

PROJET PHYPAT

Réponses physiologiques aux stress multiples et conséquences pour les interactions hôte-pathogènes chez les poissons

Lisa Jacquin & Jessica Côte, Laboratoire Evolution & Diversité Biologique EDB, Université Toulouse 3 Paul Sabatier, CNRS, IRD

lisa.jacquin@univ-tlse3.fr



Financeurs : Cette étude a été financée par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne, le CNRS (ECODYN EC2CO, ZA PYGAR), et l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier. Le laboratoire EDB fait partie du Laboratoire d'Excellence TULIP.



AGENCE DE L'EAU
ADOUR-GARONNE



ZA Zones Ateliers
ITER FRANCE



UNIVERSITÉ
TOULOUSE III
PAUL SABATIER
Université de Toulouse

Contenu de la prestation :

- Mise en œuvre de biomarqueurs d'état de santé de poissons dans le bassin Adour-Garonne
- Analyses statistiques des effets des stress environnementaux
- Production d'un site web sur le projet <https://despoissonsetdeshommesblog.wordpress.com/>
- Rédaction d'un rapport d'étude pour l'Agence de l'Eau et de publications scientifiques (5 articles publiés, 1 thèse soutenue)

Porteuses : Lisa Jacquin & Jessica Côte, laboratoire EDB, UPS ; CNRS ; IRD

Collaborateurs: Séverine Jean, Pascal Laffaille, Quentin Petitjean, Joël White, Aurélie Goutte, Noélie Molbert, Raphaël Santos, Michel LeHénaff, Charlotte Veyssiére, Simon Blanchet, Géraldine Loot. **Laboratoires et tutelles :** Laboratoires EDB, Ecolab, SETE Moulis. Université Paul Sabatier ; CNRS ; IRD ; ENSAT-INPT ; Bordeaux Sciences Agro ; EPHE.

Publications scientifiques issues de l'étude :

Articles publiés: Jacquin L, Petitjean Q, Côte J, Laffaille P, Jean S. 2020 Effects of pollution on fish behavior and cognition: some research perspectives. *Frontiers in Ecology & Evolution*. doi.org/ 10.3389/fevo.2020.00086
Petitjean Q, S Jean, J Côte, A Lamarins, R Santos, A Perrault, P Laffaille, L Jacquin. 2020. Combined effects of temperature and immune challenge in two wild gudgeon populations. *Fish Physiology and Biochemistry*. 46:157–176

Côte Jessica, Pilissi C, Morisseau O, Veyssiére C, Perrault A, Jean S, Blanchet S, Jacquin L. 2019. Water turbidity affects melanin-based coloration in gudgeon: a reciprocal transplant experiment. *Biological Journal of the Linnean Society*, 4128: 451–459

Petitjean Q, Jean S, Gandar A, Côte J, Laffaille P, Jacquin L. 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Science of the Total Environment*, 684: 371-380.

Côte Jessica, Boniface A, Blanchet S, Hendry AP, Gasparini J, Jacquin L. 2018. Melanin-based coloration and host-parasite interactions under global change. *Proceedings of the Royal Society B*, 285: 20180285.

Thèse soutenue : Petitjean Quentin. Variabilité de réponses au stress multiples chez le goujon. *Thèse de l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier*. Soutenue le 17 décembre 2019.

Articles en cours : J Côte, O Morisseau, C Pilissi, C Veyssiére, A Perrault, C Jezequel, P Laffaille, G Loot, S Blanchet, S Jean, L Jacquin. Morphological and physiological divergence along gradients of urbanization and eutrophication in fish. *Under revisions in Freshwater Biology*

Q Petitjean, L Jacquin, M LeHénaff, A Perrault, M Cousseau, P Laffaille, S Jean. Physiological and behavioral costs of immune challenge in fish. *Submitted to Journal of Experimental Zoology*

Petitjean Q, S Jean, J Côte, A Perrault, P Laffaille, L Jacquin. Multiple stressors effects on metal bioaccumulation and fish health: a field study in the common gudgeon. *Submitted to STOTEN*

Petitjean Q., Jacquin L., Perrault A., Cousseau M, Laffaille P., Jean S., Variability of responses to contamination among wild fish populations: a reciprocal transplant experiment. *In prep*

RESUME

L'objectif de cette étude était de caractériser les effets des stress environnementaux liés aux activités humaines sur les poissons d'eau douce du bassin Adour-Garonne. Dans un premier temps, deux synthèses de la littérature ont été produites pour répertorier les effets connus des stress multiples (pollution, température, parasites) sur la physiologie, le comportement et l'évolution des poissons d'eau douce, des molécules aux populations. Ces synthèses soulignent l'importance de prendre en compte les **stress multiples** et la **variabilité de réponses entre populations** pour mieux anticiper les effets des stress actuels et futurs sur la faune aquatique. Le projet a ensuite été divisé en 3 objectifs :

O1. Le premier objectif était de caractériser les stress physicochimiques multiples dans **18 sites naturels ou impactés par des activités** agricoles, urbaines et industrielles dans le bassin Adour-Garonne. Les résultats montrent que les **sites agricoles** étaient les plus dégradés en termes de qualité de l'eau, avec une surcharge en azote, phosphate et matière organique (**eutrophisation**). Les sites urbains étaient assez peu impactés, avec principalement une hausse des températures. De plus, certains sites industriels et agricoles étaient caractérisés par une **contamination métallique** importante (notamment Cu, Zn et Cd).

O2. Le second objectif était de tester les impacts de ces stress chimiques (notamment eutrophisation et contamination métallique) sur l'état de santé des poissons, à l'aide d'une combinaison de biomarqueurs. Le **goujon *Gobio occitaniae*** a été choisi comme espèce modèle, en raison de sa grande variabilité intraspécifique et de son mode de vie benthique. L'eutrophisation affectait principalement la morphologie, mais pas la physiologie ni la charge parasitaire des poissons. La **contamination métallique** provoquait une accumulation de lipides et une bioaccumulation de métaux dans les muscles des poissons, qui entraînait une **inflammation** et des **lésions cellulaires** internes sévères (notamment dans le foie). Par ailleurs, la température amplifiait les effets négatifs de la contamination sur la croissance des poissons. Ces résultats soulignent la nécessité de prendre en compte les **stress multiples** et leurs effets interactifs complexes sur les organismes.

O3. Le troisième objectif était de comparer les **capacités d'adaptation** de différentes populations selon leur historique de contamination. Les résultats mettaient en évidence une forte **divergence phénotypique** et physiologique entre populations, supérieure à la divergence génétique neutre (approche Pst-Fst) suggérant une **sélection naturelle** importante liée aux activités humaines. Des expériences de transplantation en rivière (caging) ont ensuite montré que les populations de rivières polluées avaient de meilleures capacités d'ajustement physiologique à la contamination, ce qui suggérait une **adaptation locale aux stress chimiques**, bien que les mécanismes évolutifs sous-jacents restent à déterminer.

Cette étude souligne donc l'importance de prendre en compte l'historique d'exposition et la **variabilité de sensibilité entre populations** sauvages pour mieux anticiper les effets des stress actuels et futurs sur les organismes aquatiques.

Table des matières

INTRODUCTION	5
1. Contexte scientifique et état de l'art	5
2. Objectifs scientifiques	7
METHODES	8
1. Espèce modèle	8
2. Sites d'études	9
3. Physicochimie	10
4. Contamination inorganique aux métaux lourds	12
5. Contamination organique	14
6. Analyses génétiques	15
7. Morphologie et coloration	16
8. Parasites et lésions externes	18
9. Condition et croissance	19
10. Réserves énergétiques et immunité	19
11. Lésions cellulaires internes	21
12. Télomères	22
13. Expériences d'engagement en rivière	22
14. Analyses statistiques	25
RESULTATS	27
1. Usage des sols et physicochimie	27
2. Contamination aux métaux lourds	28
3. Morphologie	28
4. Coloration mélanique	30
5. Condition et croissance	31
6. Infection parasitaire	32
7. Bioaccumulation	32
8. Réserves énergétiques	33
9. Immunité	33
10. Lésions cellulaires	34
11. Télomères	34
12. Génétique	34
13. Adaptation locale : engagement en rivière	36
DISCUSSION	38
O1 : caractérisation des stress environnementaux	38
O2 : effets des stress sur l'état de santé des poissons	39
O3 : variabilité de sensibilité et adaptation locale	41
REFERENCES	43

INTRODUCTION

1. Contexte scientifique et état de l'art

Les activités humaines peuvent avoir des conséquences importantes sur la qualité de l'eau et la biodiversité aquatique, mais ces effets restent difficiles à caractériser en milieu naturel (Schinegger et al., 2016, 2018). En particulier, les **stress chimiques** causés par les activités agricoles, urbaines et industrielles peuvent potentiellement altérer la physiologie et le comportement des poissons, et affecter leur résistance aux pathogènes (Acevedo-Whitehouse and Duffus, 2009; Segner et al., 2011; Makrinos and Bowden, 2016). De plus, le parasitisme et la température peuvent potentiellement altérer les capacités des poissons à faire face aux stress chimiques, en raison du coût des réponses physiologiques associées (Blanar et al., 2009; Gandar, 2015; Jacquin et al., 2019a; Petitjean, 2019; Petitjean et al., 2019). Cependant, peu d'études se sont penchées sur les **interactions entre ces facteurs de stress** (chimique, thermique et parasitaire), notamment en milieu naturel, ce qui limite notre capacité à comprendre et anticiper les effets des activités humaines sur la biodiversité aquatique et la santé des poissons d'eau douce.

Dans un premier temps, nous avons effectué un travail bibliographique pour répertorier les études existantes sur les effets des **stress multiples** sur les poissons à travers les échelles d'organisation biologique, **des molécules aux populations** (Fig 1, synthèse publiée dans Petitjean et al. 2019, et Jacquin et al., 2020). Les travaux existants prédisent des **interactions potentiellement synergiques (amplification) ou antagonistes (inhibition)** entre facteurs de stress. Par exemple, la température peut potentiellement amplifier les effets des polluants en augmentant l'assimilation des molécules toxiques, et en déclenchant des réponses physiologiques de stress coûteuses en énergie (Gandar et al., 2017b; a). De plus, les polluants pourraient avoir des effets immunotoxiques et inhiber les réponses antiparasitaires, avec des conséquences potentielles sur les **interactions hôte-pathogènes** (Bols et al., 2001; Segner et al., 2011). De même, les réponses immunitaires coûteuses déclenchées par les parasites peuvent potentiellement altérer les réponses aux stress chimiques (Marcogliese et al., 2005; Blanar et al., 2009). Cependant, la plupart des études existantes sont conduites en laboratoire avec des doses importantes de polluants, et peu d'études ont testé ces hypothèses en milieu naturel complexe, dans des conditions environnementales réalistes.

De plus, la plupart des études existantes se focalisent sur des espèces domestiques peu variables, alors qu'il existe souvent une forte **variabilité de sensibilité** et de réponse au stress entre populations sauvages de poissons, notamment à l'échelle d'un bassin versant (e.g. Reid et al., 2016). En effet, la contamination chronique peut parfois sélectionner certains phénotypes et mener à une adaptation locale dans certaines populations, mais peu d'études empiriques ont testé ce phénomène. Il est donc essentiel de prendre en compte la variabilité intraspécifique de réponses

aux stress multiples et les trajectoires évolutives des populations afin de mieux anticiper les effets des activités humaines sur les populations sauvages.

