): 229–238. doi:10.1016/j.aquatox.2005.10.018.

Ribeiro, S., Sousa, J.P., Nogueira, A.J.A., and Soares, A. 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 49(2): 131–138. doi:10.1006/eesa.2001.2045.

Roberts, D.R., Laughlin, L.L., Hsueh, P., and Legters, L.J. 1997. DDT, global strategies, and a malaria control crisis in South America. *Emerg Infect Dis* 3(3): 295–302.

Rodgers-Gray, T.P., Jobling, S., Morris, S., Kelly, C., Kirby, S., Janbakhsh, A., Harries, J.E., Waldock, M.J., Sumpter, J.P., and Tyler, C.R. 2000. Long-Term Temporal Changes in the Estrogenic Composition of Treated Sewage Effluent and Its Biological Effects on Fish. *Environ. Sci. Technol.* 34(8): 1521–1528. doi:10.1021/es991059c.

Rodrigues, S., Antunes, S.C., Correia, A.T., and Nunes, B. 2018. Ecotoxicological evaluation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) exposed to the antibiotic oxytetracycline using a multibiomarker approach. *Marine Environmental Research* 141: 233–246. doi:10.1016/j.marenvres.2018.09.009.

Roméu, M., and Giambérini, L. 2013. History of biomarkers. In *Ecological Biomarkers: Indicators of Ecotoxicological Effects*. CRC Press Boca Raton, USA. pp. 15–44. Available from <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=Qi7DVCCHGeoC&oi=fnd&pg=PA15&dq=%20of+the+environment+was+based+on+conventional+chemical+methods+of%22+%22synergy+and+antagonism.+The+concept+of+biological+monitoring,+based+on+the+study%22+%22>

2historical+development+of+the+biomarker+approach+has+been+closely+related+to%22+&ots=Tuu4eL7zzb&sig=yIk_3Du9c5VsnSXNKv2EE0rJDuY [accessed 29 August 2017].

Ronisz, D., Larsson, D.G.J., and Förlin, L. 2000. Seasonal variations in the activity of selected hepatic biotransformation and antioxidant enzymes in eelpout (*Zoarces viviparus*). *Marine Environmental Research* 50(1): 438–439. doi:10.1016/S0141-1136(00)00213-0.

Rotchell, J.M., and Ostrander, G.K. 2003. Molecular markers of endocrine disruption in aquatic organisms. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 6(5): 453–496. doi:10.1080/10937400306476.

Roussel, F. 2016, November. La Suisse généralise le traitement des micropolluants dans ses stations d'épuration. *Environnement & Technique (Hors-série)*: 14–15.

S

Salo, H., Hebert, N., Dautremepuits, C., Cejka, P., Cyr, D., and Fournier, M. 2007. Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 84(4): 406–414. doi:10.1016/j.aquatox.2007.06.014.

Sanchez, W. 2007, September 6. Approche multi-biomarqueurs chez l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus* L.): un modèle pour la surveillance des écosystèmes aquatiques continentaux. phdthesis, Museum national d'histoire naturelle - MNHN PARIS. Available from <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00175398/document> [accessed 15 December 2016].

Sanchez, W., Aït-Aïssa, S., Palluel, O., Ditche, J.-M., and Porcher, J.-M. 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16(2): 279–287. doi:10.1007/s10646-006-0131-z.

Sanchez, W., Bado-Nilles, A., and Porcher, J.-M. 2012. Biomarqueurs chez le poisson : un outil d'intérêt pour le contrôle d'enquête. *La Houille Blanche* (2): 49–54. doi:10.1051/lhb/2012015.

Sanchez, W., Burgeot, T., and Porcher, J.-M. 2013. A novel "Integrated Biomarker Response" calculation based on reference deviation concept. *Environ Sci Pollut Res* 20(5): 2721–2725. doi:10.1007/s11356-012-1359-1.