Afin de répondre à ces questions, nous avons utilisé dans cette étude des **approches pluridisciplinaires** à l'interface entre **l'écotoxicologie, l'écophysiologie et la biologie évolutive** afin de mieux comprendre la variabilité de réponses au stress environnementaux chez les poissons à différentes échelles biologiques, des molécules aux populations (Fig 1).

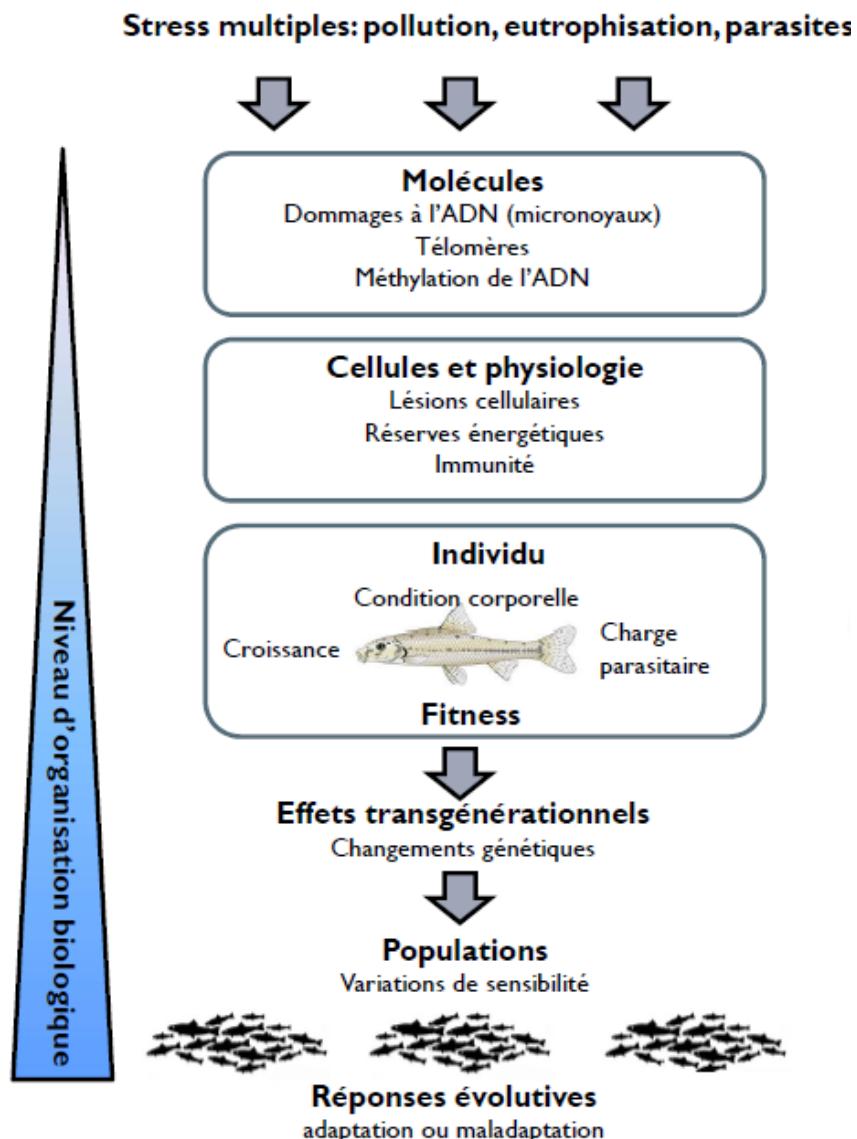


Figure 1 : Cadre théorique décrivant les effets des stress multiples sur les poissons d'eau douce, des molécules aux populations (figure adaptée de la synthèse collective Petitjean Q, Jean S, Gandar A, Côte J, Laffaille P, Jacquin L. 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Science of the Total Environment*, 684: 371-380).

2. Objectifs scientifiques

O1. Le premier objectif de cette étude était tout d'abord de **caractériser les stress environnementaux** (en particulier chimiques et parasitaires) dans 18 sites du bassin de la Garonne plus ou moins impactés par les activités humaines (agriculture, urbanisation, industrie), grâce aux bases de données de l'Agence de l'Eau (portail SIE), des dosages de contaminants in situ et des analyses statistiques multivariées.

O2. Le deuxième objectif était de **caractériser les effets de ces stress** environnementaux sur l'état de santé des poissons, en utilisant le goujon comme espèce modèle, en raison de la grande variabilité de son phénotype et de son mode de vie benthique qui l'expose aux contaminants via l'eau et le sédiment (Fig 2). Pour cela, nous avons utilisé une large gamme de **biomarqueurs à différentes échelles** biologiques, des molécules aux populations.

O3. Enfin, le troisième objectif était d'étudier la **variabilité de sensibilité** à ces stress entre populations sauvages, afin de tester si certaines populations avaient développé une **adaptation locale** aux stress environnementaux, grâce à des analyses génétiques et des expériences de transplantation réciproque en cage entre rivières plus ou moins polluées.



Fig 2 : Pêche électrique dans un des sites d'étude, la Garonne à Portet.

METHODES

1. Espèce modèle

Le **goujon** *Gobio occitaniae* (Fig 3) a été choisi comme modèle d'étude pour plusieurs raisons. Il s'agit d'une espèce répandue et assez abondante dans tout le bassin Adour-Garonne. Son mode de vie **benthique** l'expose aux contaminants via l'eau, les sédiments et sa nourriture (macroinvertébrés) (Keith et al., 2011). Il est relativement sédentaire et par conséquence exposé aux mêmes stress environnementaux toute sa vie, ce qui facilite les phénomènes de sélection et d'adaptation locale. De plus, des travaux précédents ont montré que le goujon était exposé à des niveaux variables de pollution, température et parasitisme dans le bassin Adour-Garonne (Loot et al., 2007; Fourtune et al., 2016).



Fig 3: Goujon *Gobio* sp. Source : Minden pictures

Les poissons (entre 10 et 30 poissons par site) ont été capturés par pêche électrique (EFKO-FEG 1500), pesés (+/- 0.1 g) et mesurés (+/- 0.1 cm). Certains ont été relâchés après mesures, d'autres ont été euthanasiés par surdose d'anesthésiant eugénol (1 mL.L^{-1}) et disséqués pour analyses de tissus. Les gonades et le foie ont été pesés (+/- 1 mg) pour calculer des indices de condition gonadosomatique (GSI) et hépatosomatique (HSI). Les muscles ont été aliquotés en deux parts, et stockés à -20°C , pour mesurer la bioaccumulation de métaux et l'énergie disponible dans les muscles. Des écailles dorsales ont été prélevées pour mesurer la croissance et l'âge. Les nageoires pelviennes ont été collectées pour les analyses génétiques (microsatellites) et de télomères. Des échantillons de sang ont été prélevés dans la veine caudale (seringue 1mL Terumo, aiguille héparinée 0.45x13 mm) pour mesurer l'immunité. Selon les mesures effectuées, les tailles d'échantillon peuvent varier dans les différents tissus.

Toutes les pêches et mesures in situ ont été réalisées avec l'autorisation des autorités locales (autorisations de pêches préfectorales). Les approches expérimentales ont été réalisées dans le

strict respect de la législation nationale et européenne (Directive 2010/63/UE), avec l'agrément d'établissement N°A3113002 (certificat expérimentateur N° 31-103), et l'autorisation du comité d'éthique N°073 (autorisation N°8538).

2. Sites d'études

18 sites d'étude ont été choisis sur la base des données de CORINE land cover (<https://www.data.gouv.fr/fr/datasets/corine-land-cover-occupation-des-sols-en-france/>) et des données SIE de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne (<http://adour-garonne.eaufrance.fr/>) entre 2012 et 2016 pour caractériser les stress chimiques auxquels les poissons ont été exposés durant leur vie (durée de vie de 3-4 ans). Les sites ont été choisis le long de gradient de perturbations humaines notamment de qualité de l'eau et d'occupation des sols. Les sites appartenaient à trois types d'habitat principaux : sites naturels, agricoles ou urbains en fonction du % de surface de sol majoritaire recouvert par des prairies/forêts, champs ou bâtiment, en utilisant la classification du CORINE Landcover. Pour caractériser l'occupation des sols, des buffers circulaires de 1 ou 10 km autour du site de capture ont été utilisés en se basant sur la taille d'habitat du goujon. L'occupation des sols sur le bassin versant amont de chaque site a aussi été calculé et une forte corrélation a été observée entre l'usage des sols avec les buffers circulaires (sites urbains: corrélation $R = 0.58$, $p = 0.01$, sites agricoles: $R = 0.72$, $p < 0.001$, sites naturels: $R = 0.71$, $p < 0.001$). Seuls les buffers circulaires ont donc été utilisés dans cette étude pour caractériser l'occupation des sols. En 2018, un site d'élevage (ELEV) a également été ajouté comme site de référence non pollué et un site industriel RIOU a été ajouté comme site très pollué aux métaux lourds pour les approches expérimentales d'encagement (Fig 4).

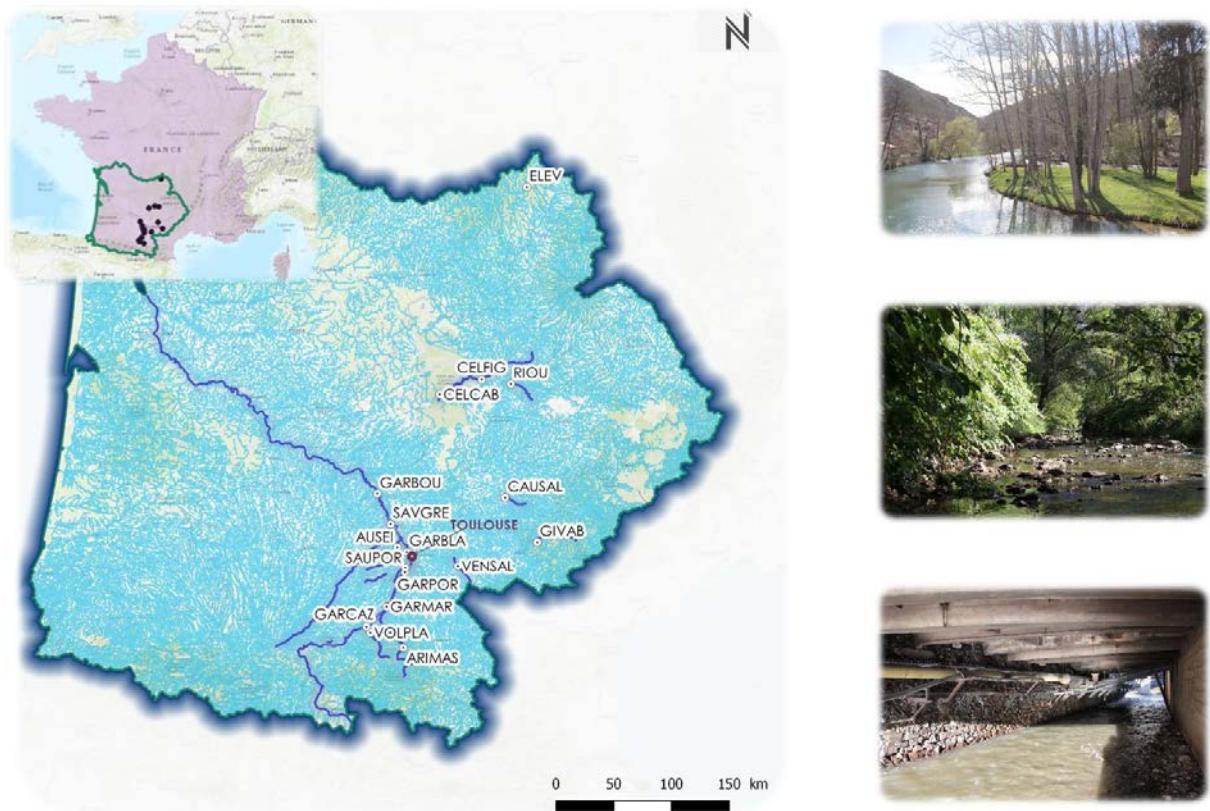


Fig 4. Cartographie des 18 sites échantillonnés dans cette étude (voir Table 1 pour leurs caractéristiques environnementales) avec des photos de sites naturels (haut : ARIMAS et GIVAB) et perturbés (bas : RIOU).

3. Physicochimie

Pour le gradient physico-chimique, des variables environnementales ont été choisies en se basant sur des études précédentes chez cette espèce (Fourtune et al., 2016), tels que la température de l'eau moyenne en été, les Matières Organiques en Suspension (SOM), l'oxygène dissous, les nitrites et le phosphore total. De plus, le pourcentage de surface agricole et de surface urbaine autour des sites ont été intégrés dans les analyses. Le débit d'eau moyen (m^3/s) et la position du site dans le gradient amont-aval (axe d'ACP incluant la distance à la source, la largeur de la rivière et la taille du bassin) ont été intégrés à partir de la base de données RHT pour prendre en compte les différences physiques entre sites (Table 1).

Table 1 Description des sites d'étude (Longitude et Latitude en Lambert II étendu). Les variables physiques (Dist : distance à la source en km, débit en m³/s) ont été extraits de la base RHT. Les variables chimiques ont été extraits de la base SIE de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne (moyenne estivale sur 4 ans) (Temp : température °C, nitrites mg/L, Phosphore mg/L, Matière Organique en Suspension SOM g/L, O² oxygène dissous mg/L). Le type d'habitat est indiqué en fonction du % majoritaire d'occupation des sols selon la base CORINE Land cover (2012).

Site	Rivière	Ville	Longitude	Latitude	Dist	Débit	Temp	Nitrites	Phosphore	SOM	O ²	Habitat
ARIMAS	Arize	Mas d'Azil	521444	1787330	40	4.134	16.7	3.81	0.04	7.19	10.17	NATUREL
AUSEI	Aussonnelle	Seilh	521044	1855461	38	0.802	15.4	22.33	0.58	96.78	9.36	AGRICOLE
CAUSAL	Caussels	Albi	586378.56	1881122.7	16	0.476	17.3	23.02	0.08	6.61	8.75	URBAIN
CEL CAB	Célé	Cabrerets	545983.92	1945423.15	104	19.983	18.3	9.20	0.05	7.13	9.24	NATUREL
CELFIG	Célé	Figeac	572025.91	1954251.82	58	12.697	19	9.08	0.05	7.58	8.95	NATUREL
GARBLA	Garonne	Blagnac	522368.42	1849629.75	222	176.675	24.3	3.90	0.13	19.60	11.6	URBAIN
GARBOU	Garonne	Bourret	506450	1884360	287	189.835	20.9	6.83	0.08	38.08	NA	AGRICOLE
GARCAZ	Garonne	Cazères	497642	1800640	155	101.727	15.8	2.63	0.16	41.21	9.67	NATUREL
GARMAR	Garonne	Marquefav	511258	1813372	181	109.228	14.3	2.79	0.05	54.04	10.5	AGRICOLE
GARMU	Garonne	Muret	518520	1829190	202	109.493	15.7	2.87	0.06	64.40	10.01	URBAIN
GARPOR	Garonne	Portet	524945.54	1835533.81	213	111.99	20.6	3.26	0.06	40.31	9.68	URBAIN
GIVAB	Gijou	Vabre	606497.84	1853274.92	46	4.776	14.2	6.17	0.07	10.24	10.11	NATUREL
SAULUN	Sausse	L'Union	531115.02	1849815.1	25	0.393	19.3	17.27	1.14	77.45	7.63	URBAIN
SAUPOR	Saudrune	Portet	523371.68	1837753.48	21	0.124	21	8.01	0.66	23.56	11.54	URBAIN
SAVGRE	Save	Grenade	515495	1863806	132	4.557	19.6	15.66	1.44	102.10	8.9	AGRICOLE
VENSAL	Vendinelle	Salvetat Laur	556906	1837650	14	0.282	19.4	31.49	0.13	181.97	7.17	AGRICOLE
VOLPLA	Volp	Le Plan	504959.61	1797068.58	33	1.226	21.6	2.84	0.03	18.02	8.25	NATUREL

4. Contamination inorganique aux métaux lourds

Un gradient de contamination inorganique par les métaux lourds a été déterminé par une Unité de Toxicité TU basé sur des études précédentes (Sprague, 1970; Kuzmanović et al., 2016) qui recommandent ce type de mesure intégrative pour les éléments trace métalliques. Cette Unité Toxique TU a été calculée pour chaque site à partir des concentrations dans l'eau de 9 métaux mesurée par l'Agence de l'Eau Adour-Garonne entre 2012 et 2016 (i.e., aluminium-Al, arsenic-As, cobalt-Co, lead-Pb, zinc-Zn, nickel-Ni, cadmium-Cd, chromium-Cr, and copper-Cu) et corrigé par la toxicité de chacun de ces métaux pour les poissons selon la formule:

$$TU(\text{Toxic Unit})_{site} = \log \sum_{i=1}^n \frac{Ci}{LC_{50}}$$

Avec Ci la concentration moyenne dans l'eau entre 2012 and 2016 et LC₅₀ la concentration létale pour 50% des poissons modèles *Pimephales promelas* dans les tests d'écotoxicité (base de données ECOTOX, USEPA, 2008). Une TU plus élevée correspond donc à un niveau de toxicité plus élevé du site pour les poissons. Nous avons également calculé une TU dans les sédiments, et il existait une relativement bonne corrélation entre TU de l'eau et TU des sédiments. Cependant, en raison de données manquantes dans la base SIE, seule la TU de l'eau a été utilisée dans cette étude.

Nous avons également vérifié la fiabilité de la base de données SIE en mesurant directement les métaux lourds dans l'eau, les sédiments et muscles de poisson au moment des pêches. L'eau a été filtrée dans un disque d'acétate de cellulose 0.45 µm pour retirer la matière en suspension. L'eau filtrée a été acifiée avec 2% HNO₃ 67-69% (67-69%, Trace Metal Grade, Fisher Chemical). Les sédiments ont été tamisés à 2 mm, séchés 30°C, homogénéisés et minralisés dans de l'*aqua regia* (1:2.5 HNO₃:HCl, v:v) avec un système de digestion (DigiPREP) et filtrés (1µm Teflon membrane). Les muscles ont été congelés, lyophilisés, homogénéisés au Fastprep®-24 et minéralisés au HNO₃ (67-69%, Trace Metal Grade, Fisher Chemical) par DigiPREP. Les analyses ont été effectuées au laboratoire GET que nous remercions, par spectrométrie ICPMS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS Agilent 7500ce). La fiabilité des mesures a été vérifiée grâce à des références certifiées: SLRS-6 Natural River Water pour l'eau, HR-1 Humber River Sediments pour les sédiments, TORT-3 pour les tissus. Le taux de recouvrement pour Cd, Cu and Zn était 105.3 ± 2.2%, 103.3 ± 1.8%, 113.1 ± 1.6%, pour l'eau, 106.7 ± 1.9%, 101.6 ± 1.1%, 120.6 ± 6.3%, pour les sédiments et 92 ± 4.4%, 91.1 ± 4.4%, 106.8 ± 7.8% pour les muscles, ce qui montre que cette technique est fiable pour les dosages de métaux. Les mesures de l'Agence de l'Eau et nos mesures directes étaient également très cohérentes entre elles, ce qui montre que **la base de données SIE de l'Agence de l'Eau est donc très fiable pour les métaux lourds**. Nos mesures directes ont donc été ajoutées aux mesures de l'Agence de l'Eau pour calculer une TU intégrative de l'eau qui a été utilisée dans ce rapport (Table 2).

Site	TU	AI	As	Cd	Cr	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
GIVAB	-1	n Mean \pm Sd	NA 1.32 \pm 0.31	25 0.04 \pm 0.02	25 1.03 \pm 0.1	14 0.31 \pm 0.22	25 1.28 \pm 0.46	25 1.18 \pm 0.27	25 1 \pm 0	25 2.6 \pm 1.22
	-0.9	n Mean \pm Sd	NA 1.09 \pm 0.34	18 0.04 \pm 0.03	18 1.17 \pm 0.59	NA 0.38 \pm 0.34	18 1.22 \pm 1.13	18 1.62 \pm 1.39	18 1.22 \pm 0.55	18 4.47 \pm 1.51
GARMAR	-0.9	n Mean \pm Sd	4 20 \pm 0	27 1.5 \pm 0.53	29 0.04 \pm 0.03	27 1.07 \pm 0.27	18 0.38 \pm 0.34	27 1.06 \pm 0.21	29 1.39 \pm 1.06	27 1.18 \pm 0.39
	-0.9	n Mean \pm Sd	4 45.4 \pm 8.78	17 3.17 \pm 1.49	19 0.05 \pm 0.02	17 0.43 \pm 0.15	18 0.07 \pm 0.03	17 0.92 \pm 1.08	19 0.54 \pm 0.15	17 0.22 \pm 0.34
ARIMAS	-0.9	n Mean \pm Sd	NA 1.06 \pm 0.41	18 0.05 \pm 0.06	18 1.09 \pm 0.43	NA 0.38 \pm 0.34	18 1.49 \pm 1.31	18 1.61 \pm 1.3	17 1.29 \pm 0.47	19 4.54 \pm 2.35
	-0.8	n Mean \pm Sd	6 18.7 \pm 13.8	28 2.74 \pm 1.17	30 0.05 \pm 0.02	28 0.81 \pm 1	18 0.08 \pm 0.08	28 0.99 \pm 0.92	30 0.71 \pm 0.4	28 0.25 \pm 0.35
GARCAZ	-0.8	n Mean \pm Sd	4 20 \pm 0	27 1.36 \pm 0.57	29 0.05 \pm 0.03	27 1.07 \pm 0.27	18 0.38 \pm 0.34	27 1.42 \pm 1.47	29 1.41 \pm 1.09	27 1.17 \pm 0.38
	-0.8	n Mean \pm Sd	6 16.67 \pm 5.16	28 1.7 \pm 1.54	33 0.05 \pm 0.04	28 1.06 \pm 0.28	20 0.47 \pm 0.49	28 1.42 \pm 1.94	33 2.24 \pm 4.27	28 1.15 \pm 0.44
CAUSAL	-0.7	n Mean \pm Sd	NA 1.17 \pm 0.41	6 0.1 \pm 0.09	12 1.1 \pm 1.14	6 NA	NA 1.53 \pm 0.95	12 0.83 \pm 0.45	12 1.42 \pm 0.9	6 5.67 \pm 3.27
	-0.6	n Mean \pm Sd	NA NA	25 1.64 \pm 0.57	25 0.05 \pm 0.08	25 1 \pm 0	8 0.3 \pm 0.28	25 1.32 \pm 0.51	25 1.04 \pm 0.2	25 1.04 \pm 0.2
VENSAL	-0.6	n Mean \pm Sd	4 20 \pm 0	25 4.64 \pm 4.95	27 0.06 \pm 0.06	25 1 \pm 0	10 0.6 \pm 0.36	27 1.36 \pm 0.56	27 1.04 \pm 0.19	25 1 \pm 0
	-0.5	n Mean \pm Sd	NA NA	1 14.56 \pm NA	1 0.14 \pm NA	1 0.86 \pm NA	NA NA	1 11.58 \pm NA	1 7.42 \pm NA	1 0.08 \pm NA
SAUPOR	-0.3	n Mean \pm Sd	4 27 \pm 5.77	22 1.41 \pm 0.59	24 0.04 \pm 0.03	22 1 \pm 0	18 0.59 \pm 0.69	22 1.25 \pm 0.34	24 1 \pm 0	22 1 \pm 0
	-0.3	n Mean \pm Sd	4 22.7 \pm 2.5	28 1.52 \pm 0.53	30 0.28 \pm 1.1	28 1 \pm 0.26	10 0.52 \pm 0.41	28 1.72 \pm 1.79	30 1.12 \pm 0.56	28 1.4 \pm 1.67
AUSEI	-0.2	n Mean \pm Sd	4 59.7 \pm 26.5	16 2.78 \pm 1.45	18 0.05 \pm 0.03	16 1.06 \pm 0.25	4 1 \pm 0	16 6.47 \pm 12.74	18 1.17 \pm 0.38	16 1.11 \pm 0.47
	1.3	n Mean \pm Sd	4 31.9 \pm 2.9	6 3.05 \pm 0.38	4 13.15 \pm 8.87	4 1.02 \pm 1.28	6 0.7 \pm 0.26	4 2.57 \pm 1.84	6 16.2 \pm 13.36	4 1.67 \pm 2.41
Valeurs de référence	NA	AA-QS CL50	NA 4250	1.37 9900	0.25 1	NA 39000	0.3 3400	1.6 135	4 3100	7.8 110
										4 70