Sanchez, W., Goin, C., Brion, F., Olsson, P.E., Goksøyr, A., and Porcher, J.-M. 2008a. A new ELISA for the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) spiggin, using antibodies against synthetic peptide. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 147(1): 129–137. doi:10.1016/j.cbpc.2007.08.007.

- Sanchez, W., Katsiadaki, I., Piccini, B., Ditché, J.-M., and Porcher, J.-M. 2008b. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. *Environment International* 34(4): 490–498. doi:10.1016/j.envint.2007.11.003.
- Sanchez, W., Palluel, O., Lagadic, L., Aït-Aïssa, S., and Porcher, J.M. 2006. Biochemical effects of nonylphenol polyethoxylate adjuvant, Diquat herbicide and their mixture on the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Marine Environmental Research* 62, suppl. 1: S29–S33. doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.028.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.-M., and Aït-Aïssa, S. 2005. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19(1): 177–183. doi:10.1016/j.etap.2004.07.003.
- Sanchez, W., Piccini, B., Ditché, J.-M., and Porcher, J.-M. 2008c. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: Implication for environmental biomonitoring. *Environment International* 34(6): 791–798. doi:10.1016/j.envint.2008.01.005.
- Sanchez, W., Piccini, B., and Porcher, J.-M. 2008d. Effect of prochloraz fungicide on biotransformation enzymes and oxidative stress parameters in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.). *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 43(1): 65–70. doi:10.1080/03601230701735151.
- Sanchez, W., and Porcher, J.-M. 2009. Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(2): 150–158. doi:10.1016/j.trac.2008.10.012.
- Sanchez, W., Sremski, W., Piccini, B., Palluel, O., Maillot-Marechal, E., Betoulle, S., Jaffal, A., Ait-Aïssa, S., Brion, F., Thybaud, E., Hinfrey, N., and Porcher, J.-M. 2011. Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environ. Int.* 37(8): 1342–1348. doi:10.1016/j.envint.2011.06.002.
- Sanders, B.M. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Crit. Rev. Toxicol.* 23(1): 49–75. doi:10.3109/10408449309104074.
- Santos, R. 2013. Un biomarqueur de génotoxicité chez l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) : application au biomonitoring et étude de sa valeur prédictive en écotoxicologie. Lyon, INSA. Available from <http://www.theses.fr/2013ISAL0005> [accessed 29 May 2017].
- Santos, R., Joyeux, A., Palluel, O., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Blanchard, C., Porcher, J.M., Bony, S., Devaux, A., and Sanchez, W. 2016. Characterization of a genotoxicity

biomarker in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): Biotic variability and integration in a battery of biomarkers for environmental monitoring. *Environ. Toxicol.* 31(4): 415–426. doi:10.1002/tox.22055.

Santos, R., Palos-Ladeiro, M., Besnard, A., Vulliet, E., Porcher, J.M., Bony, S., Devaux, A., and Sanchez, W. 2014. Kinetic response of a genotoxicity biomarker in the three-spined stickleback and implication for environmental monitoring. *Ecotox. Environ. Safe.* 102: 6–11. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.01.006.

Sayeed, I., Parvez, S., Pandey, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., and Raisuddin, S. 2003. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56(2): 295–301. doi:10.1016/S0147-6513(03)00009-5.

Schwarzenbach, R.P., Egli, T., Hofstetter, T.B., von Gunten, U., and Wehrli, B. 2010. Global Water Pollution and Human Health. *Annual Review of Environment and Resources* 35(1): 109–136. doi:10.1146/annurev-environ-100809-125342.

Selvaraj, V., Armistead, M.Y., Cohenford, M., and Murray, E. 2013. Arsenic trioxide (As₂O₃) induces apoptosis and necrosis mediated cell death through mitochondrial membrane potential damage and elevated production of reactive oxygen species in PLHC-1 fish cell line. *Chemosphere* 90(3): 1201–1209. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.09.039.

Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., and Svobodova, Z. 2011. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinarni Medicina* 56(No. 11): 537–546. doi:10.17221/4272-VETMED.

Sevgiler, Y., Oruç, E.Ö., and Üner, N. 2004. Evaluation of etoxazole toxicity in the liver of *Oreochromis niloticus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 78(1): 1–8. doi:10.1016/j.pestbp.2003.09.004.

Shoda, M.E., Sprague, L.A., Murphy, J.C., and Riskin, M.L. 2019. Water-quality trends in U.S. rivers, 2002 to 2012: Relations to levels of concern. *Science of The Total Environment* 650: 2314–2324. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.09.377.

Síma, J., Pazdernik, M., Triska, J., and Svoboda, L. 2013. Degradation of surface-active compounds in a constructed wetland determined using high performance liquid chromatography and extraction spectrophotometry. *Journal of environmental science and health. Part A, Toxic/hazardous substances & environmental engineering* 48: 559–67. doi:10.1080/10934529.2013.730453.

- Simmons, D.B.D., Miller, J., Clarence, S., McCallum, E.S., Balshine, S., Chandramouli, B., Cosgrove, J., and Sherry, J.P. 2017. Altered expression of metabolites and proteins in wild and caged fish exposed to wastewater effluents in situ. *Sci Rep* 7(1): 1–14. doi:10.1038/s41598-017-12473-6.
- Siscar, R., Torreblanca, A., Palanques, A., and Solé, M. 2013. Metal concentrations and detoxification mechanisms in *Solea solea* and *Solea senegalensis* from NW Mediterranean fishing grounds. *Marine Pollution Bulletin* 77(1): 90–99. doi:10.1016/j.marpolbul.2013.10.026.
- Slaninova, A., Smutna, M., Modra, H., and Svobodova, Z. 2009. A review: oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuro Endocrinol. Lett.* 30 Suppl 1: 2–12.
- Sobjak, T.M., Romão, S., do Nascimento, C.Z., dos Santos, A.F.P., Vogel, L., and Guimarães, A.T.B. 2017. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. *Chemosphere* 182: 267–275. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.05.031.
- Stancova, V., Plhalova, L., Blahova, J., Zivna, D., Bartoskova, M., Siroka, Z., Marsalek, P., and Svobodova, Z. 2017. Effects of the pharmaceutical contaminants ibuprofen, diclofenac, and carbamazepine alone, and in combination, on oxidative stress parameters in early life stages of tench (*Tinca tinca*). *Veterinární Medicína* 62(No. 2): 90–97. doi:10.17221/125/2016-VETMED.
- Stentiford, G.D., Bignell, J.P., Lyons, B.P., Thain, J.E., and Feist, S.W. 2010. Effect of age on liver pathology and other diseases in flatfish: implications for assessment of marine ecological health status. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 411: 215–230. doi:10.3354/meps08693.
- Stien, X., Percic, P., Gnassia-Barelli, M., Roméo, M., and Lafaurie, M. 1998. Evaluation of biomarkers in caged fishes and mussels to assess the quality of waters in a bay of the NW Mediterranean Sea. *Environmental Pollution* 99(3): 339–345.
- Stoliar, O.B., and Lushchak, V.I. 2012. Environmental pollution and oxidative stress in fish. INTECH Open Access Publisher. Available from <http://cdn.intechopen.com/pdfs/36262.pdf> [accessed 12 January 2017].
- Sturm, A., Wogram, J., Hansen, P.-D., and 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(2): 194–200.

Sturve, J., Almroth, B.C., and Förlin, L. 2008. Oxidative stress in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to sewage treatment plant effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70(3): 446–452. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.12.004.

Svecevič ius, G. 2006. Acute Toxicity of Hexavalent Chromium to European Freshwater Fish. *Bull Environ Contam Toxicol* 77(5): 741–747. doi:10.1007/s00128-006-1126-4.