Table 2. Concentration moyenne estivale sur 4 ans et déviation standard ($\mu\text{g.L}^{-1}$) de 9 métaux dans l'eau des sites prélevés, ordonnés du moins pollué au plus pollué (TU croissante). Les concentrations en rouge indiquent les métaux qui dépassent les normes AA-QS européennes (annual average quality standard) (Directive n°2013/39/UE). Les cases en rouge correspondent aux concentrations supérieures LC 50 (seuil léthal pour le poisson *Pimephales promelas*). n correspond au nombre de mesures.

5. Contamination organique

Basé sur les données de l'Agence de l'Eau, nous avons également calculé une Unité Toxique TU pour les polluants organiques (i.e., pesticides, phtalates, hydrocarbures) dans l'eau, mais très peu de polluants organiques ont été détectés dans l'eau par l'Agence de l'Eau, et la plupart des sites avaient des valeurs de contamination similaires et faibles ou à la limite de détection dans l'eau. **Le gradient de TU organique (notamment pesticides) basé sur les données de l'Agence de l'Eau n'était donc pas assez fiable pour être pris en compte dans cette étude.**

Nous avons également tenté de doser nous-mêmes ces polluants organiques dans les matrices de muscles de poissons grâce à une collaboration avec le laboratoire METIS (Aurélie Goutte, Noëlie Molbert, Fabrice Alliot). Une partie des sites a été analysé (SAULUN, VENSAL, CAUSAL, VOLPLA, GARBOU, GIVAB, AUSEI, SAUPOR, GARCAZ, entre 1 et 3 poissons par site) pour tester le niveau de contamination organique dans les tissus des poissons. Les phtalates (DMP DEP DIBP DNBP BBP DEHP *DiDP DiNP DnOP*), hydrocarbures HAP (entre autres : Acenaphtene, Naphtalene, Anthracene, Benzo_a_pyrene etc), pesticides pyréthrinoides (Bifenthrin, Permethrin, Phenothrin, Cyfluthrin, Cypermethrin, Fenvarelate, Deltamethrin), pesticides organochlorés (DEET, PeCB HCB, Lindane, 44'-DDE), PCB (28, 52, 101, 138, 153, 118, 180) et PBDE (28, 47, 100, 99, 154, 153, 209) ont été dosés dans les muscles après extraction à l'hexane: isopropanol (60:40, *v/v*) par chromatographie gazeuse en tandem et spectrométrie de masse (GC-MS/MS avec multiple reaction monitoring MRM). La méthode de dosage est décrite en détails dans Molbert et al. (2019).

Ces analyses complémentaires ne nous ont cependant pas permis de déterminer de façon fiable les niveaux de contamination organique dans les muscles de poissons. Pour les pesticides, seuls certains pesticides pyréthrinoides (permethrin, cypermethrin, deltamethrin) et le pesticide organochloré 44'DDE ont été détectés au-dessus de la limite de détection, peut-être en raison de la métabolisation rapide de la plupart des composés dans les tissus de poissons. Les PCB étaient assez présents dans certains sites urbains toulousains comme AUSEI (Aussonnelle à Seilh) et SAUPOR (Saudrune à Portet), mais la **grande variabilité** de contamination entre individus d'un même site ne permettait pas d'analyser les effets physiologiques de manière fiable. De plus, des **problèmes techniques** ont été rencontrés pour certaines substances (notamment phtalates en raison d'une contamination par les plastiques des contenants utilisés). Il n'a donc pas été possible dans cette étude de conclure sur les effets des contaminants organiques sur les poissons, et **seuls les contaminants inorganiques seront présentés dans ce rapport.**

6. Analyses génétiques

Pour étudier la diversité et la structure génétique des populations de goujons sur la zone d'étude, 413 individus ont été génotypés sur la base de l'ADN d'un échantillon de leur nageoire pelvienne. L'ADN a été extrait des nageoires par kit QIAGEN (Blood and Tissue kit) et 15 loci microsatellites ont été génotypés sur la base des travaux de (Fourtune et al., 2018) adapté de (Grenier et al., 2013). Le logiciel GENEPOL 4.0.7 (Rousset, 2008) a été utilisé pour formater les données, puis le logiciel MICRO-CHECKER 2.2.3 (Van Oosterhout et al., 2004) pour déterminer la fréquence des allèles nuls et les erreurs de score. Une analyse génétique préliminaire a montré que les distances génétiques entre l'ensemble de nos populations prélevées dans le bassin de la Garonne et un groupe contrôle issu du bassin de la Loire (en bleu) montre que les goujons du bassin de la Garonne (*Gobio occitaniae*) sont bien distincts génétiquement des goujons du bassin de la Loire (*Gobio gobio*) (Fig 5)

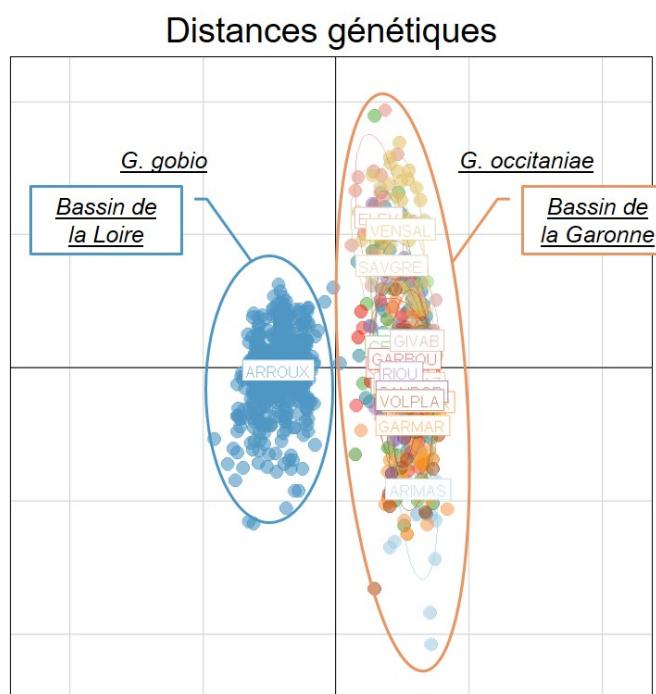


Fig 5. Distances génétiques calculées sur 15 microsatellites entre nos 18 populations (*Gobio occitaniae*) du bassin de la Garonne, et une population de référence du bassin de la Loire (*Gobio gobio*).

Puis, la diversité génétique des populations a été estimée via la richesse allélique (Ar) et le nombre d'allèles (N) grâce au logiciel FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 1995). Pour étudier la différentiation génétique neutre entre populations, l'hétérozygotie attendue (He), observée (Ho) et la différenciation génétique neutre (Fst) ont été calculés grâce au logiciel GENETIX 4.05

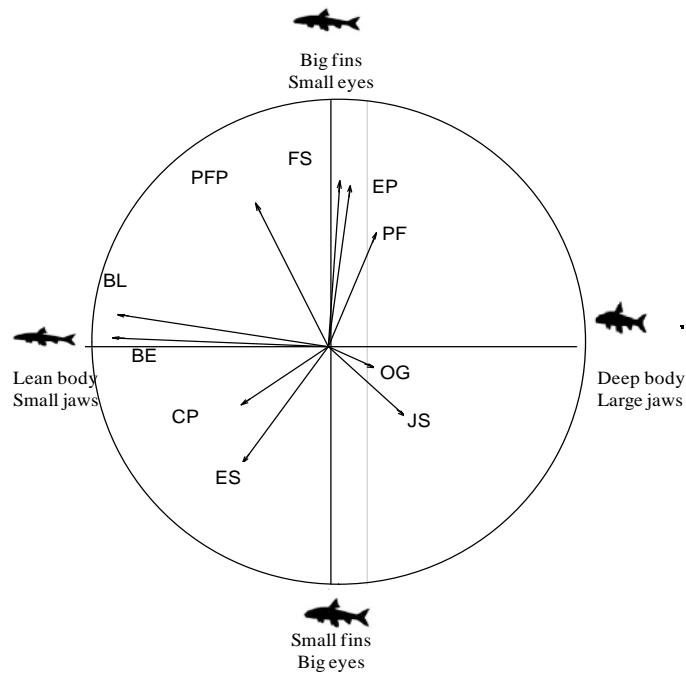
(Belkhir et al., 2004). Enfin, le logiciel FSTAT 2.9.3.2 a aussi été utilisé pour calculer un coefficient de consanguinité Fis (déséquilibre de Hardy-Weinberg sur 1000 permutations).

7. Morphologie et coloration

Plusieurs mesures ont été effectuées sur les poissons pour déterminer leur état de santé et leur phénotype, notamment leur morphologie. Pour mesurer la morphologie des poissons de manière précise et standardisée, les poissons ont été anesthésiés et photographiés (face droite) dans une cage à lumière (appareil photo Canon PowerShot G16). 10 traits morphologiques fonctionnels ont ensuite été choisis et mesurés sur les images selon (Villeger et al., 2008)), notamment des traits morphologiques liés à la détection des proies (eye size: taille de l'oeil) et la capture des proies (jaw size : taille de mâchoire, oral gape position : position de la bouche), qui sont généralement influencés par la disponibilité en proies dans l'habitat. D'autres traits sont liés à la position dans la colonne d'eau (body elongation and body lateral shape : élongation et forme du corps, eye position : position de l'oeil) et les capacités de nage (fin size : taille de nageoire, pectoral fin position : position de la nageoire pectorale, caudal peduncle : largeur du pédoncule caudal) qui sont souvent influencés par la qualité de l'habitat et le débit (Villeger et al., 2008). Une analyse multivariée ACP a été utilisée pour extraire deux axes résumant la morphologie, qui expliquaient 38.84 % de l'inertie totale (PCA1: 20 %, PCA2: 18.84 %). Ces deux axes ont été utilisés dans la suite du rapport comme variables morphologiques.

Comme montré sur la Fig 6, le premier axe de morphologie (PCA1) reflète notamment la locomotion et la position dans la colonne d'eau (allongement du corps : body elongation BE) et la capture de proies (taille de la mâchoire : jaw size JS). Les poissons sur la droite de l'axe ont un corps plus épais et une longue mâchoire (Villeger et al., 2008) (Figure 6). L'axe 2 PCA2 est corrélé positivement à la taille des nageoires (fin surface FS), la position des yeux (eye position EP), et négativement à la taille des yeux (eye size ES). Les poissons en haut de l'axe 2 ont donc de grandes nageoires et de petits yeux. Les coordonnées sur les axes 1 et 2 ont été extraits et utilisés comme variables morphologiques (appelées PCA1 et PCA2 dans la suite du rapport).

A.



B.

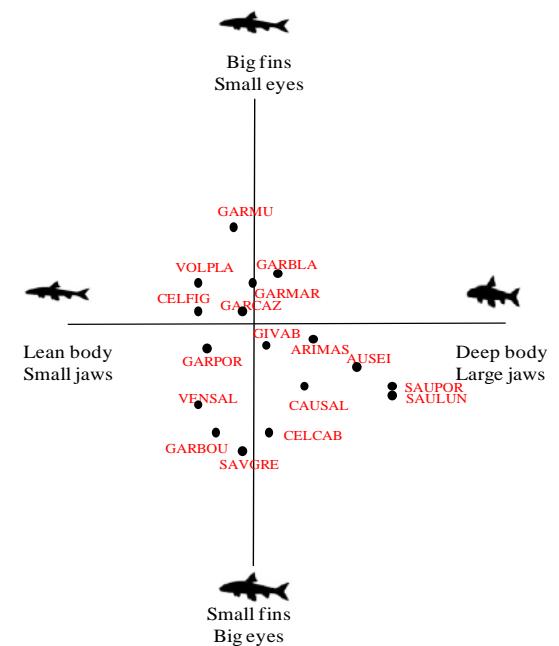


Figure 6. A. ACP normée sur les traits morphologiques liés à la locomotion, la capture de proie, et la position dans la colonne d'eau. Les deux premiers axes expliquent 38.84 % de l'inertie totale (PCA1: 20 %, PCA2: 18.84 %). Les traits morphologiques utilisés ont été choisis selon Toussaint et al. 2016. BE: Body elongation, BL: Body lateral shape, PFP : Pectoral fin position, FS: Fin surface ratio, EP : Eye position, PF: Pectoral fin size, OG: Oral gape, JS: Jaw size, ES: Eye size, CP: Caudal peduncle throttling. L'axe PCA1 reflète principalement l'allongement du corps (BE et BL) et la taille de la mâchoire (JS). Les poissons situés sur la droite de l'axe PCA1 ont donc un corps épais et une longue mâchoire (deep body, large jaw). L'axe PCA 2 reflète principalement la taille des nageoires (FS) et des yeux (ES). Les poissons situés sur le haut de l'axe PCA2 ont donc de grandes nageoires et de petits yeux (large fins, small eyes). B. A droite, carte factorielle des centres de gravité de chaque population dans l'espace morphologique. Par exemple, les poissons des sites SAUPOR et SAULUN ont un corps plus épais et une plus longue mâchoire que les poissons des autres sites.

Pour mesurer la coloration des poissons, des photographies de chaque poisson ont été prises sur le côté droit dans une cage à lumière pour standardiser la luminosité à l'aide d'un appareil Canon PowerShot G16 et d'un étalon colorimétrique (X-Rite Color Checker) (Fig 7). La brightness et les valeurs de RGB ont été standardisées par rapport à l'étalon colorimétrique grâce au logiciel GIMP2. Le niveau de coloration mélânique a ensuite été calculé par le logiciel Image J en se basant sur des études précédentes (Jacquin et al., 2017). La surface de noir a été calculée par le nombre de pixels noirs divisé par la surface du corps. Il existait un effet sexe ($F = 7.53$, $p = 0.006$) et taille ($F = 9.65$, $p = 0.002$) qui ont été pris en compte dans les analyses statistiques de coloration. Tous les détails et résultats sont publiés dans Côte et al. (2019).



Fig 7: exemple de variations de coloration mélânique entre un goujon clair (gauche) et foncé (droite) de différentes populations.

8. Parasites et lésions externes

Le parasitisme a été mesuré par examen anatomique externe (i.e., peau, nageoires) et interne (i.e., branchies, intestin) sur les poissons collectés. Peu de parasites ont été détectés, mais le plus fréquent était *Gyrodactylus sp.*, ce qui cohérent avec des études précédentes dans la région (Loot et al. 2007). Ces ectoparasites se nourrissent des nageoires et de la peau de leurs hôtes (Fig 8), avec des effets importants sur la physiologie et la survie des poissons (Scott, 1985).

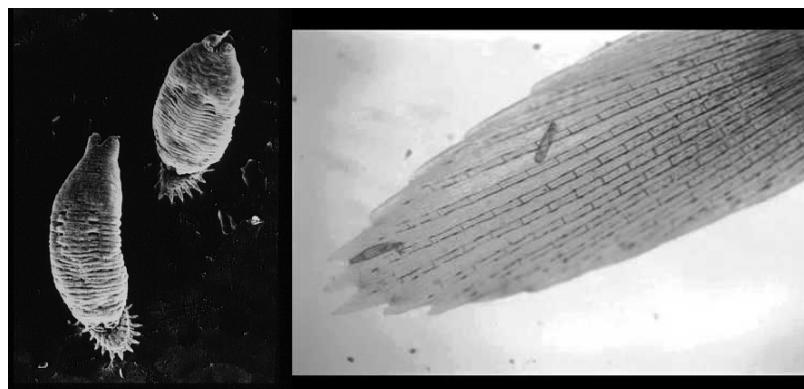


Fig 8. Ectoparasites *Gyrodactylus sp.* fixés sur la nageoire caudale de leur hôte (gauche : microscopie à balayage x 200, droite : loupe binoculaire x 60). Ces vers monogènes se fixent par des crochets sur l'épiderme et se nourrissent de la peau et du mucus, causant des lésions externes lorsqu'ils sont en grand nombre. Photos : A Hendry.

La prévalence moyenne de Gyrodactyles par site (i.e., pourcentage de poissons infecté par site) et l'intensité parasitaire (nombre de parasite par poisson) a été déterminé par examen des nageoires sous loupe binoculaire directement sur le terrain (x10). La prévalence moyenne de parasites Gyrodactyles par site a été utilisée comme indice de gradient de parasitisme (stress parasitaire) dans les analyses statistiques (voir plus bas). Ce gradient représente la probabilité d'exposition au parasite, tandis que l'intensité parasitaire (nombre de parasite par poisson) est plutôt lié à la capacité de poisson à résister au parasite (via l'immunité) (López, 1998; Van Oosterhout et al., 2003; Cable and Van Oosterhout, 2007). Les prévalences moyennes par site étaient relativement stables entre années dans 4 sites (ANOVA: effet de l'année: $F = 1.60$, $p = 0.21$), ce qui suggère que la pression parasitaire en Gyrodactyles était relativement stable dans le temps comme suggéré dans des études précédentes (Gotanda et al., 2013), bien que des variations saisonnières d'intensité parasitaire soient possibles et non mesurées dans cette étude (pêches en été uniquement).

Les lésions externes visibles du corps des poissons ont également été quantifiées en suivant le « **code pathologie**» développé par Elie P & Girard P (2014). Un atlas de ces lésions est en cours de constitution au fur et à mesure des pêches. Cependant, globalement peu de lésions ont été détectées sur le goujon, soit parce que ces poissons présentent naturellement trop peu de lésions, soit parce que les goujons présentant ces lésions sont rapidement éliminés par sélection naturelle. Les analyses statistiques sur ces lésions n'ont donc pas pu être conduites dans ce rapport.

9. Condition et croissance

La condition corporelle des poissons a été calculée par un indice de Fulton (masse (mg)/ taille (mm³)). Certains poissons ont ensuite été euthanasiés par une dose d'eugénol (0.1 ml.L⁻¹) et disséqués pour effectuer un certain nombre de mesures physiologiques sur les tissus. Un indice hépatosomatique a été calculé : HSI= masse du foie /(masse du poisson) *100. Cet indice HSI reflète en partie les réserves énergétiques du foie (Chellappa et al., 1995).

Le taux de croissance a été déterminé par scalimétrie, en comptant le nombre d'annuli des écailles dorsales (Pierce et al., 1996). La méthode de rétrocalcul utilisée est celle de (Hile and Jobes, 1941): $L_i = - (a/b) + [L_c + (a/b)] (S_i/S_c)$, avec L_i représentant la taille de l'annulus i, L_c la taille du poisson à la capture, S_i le radius de l'écaille à l'annulus i and S_c le radius de l'écaille à la capture. a et b correspondent à l'intercept et la pente de la régression linéaire du radius de l'écaille sur la taille du poisson à la capture pour chacune des populations échantillonnées.

10. Réserves énergétiques et immunité

Les réserves énergétiques des muscles ont été dosées après congélation des tissus à - 20°C. Les protéines, lipides et carbohydrates totaux ont été dosés par dosages colorimétriques selon les protocoles de (De Coen and Janssen, 1997) modifiés par (Ferreira et al., 2015)). La concentration en carbohydrates (mg.mg⁻¹) a été mesurée par spectrophotométrie à 492 nm (FLUOstar OMEGA, BMG Labtech) avec un standard de glucose. La concentration en lipides (mg.mg⁻¹) a été mesurée à 525 nm avec un standard de tripalmitin ichloroform. Puis la concentration en protéines a été mesurée par un réactif de Bradford. L'absorption a été lue à 595 nm avec de la Sérum Albumine Bovine BSA dans une solution d'hydroxyde de sodium 0.2N. Les carbohydrates, lipides et protéines ont été transformés en valeur énergétique (mJ/mg de tissu) en utilisant leur enthalpie de combustion (17, 39.5 et 24 Kj/g respectivement). L'énergie disponible (Available Energy AE) dans les muscles a ensuite été calculée comme la somme des valeurs de carbohydrates, lipides et protéines (mJ/mg de tissu).

Un grand nombre de variables immunitaires ont été testées sur le goujon dans cette étude, mais beaucoup de variables étaient peu exploitables en raison d'un niveau bas d'activité enzymatique dans le sang chez le goujon (notamment activité lysozyme et peroxidase très basses). Le principal trait immunitaire qui a finalement été utilisé dans cette étude a été le ratio Neutrophiles/Lymphocytes (appelé ratio N/L), qui est un marqueur important d'inflammation. En effet, les neutrophiles sont des cellules immunitaires dont le nombre augmente en cas d'infection ou de stress (Davis et al., 2008). Pour mesurer le ratio N/L, des frottis sanguins ont été effectués après prise de sang sur le terrain et colorés au colorant May-Grunwald (Sigma-Aldrich, 1:2 v:v) et Giemsa (Sigma-Aldrich, 1:20 v:v). 100 cellules de leucocytes (monocytes, neutrophiles et lymphocytes) ont été comptées après identification photographique (Fig 9) avec un microscope Axioskop (Zeiss, Germany, x40 magnification). Le ratio Neutrophile/Lymphocyte (ratio N/L) a ensuite été calculé et utilisé comme marqueur immunitaire d'inflammation dans le sang dans ce rapport.