T

Tellez-Bañuelos, M.C., Santerre, A., Casas-Solis, J., Bravo-Cuellar, A., and Zaitseva, G. 2009. Oxidative stress in macrophages from spleen of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to sublethal concentration of endosulfan. *Fish & Shellfish Immunology* 27(2): 105–111. doi:10.1016/j.fsi.2008.11.002.

Tetreault, G.R., Bennett, C.J., Shires, K., Knight, B., Servos, M.R., and McMaster, M.E. 2011. Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. *Aquat. Toxicol.* 104(3–4): 278–290. doi:10.1016/j.aquatox.2011.05.008.

Thannickal, V.J., and Fanburg, B.L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279(6): L1005-1028. doi:10.1152/ajplung.2000.279.6.L1005.

Thomaz, J.M., Martins, N.D., Monteiro, D.A., Rantin, F.T., and Kalinin, A.L. 2009. Cardio-respiratory function and oxidative stress biomarkers in Nile tilapia exposed to the organophosphate insecticide trichlorfon (NEGUVON®). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(5): 1413–1424. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.11.003.

Toro-Vélez, A.F., Madera-Parra, C.A., Peña-Varón, M.R., Lee, W.Y., Bezares- Cruz, J.C., Walker, W.S., Cárdenas-Henao, H., Quesada-Calderón, S., García-Hernández, H., and Lens, P.N.L. 2016. BPA and NP removal from municipal wastewater by tropical horizontal subsurface constructed wetlands. *Science of The Total Environment* 542: 93–101. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.154.

Trevisan, R., Uliano-Silva, M., Franco, J.L., Posser, T., Hoppe, R., Farina, M., Bainy, A.C.D., and Dafre, A.L. 2013. Confinement during field studies may jeopardize antioxidant and physiological responses of Nile tilapia to contaminants. *Marine Environmental Research* 91: 97–103. doi:10.1016/j.marenvres.2013.07.005.

Triebkorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S.M., and Müller, E.F. 1997. Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in

the field? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6(1): 57–73. doi:10.1023/A:1008224301117.

Truhaut, R. 1975. Ecotoxicology—A New Branch of Toxicology: A General Survey of its Aims Methods, and Prospects. In *Ecological Toxicology Research*. Edited by A.D. McIntyre and C.F. Mills. Springer US, Boston, MA. pp. 3–23. doi:10.1007/978-1-4615-8945-7_1.

Turja, R., Lehtonen, K.K., Meierjohann, A., Brozinski, J.-M., Vahtera, E., Soirinsuo, A., Sokolov, A., Snoeijs, P., Budzinski, H., Devier, M.-H., Peluhet, L., Pääkkönen, J.-P., Viitasalo, M., and Kronberg, L. 2015. The mussel caging approach in assessing biological effects of wastewater treatment plant discharges in the Gulf of Finland (Baltic Sea). *Marine Pollution Bulletin* 97(1–2): 135–149. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.06.024.

U

Uribe, C., Folch, H., Enriquez, R., and Moran, G. 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinari Medicina* 56(No. 10): 486–503. doi:10.17221/3294-VETMED.

V

Vaccaro, E., Meucci, V., Intorre, L., Soldani, G., Di Bello, D., Longo, V., Gervasi, P.G., and Pretti, C. 2005. Effects of 17 β -estradiol, 4-nonylphenol and PCB 126 on the estrogenic activity and phase 1 and 2 biotransformation enzymes in male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Toxicology* 75(4): 293–305. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.009.

Vajda, A.M., Barber, L.B., Gray, J.L., Lopez, E.M., Bolden, A.M., Schoenfuss, H.L., and Norris, D.O. 2011. Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. *Aquatic Toxicology* 103(3–4): 213–221. doi:10.1016/j.aquatox.2011.02.007.

Vajda, A.M., Barber, L.B., Gray, J.L., Lopez, E.M., Woodling, J.D., and Norris, D.O. 2008. Reproductive Disruption in Fish Downstream from an Estrogenic Wastewater Effluent. *Environ. Sci. Technol.* 42(9): 3407–3414. doi:10.1021/es0720661.

Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., and Scoullou, M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64(2): 178–189. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.013.

Van der Oost, R., Beyer, J., and Vermeulen, N.P. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental toxicology and pharmacology* 13(2): 57–149. doi:https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6.

Vargas-Chacoff, L., Martínez, D., Oyarzún, R., Nualart, D., Olavarría, V., Yáñez, A., Bertrán, C., Ruiz-Jarabo, I., and Mancera, J.M. 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 Immunology* 40(2): 424–434. doi:10.1016/j.fsi.2014.07.024.

Viarengo, A., Canesi, L., Pertica, M., Livingstone, D., and Orunesu, M. 1991. Age-Related Lipid-Peroxidation in the Digestive Gland of Mussels - the Role of the Antioxidant Defense Systems. *Experientia* 47(5): 454–457. doi:10.1007/BF01959942.

Vie publique. 2017, May 23. Chronologie - Les dates de la politique de l'eau. text. Available from <https://www.vie-publique.fr/politiques-publiques/politique-eau-qualite/chronologie/> [accessed 7 August 2019].

Vieira, C.E.D., Costa, P.G., Cabrera, L.C., Primel, E.G., Fillmann, G., Bianchini, A., and Bueno Dos Reis Martinez, C. 2017. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural areas. *Sci. Total Environ.* 586: 598–609. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.02.026.

Vinagre, C., Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H.N., and 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. doi:10.1016/j.ecolind.2012.04.009.

Vincze, K., Scheil, V., Kuch, B., Koehler, H.R., and Triebkorn, R. 2015. Impact of wastewater on fish health: a case study at the Neckar River (Southern Germany) using biomarkers in caged brown trout as assessment tools. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22(15): 11822–11839. doi:10.1007/s11356-015-4398-6.

Vörösmarty, C.J., McIntyre, P.B., Gessner, M.O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., Glidden, S., Bunn, S.E., Sullivan, C.A., Liermann, C.R., and Davies, P.M. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature* 467(7315): 555–561. doi:10.1038/nature09440.

W

Wang, J., Ma, S., Zhang, Z., Zheng, M., Dong, Y., and Ru, S. 2017. Vitellogenin induction in caudal fin of guppy (*Poecilia reticulata*) as a less invasive and sensitive biomarker for environmental estrogens. *Sci Rep* 7: 7647. doi:10.1038/s41598-017-06670-6.

Wernersson, A.-S., Carere, M., Maggi, C., Tusil, P., Soldan, P., James, A., Sanchez, W., Dulio, V., Broeg, K., Reifferscheid, G., Buchinger, S., Maas, H., Van Der Grinten, E., O'Toole, S., Ausili, A., Manfra, L., Marziali, L., Polesello, S., Lacchetti, I., Mancini, L., Lilja, K., Linderoth, M., Lundeberg, T., Fjällborg, B., Porsbring, T., Larsson, D.J., Bengtsson-Palme, J., Förlin, L., Kienle, C., Kunz, P., Vermeirssen, E., Werner, I., Robinson, C.D., Lyons, B., Katsiadaki, I., Whalley, C., den Haan, K., Messiaen, M., Clayton, H., Lettieri, T., Carvalho, R.N., Gawlik, B.M., Hollert, H., Di Paolo, C., Brack, W., Kammann, U., and Kase, R. 2015. The European technical report on aquatic effect-based monitoring tools under the water framework directive. *Environmental Sciences Europe* 27(1): 7. doi:10.1186/s12302-015-0039-4.

Whatley, A. 2010. Cytochrome P450 Induction and Gene Expression in Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*) Following Wastewater Treatment Plant Effluent Exposure in Field and Laboratory Settings. *Journal of Environmental Protection* 01: 362–373. doi:10.4236/jep.2010.14042.