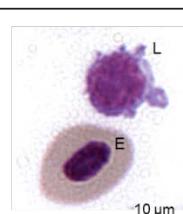
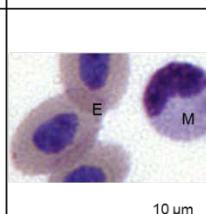
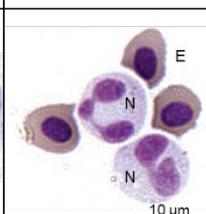
	Lymphocytes	Monocytes	Neutrophils
			
<i>Shape</i>	Round, frequently have pseudopods (cytoplasm extension) along the cell margin	Round	Round
<i>Relative size</i>	Small	Large	Large
<i>Description</i>	Cells with scant cytoplasm (bluish) and large condensed nucleus (dark purple)	Cells with abundant cytoplasm (bluish) and a large (dark blue/purple) eccentric nucleus which have ovoid, kidney shape	Cells with abundant cytoplasm (purplish) and a large (dark purple) eccentric nucleus that is generally multi-lobed (2 to 5 lobes)
<i>NB</i>	Lymphocytes can become larger and their cytoplasm more prominent when activated	Monocytes cytoplasm can be vacuolated and their nucleus shape can vary from ovoid to kidney shape	

Fig 9. Types de cellules immunitaires identifiables dans le sang des goujons. Les lymphocytes (L) ont souvent des expansions de pseudopodes et un noyau très dense avec peu d'espace cytoplasmique. Les monocytes (M) sont de grosses cellules rondes avec un noyau excentré en forme de haricot. Les Neutrophiles (N) sont des cellules rondes avec un noyau multilobé. Les globules rouges ou Erythrocytes (E) sont des cellules allongées avec un noyau central violet bleu chez les poissons. Dans cette étude, le ration N/L a été calculé comme mesure immunitaire d'inflammation (Davis et al. 2008)

11. Lésions cellulaires internes

Les lésions cellulaires du foie ont été quantifiées par analyse histologique (prestation avec Thibaut Larcher, unité INRA APEX, Nantes) basé sur des études précédentes (van Dyk et al., 2007; Cuevas et al., 2016; Jacquin et al., 2019b). Le foie a été fixé dans 4% de formaline, et inclus en paraffine. Des sections de 4 μm ont été colorées à l'hematoxyline, eosine saffron and observée au microscope (Nikon Eclipse Ni) avec caméra digitale (DS-Ri1).

Trois lésions hépatiques principaux ont été quantifiées: la prolifération de conduits hépatiques (Bile Duct BD) reflétant une fibrose du foie (Fig. 10B), les aggrégats de mélanomacrophages MM reflétant une hyperinflammation (Fig. 10C), la lyse cellulaire L et les altérations du noyau reflétant l'apoptose et la mort cellulaire (Fig. 10D) (Wolf and Wheeler, 2018). Pour chaque lésion, un score de 0 à 3 a été attribué selon la sévérité de la lésion. Un score global d'histopathologie a ensuite été calculé comme la moyenne des scores en se basant sur des études précédentes (Jacquin et al., 2019b).

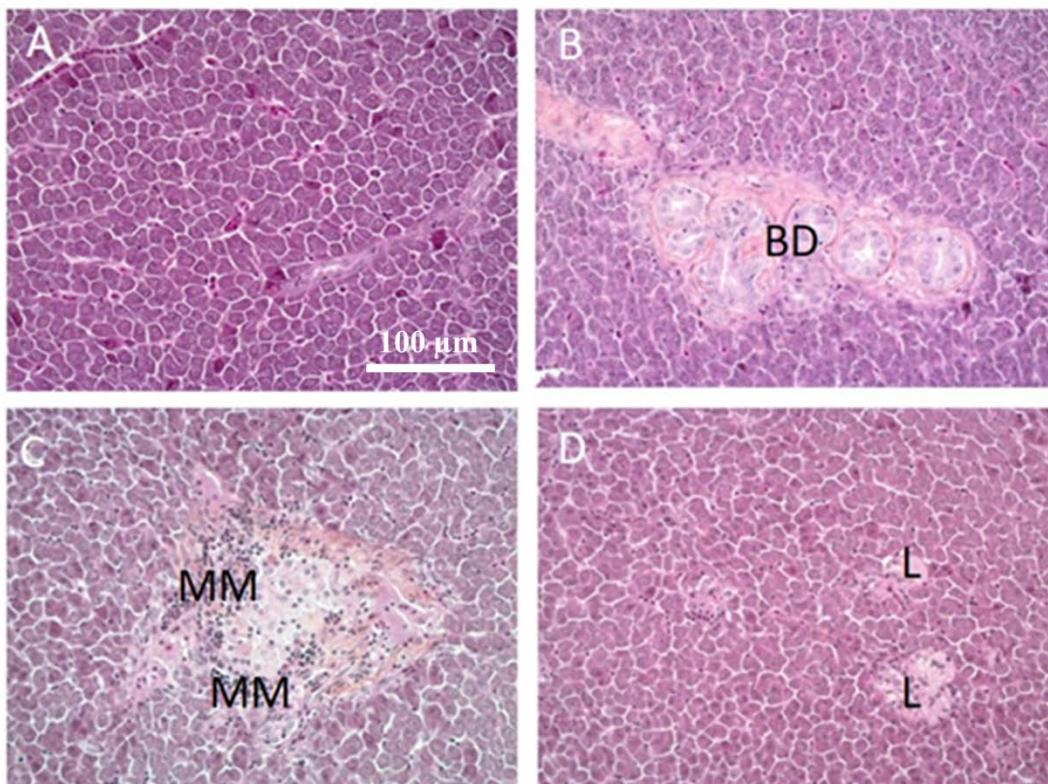


Figure 10. Observations histopathologiques des foies de goujon. A. Foie normal. B. Prolifération de conduits hépatiques (Bile Ducts BD) et fibrose. C. Aggrégats de Mélanomacrophages (MM) reflétant une hyperinflammation du foie. D. Plages de lyse cellulaire (L) et d'altérations nucléaires reflétant des apoptoses et morts cellulaires. Pour chaque lésion, un score de 0 à 3 a été attribué selon la sévérité de la lésion. Un score global d'histopathologie a ensuite été calculé comme la moyenne des scores.

12. Télomères

Les télomères sont des répétitions en tandem d'ADN à l'extrémité des chromosomes, qui raccourcissent lors de l'exposition à certains stress environnementaux comme la contamination (Blévin et al., 2016), les hausses de température (Debes et al., 2016; Simide et al., 2016) ou le parasitisme (Stauffer et al., 2017). Ce raccourcissement des télomères peut mener à la sénescence et la mort des cellules lorsqu'ils sont trop courts (Monaghan, 2010). La longueur des télomères est donc utilisée dans certaines études comme marqueur d'exposition prolongée au stress (Bize et al., 2009; Monaghan, 2014; Angelier et al., 2018). Dans cette étude, la longueur des télomères a été mesurée grâce à une **collaboration avec le CNRS de Chizé** (Frédéric Angelier, Charline Parenteau, Cécile Ribout) sur l'ADN des nageoires par PCR quantitative (qPCR) BioRad CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) selon le protocole de Cawthon (2002) avec modifications mineures. Des primeurs universels de télomères de Cawthon (2002) ont été utilisés pour l'amplification d'ADN. Le gène contrôle choisi était le Recombination Activating Gene 1 (RAG1) amplifié par primeurs spécifiques (McLennan et al., 2019) designé pour le goujon (RAG1-F : 5'-AGAGAGAGGGGGCTAGATGA-3' et RAG1-R: 5'-CCATGCTTCTCGCTGACATCAGCAGCAGCCTTCA-3'). 2.5 ng d'ADN par réaction ont été utilisés pour la qPCR. Les concentrations de primeur de télomère étaient de 200 nM, et le primeur RAG1-F/RAG1-R à 300 nM. Les échantillons étaient distribués de manière aléatoire dans les plaques pour éviter tout biais. Les efficacités d'amplification étaient de RAG1: 96.97 ± 0.78 ; TEL: 99.60 ± 2.05 , et la variation interplaques de valeur de Ct étaient de 1.63 pour TEL et 0.74 pour RAG-1. La longueur des télomères était ensuite calculée comme un ratio T/S relativement au gène contrôle RAG1 en se basant sur des études précédentes (Cawthon 2002).

13. Expériences d'encagement en rivière

Expérience 1 : Pour tester les effets de l'eutrophisation sur les traits des goujons (notamment la coloration), une première expérience d'encagement a été effectuée en 2017 par Jessica Côte (postdoctorante) (Fig 11). Les détails sont publiés dans Côte et al. 2019.



Fig 11 : pose d'une cage dans un site agricole eutrophisé VENSAL pour les expériences d'encagement en rivière par Jessica Côte. Photo : Lisa Jacquin

2 sites eutrophes (AUSEI et VENSAL) et 2 sites oligotrophes (ARIMAS et GIVAB) ont été sélectionnés selon leur niveau de turbidité estimé grâce au niveau de Matière Organique en Suspension (SOM en mg/L) issu de la base de données Agence de l'Eau et de mesures directe dans l'eau au moment des pêches. Sur chaque site, une moitié des poisson (N=15 par site) a été encagée dans son propre site pour contrôler par le stress d'encagement tandis qu'une autre moitié (N= 15 par site) était transplantée dans un site plus ou moins eutrophe (Fig 12). Pour vérifier la turbidité pendant nos expériences, les valeurs de SOM ont été mesurées avant et après encagement, respectivement (moyenne \pm SE) : 0.031 ± 0.01 mg/L, 0.018 ± 0.005 mg/L pour les sites non eutrophes, et 0.17 ± 0.04 mg/L; 0.26 ± 0.31 mg/L pour les sites eutrophes. Chaque cage contenait 8 poissons et mesurait 70 x 48 x 39 cm avec des mailles de 5mm permettant aux invertébrés de passer au travers. Les poissons se nourrissaient donc seuls. Après 15 jours d'encagement, les poissons étaient mesurés et relâchés dans leur rivière d'origine. En 2017 une cage a été perdue lors d'une crue. Seul un poisson est mort, ce qui confirme que l'encagement ne cause pas de mortalité importante.

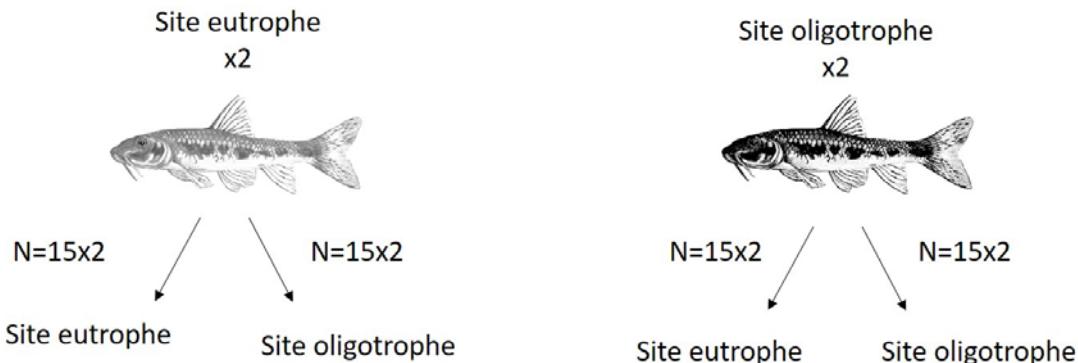


Fig 12 : Première expérience d'encagement. 2 sites d'origine eutrophes avec des taux élevés Matière Organique en Suspension (SOM) (AUSEI et VENSAL) et 2 sites oligotrophes avec peu de matières en suspension (ARIMAS et GIVAB) ont été sélectionnés et la moitié des poissons de chaque site ($N=15$) a été transplanté dans le même milieu (pour contrôler pour le stress d'encagement) ou dans un milieu différent (habitat de transplantation). Les détails de l'expérience et les résultats sont publiés dans Côte et al. 2019.