Whyte, J.J., Jung, R.E., Schmitt, C.J., and Tillitt, D.E. 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 30(4): 347–570. doi:10.1080/10408440091159239.

Wirzinger, G., Weltje, L., Gercken, J., and Sordyl, H. 2007. Genotoxic damage in field-collected three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.): A suitable biomonitoring tool? *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 628(1): 19–30. doi:10.1016/j.mrgentox.2006.11.011.

Woodling, J.D., Lopez, E.M., Maldonado, T.A., Norris, D.O., and Vajda, A.M. 2006. Intersex and other reproductive disruption of fish in wastewater effluent dominated Colorado streams. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 144(1): 10–15. doi:10.1016/j.cbpc.2006.04.019.

Wootton, R.J. 1976. *The biology of the sticklebacks*. Academic Press.

Wootton, R.J. 1984. *A Functional Biology of Sticklebacks*. University of California Press.

Wootton, R.J. 1985. Effects of Food and Density on the Reproductive Biology of the Threespine Stickleback with a Hypothesis on Population Limitation in Sticklebacks. *Behaviour* 93(1/4): 101–111.

Wootton, R.J. 1994. Energy allocation in the threespine stickleback. In *The Evolutionary Biology of the Threespine Stickleback*. Edited by M.A. Bell and S.A. Foster. Oxford University. pp. 114–140.

Wootton, R.J., Evans, G.W., and Mills, L. 1978. Annual cycle in female three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus* L.) from an upland and lowland population. *Journal of Fish Biology* 12(4): 331–343.

X

Xing, H., Liu, T., Zhang, Z., Wang, X., and Xu, S. 2015. Acute and subchronic toxic effects of atrazine and chlorpyrifos on common carp (*Cyprinus carpio* L.): Immunotoxicity assessments. *Fish & Shellfish Immunology* 45(2): 327–333. doi:10.1016/j.fsi.2015.04.016.

Xu, H., Dong, X., Zhang, Z., Yang, M., Wu, X., Liu, H., Lao, Q., and Li, C. 2015. Assessment of immunotoxicity of dibutyl phthalate using live zebrafish embryos. *Fish & Shellfish Immunology* 45(2): 286–292. doi:10.1016/j.fsi.2015.04.033.

Z

Zamal, H., and Ollevier, F. 1995. Effect of feeding and lack of food on the growth, gross biochemical and fatty acid composition of juvenile catfish. *Journal of Fish Biology* 46(3): 404–414. doi:10.1111/j.1095-8649.1995.tb05980.x.

Zambonino, I.J.L., and Cahu, C.L. 1994. Influence of diet on pepsin and some pancreatic enzymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* 109(2): 209–212. doi:https://doi.org/10.1016/0300-9629(94)90122-8.

Zheng, Y., Qiu, L.P., Meng, S.L., Fan, L.M., Song, C., Li, D.D., Zhang, C., and Chen, J.Z. 2016. Effect of polychlorinated biphenyls on oxidation stress in the liver of juvenile GIFT, *Oreochromis niloticus*. *Genet. Mol. Res.* 15(3). doi:10.4238/gmr.15038613.

Résumé :