Expérience 2 : En 2018, une deuxième expérience d'encagement a été réalisée par Quentin Petitjean (doctorant) pour tester les effets de la contamination aux métaux lourds (Fig 13). 2 sites peu contaminés (ARIMAS et CELFIG) et 2 sites contaminés aux métaux lourds (AUSCOR et RIOU) ont été sélectionnés, et la moitié des poissons de chaque site ($N= 33$ poissons par site) a été placé dans son site d'origine, tandis que l'autre moitié ($N= 33$ poissons par site) a été placé dans un nouveau site plus ou moins contaminé (site de transplantation). Les poissons étaient placés par groupes de 10 à 12 poissons dans des cages de 70 x 48 x 39 cm (environ 130L) avec des mailles de 5 mm laissant passer la nourriture. Les poissons étaient préalablement marqués avec un élastomère (Northwest Marine Technologies, Inc., Shaw Island, Washington) pour identifier les individus. Après 7 jours, pour tester l'immunité des poissons et les effets de la contamination sur cette immunité, une moitié des poissons de chaque cage (groupe AMIX) a subi une injection d'une mixture d'antigènes LPS et PHA a été effectuée dans le pédoncule caudal selon des méthodes validées. Le LPS ou lipopolysaccharide est une molécule issue de paroi bactérienne (*Escherichia coli*, serotype: O111:B4, L2830 Sigma-Aldrich) et la PHA ou phytohaemagglutinin (phytohaemagglutinin-L, L8754 Sigma-Aldrich) est une molécule provoquant une réponse immunitaire cellulaire inflammatoire locale avec prolifération de lymphocytes T (Ardia and Clotfelter, 2006; Toomey et al., 2010). Ces réponses immunitaires sont transitoires et permettent de comparer les capacités immunitaires d'une large gamme de vertébrés sauvages (Martin et al., 2006; Tella et al., 2008). Dans cette étude, les poissons ont été injectés avec 10 μ L de mélange (groupe AMIX) de PHA ($90 \mu\text{g} \cdot 10 \mu\text{L}^{-1}$) et LPS ($90 \mu\text{g} \cdot 10 \mu\text{L}^{-1}$) ce qui correspond à $\approx 9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de chaque antigène en se basant sur des études précédentes (Petitjean et al., Submitted; Le Guernic et al., 2016). La deuxième moitié des poissons a subi une injection de solution saline neutre (PBS) pour contrôler par le stress d'injection. 14 jours après le début de l'expérience, les poissons étaient mesurés et collectés pour mesurer tous les biomarqueurs décrits plus haut.

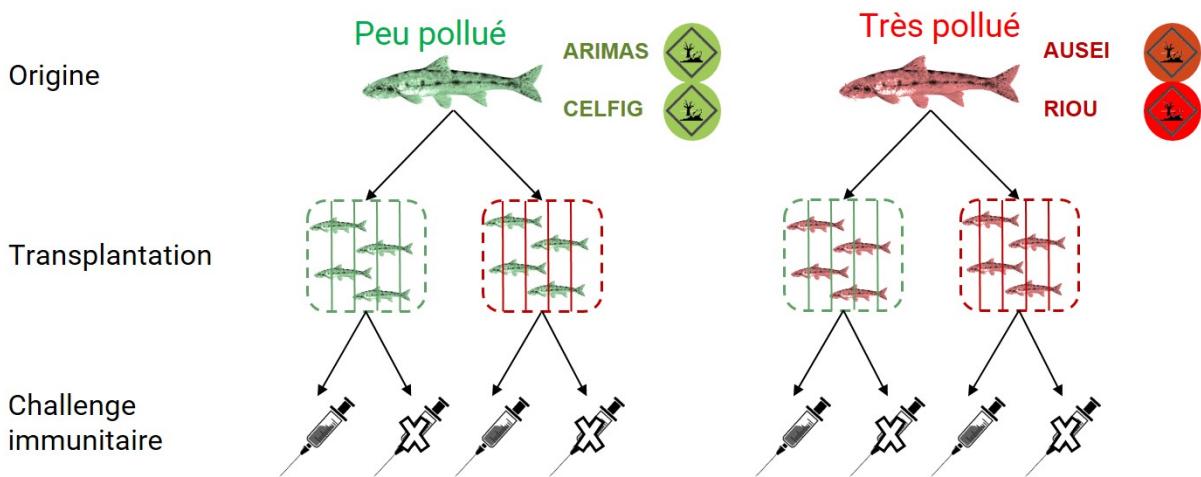


Fig 13. Expérience d'encagement entre 2 sites d'origine peu pollués aux métaux lourds (ARIMAS et CELFIG en vert) et 2 sites pollués (AUSEI et RIOU en rouge) (3 cages, 33 poissons par modalité). Une moitié des poissons était encagée dans son site d'origine pour contrôler par le stress d'encagement. Dans chaque cage, la moitié des poissons était injecté avec une mixture d'antigènes LPS et PHA (groupe AMIX) pour stimuler la réponse immunitaire.

14. Analyses statistiques

Pour tester les effets des perturbations sur l'état de santé des poissons (morphologie, condition, croissance, lésions, physiologie etc), des analyses corrélatives ont d'abord été effectuées sur les poissons capturés sur le terrain en 2016. Des modèles linéaires mixtes (*lme4* R library) ont été utilisés dans un premier temps sur chaque trait, avec les stress environnementaux (gradient d'eutrophisation, d'urbanisation : axes d'ACP environnementales) comme effets fixes, et l'identité du site nesté dans le gradient amont-aval comme effet aléatoire. Ces analyses sont détaillées dans Côte et al. (under revisions in Freshwater Biology). Puis, des tests de Mantel (R package *Ade4*) ont été utilisés pour tester la relation entre matrices de divergence phénotypique (par exemple les différences de morphologie entre chaque paire de sites) et les matrices de distance environnementales (par exemple les différences d'eutrophisation ou d'urbanisation entre chaque paire de sites), en incluant la Fst (divergence génétique) comme covariable pour prendre en compte les différences génétiques neutres entre populations. La taille des poissons était également incluse comme covariable. Le sexe a été déterminé par dissection des gonades sur une partie des individus et les modèles ont été à nouveau testés, mais les résultats ne variaient pas en incluant le sexe, donc seuls les modèles les plus simples sans le sexe ont été présentés dans ce rapport.

Puis, d'autres analyses ont été conduites pour tester spécifiquement l'effet de la contamination aux métaux lourds, tout en prenant en compte d'autres stress environnementaux, et en testant les mécanismes physiologiques sous-jacents. Pour cela, des modèles SEM (Structural Equation Modelling) ont été utilisés (analyses détaillées dans Petitjean et al., soumis dans STOTEN). Les SEM sont des modèles probabilistes qui permettent de distinguer les réseaux complexes de causalité en testant différents scénarios de relations entre variables

(Grace, 2008). Une étape préliminaire avec des modèles linéaires mixtes a été utilisée pour trier les variables à conserver. Le gradient de contamination (TU inorganique dans l'eau), le gradient de température (coordonnées d'ACP incluant les températures moyennes par saison et les coefficients de variation de température), et le gradient de parasitisme (prévalence moyenne de Gyrodactyles par site), ainsi que leur interactions doubles, ont été inclus comme effets fixes, avec le site en effet aléatoire et la taille en covariable. Les autres variables physicochimiques et le sexe étaient également inclus comme covariables. Les meilleurs modèles ont été sélectionnés par AIC, et la colinearité entre prédicteurs vérifiée par le VIF ((Zuur et al., 2010). Dans une deuxième étape, des approches de Structural Equation Modelling (SEM) ont été utilisées, en incluant les variables sélectionnées dans l'étape précédente. Le R package PiecewiseSEM a été utilisé (Lefcheck, 2016), et les réseaux possibles ont été construits *a priori* basés sur la littérature et sur les modèles mixtes précédents, et comparés par AIC. Les modèles d'effet des contaminants avec ou sans sexe et avec ou sans axe de physicochimie donnaient les mêmes résultats qualitativement donc seuls les modèles les plus simples sans ces effets sont présentés ici. Comme les tailles d'échantillon variant pour chaque trait, des modèles séparés ont été menés sur chaque variable, notamment sur les variables du foie (lésions) qui ont été mesurés sur un plus petit nombre d'individus (N=113).

Enfin, pour la partie O3, pour comparer la divergence phénotypique *Pst* vs la divergence génétique neutre *Fst*, les valeurs ont été calculées pour chaque trait entre toutes les paires de populations en utilisant la formule $Pst = \sigma^2 Gb / (2\sigma^2 Gw + \sigma^2 Gb)$, avec $\sigma^2 Gw$ variation intrapopulation, et $\sigma^2 Gb$ la variation interpopulation pour chaque trait, estimés à partir de modèles mixtes linéaires (package lme4 de R). Les intervalles de confiance ont été calculés par bootstrap (O'Hara, 2005). Les comparaisons de *Pst* et *Fst* ont été effectuées selon les méthodes détaillées dans (Whitlock and Guillaume, 2009) et (Lind et al., 2011). Cette approche compare les différences entre *Pst* et *Fst* observées et les différences prédictes sous hypothèse de divergence génétique neutre, c'est-à-dire en cas de dérive génétique neutre et sans sélection naturelle, basé sur des distributions simulées. Si $Pst > Fst$, cela signifie que la divergence phénotypique du trait dépasse la divergence génétique neutre, ce qui suggère un processus adaptatif (sélection naturelle et/ou plasticité adaptative), bien que des calculs plus poussés de *Qst* sur des générations F2 de goujons seraient nécessaires pour confirmer ces hypothèses. Pour chaque trait, la distribution attendue de *Pst* a été générée avec des bootstraps de 10000 répliques.

Pour tester les effets de la transplantation, des modèles mixtes avec effet aléatoire de la cage inclus dans le couple de site considéré. Les effets fixes testés étaient le site d'origine des poissons (eutrophisé/non eutrophisé pour l'expérience 1 ou contaminé/peu contaminé pour l'expérience 2), leur site de transplantation, et les interactions entre site d'origine et de transplantation, avec la taille en covariable. Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel R (v 3.2.1).

RESULTATS

1. Usage des sols et physicochimie

L'analyse d'ACP (R library *ade4*) révèle que **la principale perturbation physicochimique trouvée dans les sites d'étude est l'eutrophisation, puis l'urbanisation**. En effet les deux premiers axes d'ACP expliquent 66 % de la variance (1^{er} axe: 41%, 2^{ème} axe: 25 %) (Figure 14). Le premier axe correspond à un gradient d'eutrophisation, avec les sites les plus eutrophisés à droite de l'axe correspondant à des **niveaux élevés de nitrites, phosphore, SOM et de température, et des niveaux bas d'oxygène**. Ces sites correspondent à des hauts pourcentages de **surface agricole** (Fig 14). Les coordonnées de chaque site sur cet axe 1 ont été extraites et utilisées comme un indice d'eutrophisation dans cette étude (indiqué en nuances de gris, Fig 14). De plus un deuxième axe d'ACP se dégageait, principalement expliqué par l'**urbanisation** et la température. Les coordonnées de chaque site sur cet axe 2 ont été extraites et utilisées comme un gradient d'urbanisation dans cette étude, (25% of variance expliqué) avec des sites plus urbains et chauds en haut de l'axe 2.