Le développement des activités anthropiques a engendré la production et la diffusion de nombreux contaminants chimiques dans les milieux aquatiques. Afin d'évaluer l'état des masses d'eau et de prédire les impacts de cette contamination générale sur les organismes vivants et sur les écosystèmes, différents outils ont été développés. Parmi ces outils, les biomarqueurs présentent un intérêt particulier, lié à leur grande sensibilité et leur précocité de réponse. Ils peuvent être utilisés sur des organismes autochtones prélevés directement dans les milieux d'intérêt, ou sur des individus issus du laboratoire et importés sur les sites d'études via des dispositifs d'encagement. Cette seconde approche, dite de biosurveillance active, permet de s'affranchir d'un certain nombre de biais liés aux incertitudes concernant les individus sauvages (historique, temps d'exposition, adaptation) et permet également l'évaluation de sites sur lesquels l'espèce modèle est absente ou menacée. Cette méthodologie active semble également plus appropriée pour définir un référentiel visant à la comparaison de sites sur une échelle géographique importante. Dans ce contexte, le travail réalisé a pour objectif d'évaluer la pertinence de l'utilisation en biosurveillance active d'une espèce modèle bien documentée en écologie : l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*). Les réponses biologiques étudiées portent sur plusieurs fonctions physiologiques (système antioxydant et dommages oxydatifs, enzymes de biotransformation, système reproducteur, transmission synaptique et système immunitaire inné) afin d'être représentatives de l'état de santé global des individus. Dans un premier temps, les effets du confinement ainsi que de la restriction d'accès à la nourriture induits par l'encagement sur la batterie de biomarqueurs ont été caractérisés afin de permettre une interprétation correcte et rigoureuse des résultats. L'approche a ensuite été déployée in situ dans le but (i) d'évaluer l'efficacité d'une zone humide tampon construite en aval d'une station de traitement des eaux usées (STEU), (ii) d'évaluer l'effet potentiel de plusieurs effluents de STEU sur le milieu récepteur et (iii) de discriminer les différents sites le long du bassin de la Meuse (programme Interreg DIADeM). Le déploiement des outils dans ce contexte a mis en évidence la pertinence de l'espèce modèle et des biomarqueurs sélectionnés dans la caractérisation des effets sur les milieux aquatiques de ce type d'installation. A une plus large échelle, les outils ont permis de discriminer les différents sites en fonction des réponses physiologiques modulées. Les travaux ont ainsi mis en évidence tout le potentiel d'une approche multibiomarqueurs en biosurveillance active dans l'évaluation et la caractérisation des milieux aquatiques.

Mots clés : Encagement ; Biomarqueurs ; Poisson ; Ecotoxicologie ; Station d'épuration

Abstract:

Many chemical contaminants have been produced and spread into aquatic environments and given rise to anthropogenic activities. In order to assess and predict the impacts of this contamination on organisms and ecosystems, several tools were developed. Among them, biomarkers have been shown to be sensible and early indicators of a perturbation at sub individual level. These physiological responses can be measured in native individuals as well as in individuals from husbandry imported on the field through caging systems. This latter approach, mostly known as active biomonitoring approach, brings with it the ability to overcome some confounding factors present when native individuals are used (history, exposure time, adaptation mechanism). Additionally, the use of imported individuals enables the study of sites in which the model species is endangered or absent. This active methodology also seems more effective in defining reference levels for the comparison of sites over large geographic scales. In this context, the present work aims to assess the relevance of using a new model species in active biomonitoring approach: the three spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). Several physiological functions have been chosen to be representative of the global health of individuals (antioxidant system and oxidative damages, biotransformation enzymes, reproduction system, innate immune system, synaptic transmission). As a first step, the effect of a restricted access to food and the confinement induced by caging conditions have been characterized in two seasons with the aim to ensure a correct and thorough interpretation of the results. Then, the approach has been deployed on the field (i) to assess the efficiency of a constructed wetland built downstream a wastewater treatment plant (WWTP), (ii) to assess the potential effects of several effluents of WWTP and (ii) to discriminate different sites along the Meuse basin (Interreg DIADeM program). Findings have been encouraging in highlighting the relevance of the three spined stickleback as a sentinel species and the selected biomarkers in this context of contamination in active biomonitoring. In a larger scale, these same tools have made it possible to discriminate the different sites in the Meuse basin according to the modulated physiological functions. Thus, this work has demonstrated the potential of the multibiomarker approach in active biomonitoring with the three spined stickleback in the assessment and the characterization of water quality.

Keywords: Caging ; Biomarkers ; Fish ; Ecotoxicology ; Wastewater treatment plant

Laboratoire : Institut National de l'Environnement et des Risques (INERIS), rue Jacques Taffanel, 60550 Verneuil-en-Halatte