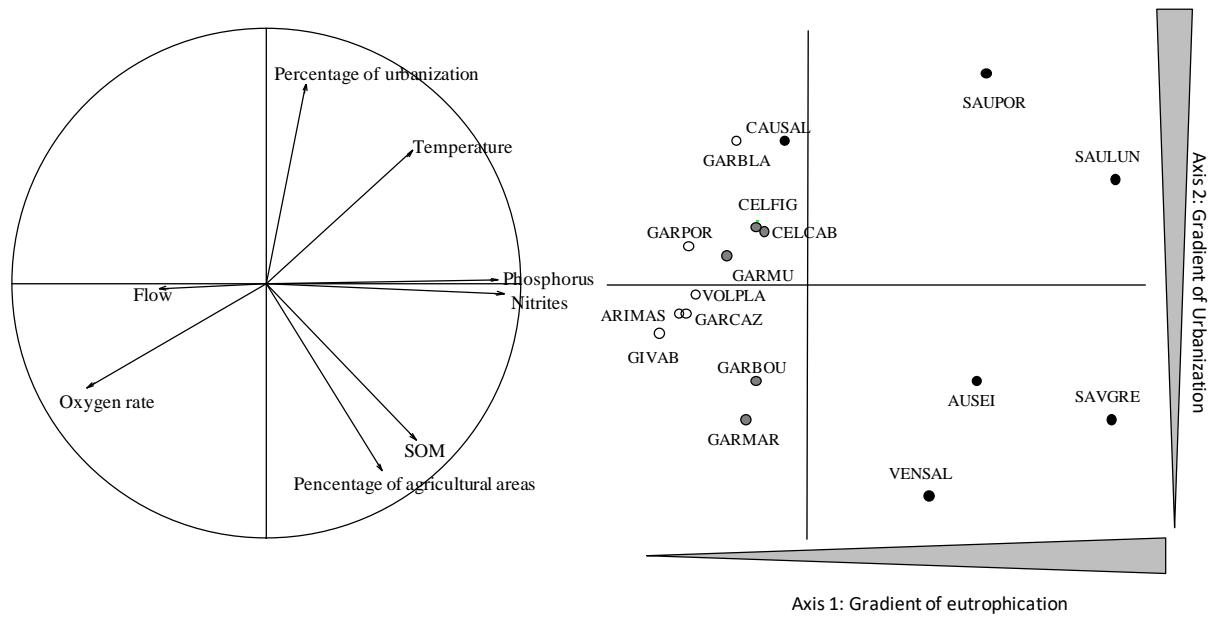


Fig 14: Analyse multivariée des variables physico-chimiques et de l'occupation des sols. (cercle de corrélation à gauche, et position des sites sur l'espace factoriel à droite). L'axe 1 explique 41% de la variance et correspond à un gradient d'eutrophisation. Les sites les plus eutrophes sont représentés en couleur plus foncée sur la droite de l'axe 1 et sont caractérisés par un niveau élevé de nitrites, phosphore, température et SOM (Matière organique en Suspension), et des niveaux bas d'oxygène. Le second axe correspond à un axe d'urbanisation (25% of variance expliqué) avec des sites plus urbains et chauds en haut de l'axe 2. Tiré de Côte et al. en révision dans *Freshwater Biology*.

2. Contamination aux métaux lourds

Dans un deuxième temps, des gradients de contamination ont été calculés sur les sites en se basant sur les données de l'Agence de l'Eau (portail SIE) et sur des mesures directes dans l'eau au moment des pêches. Les sites étaient bien distribués le long d'un **gradient de contamination inorganique** (du vert au rouge), avec les sites les moins contaminés aux métaux lourds étant le site de référence d'élevage ELEV (non représenté sur la figure) et le site naturel GIVAB (Gijou à Vabre, photo de gauche). Le site le plus pollué aux métaux lourds était le RIOU (Riou Mort à Decazeville, site industriel et minier, photo de droite) (Fig 15).

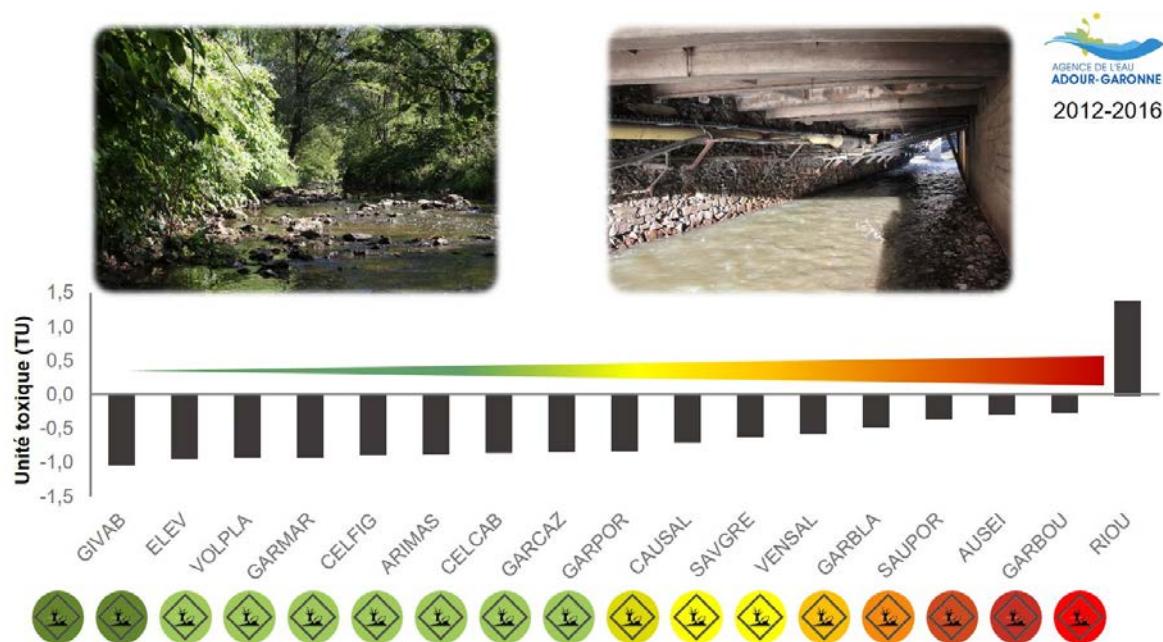


Fig 15. Sites d'étude le long du gradient de contamination aux métaux lourds dans l'ordre d'Unité Toxique (TU) croissante.

3. Morphologie

Les modèles statistiques montrent qu'il existe un lien significatif entre le gradient d'eutrophisation du milieu (axe 1 de l'ACP des paramètres physico-chimiques) et la morphologie des poissons (axes PCA1 and PCA2 des traits morphologiques) (Table 3). Les tests de Mantel montrent également une corrélation significative entre des matrices de distance morphologiques (Pst de morphologie) et les matrices de distances d'eutrophisation entre sites ($r_{Mantel} = 0.307$, $p\text{-value} = 0.02$) (mais pas d'urbanisation). Les résultats montrent que les poissons des **sites les plus eutrophisés** (sites agricoles avec des niveaux élevés de nitrites, phosphore, température et niveaux bas d'oxygène) ont globalement un **corps plus large, une plus grande mâchoire, de plus petites nageoires et de plus grands yeux** que les poissons des sites moins eutrophisés (Fig 16).

Table 3. Modèles statistiques mixtes testant les liens entre eutrophisation (axe 1 de l'ACP environnementale) et l'urbanisation (axe 2 de l'ACP environnementale) sur différents traits morphologiques et physiologiques des poissons. Les P-values représentant les relations significatives sont en gras.

	χ^2	df	p-value
Morphologie (PCA1)			
Urbanisation	3.52	1	0.06
Eutrophisation	7.004	1	0.008
Taille	47.99	1	<0.001
Morphologie (PCA2)			
Urbanisation	0.022	1	0.88
Eutrophisation	5.012	1	0.02
Taille	13.38	1	<0.001
Condition corporelle			
Urbanisation	26.08	1	<0.001
Eutrophisation	9.78	1	0.002
Taille	4.58	1	0.03
Croissance			
Urbanisation	0.1841	1	0.67
Eutrophisation	0.4778	1	0.49
Taille	119.4864	1	<0.001
Energie disponible			
Urbanisation	0.46	1	0.502
Eutrophisation	4.23	1	0.04
Taille	15.42	1	<0.001

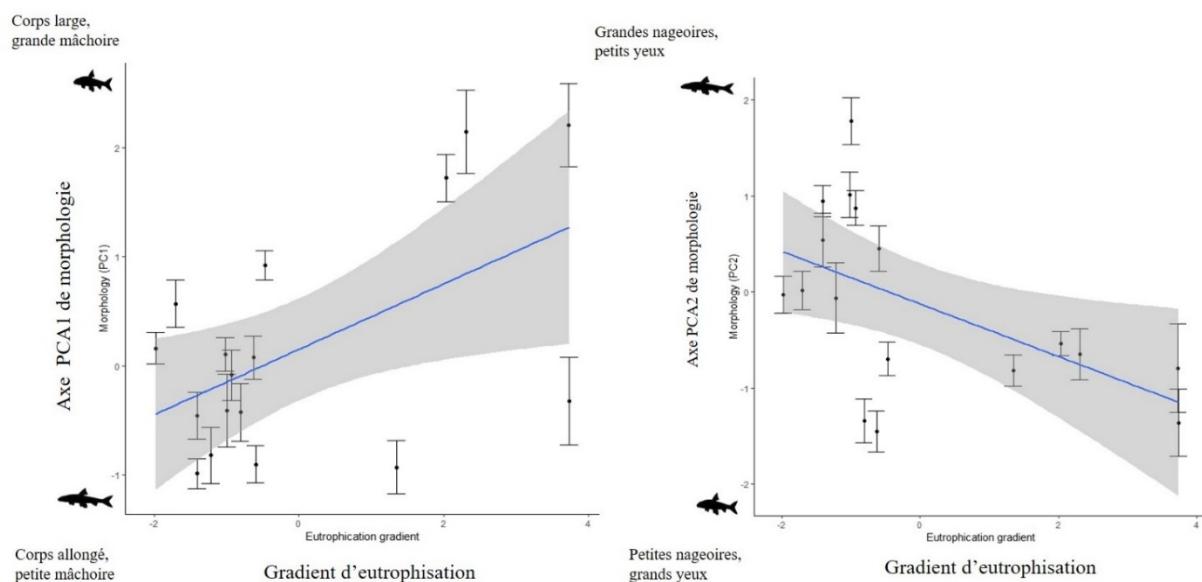


Figure 16. Lien entre la morphologie des poissons (axes PCA1 et PCA2 de l'ACP sur les traits morphologiques) et l'eutrophisation (axe 1 de l'ACP sur les paramètres physico-chimiques). La ligne bleue représente la droite de régression et la zone grise l'intervalle de confiance. Les résultats montrent que les poissons des sites les plus eutrophisés (sites agricoles avec des niveaux élevés de nitrates, phosphore, température et niveaux bas d'oxygène) ont globalement un corps plus large, une plus grande mâchoire, de plus petites nageoires et de plus grands yeux que les poissons des sites moins eutrophisés.

4. Coloration mélânique

Les poissons des sites les plus eutrophisés et les plus turbides et chargés en Matière Organique en Suspension (SOM) étaient significativement moins colorés que les poissons des sites moins eutrophisés ($\chi^2_1=10.27$, $p=0.001$) (Fig 17).

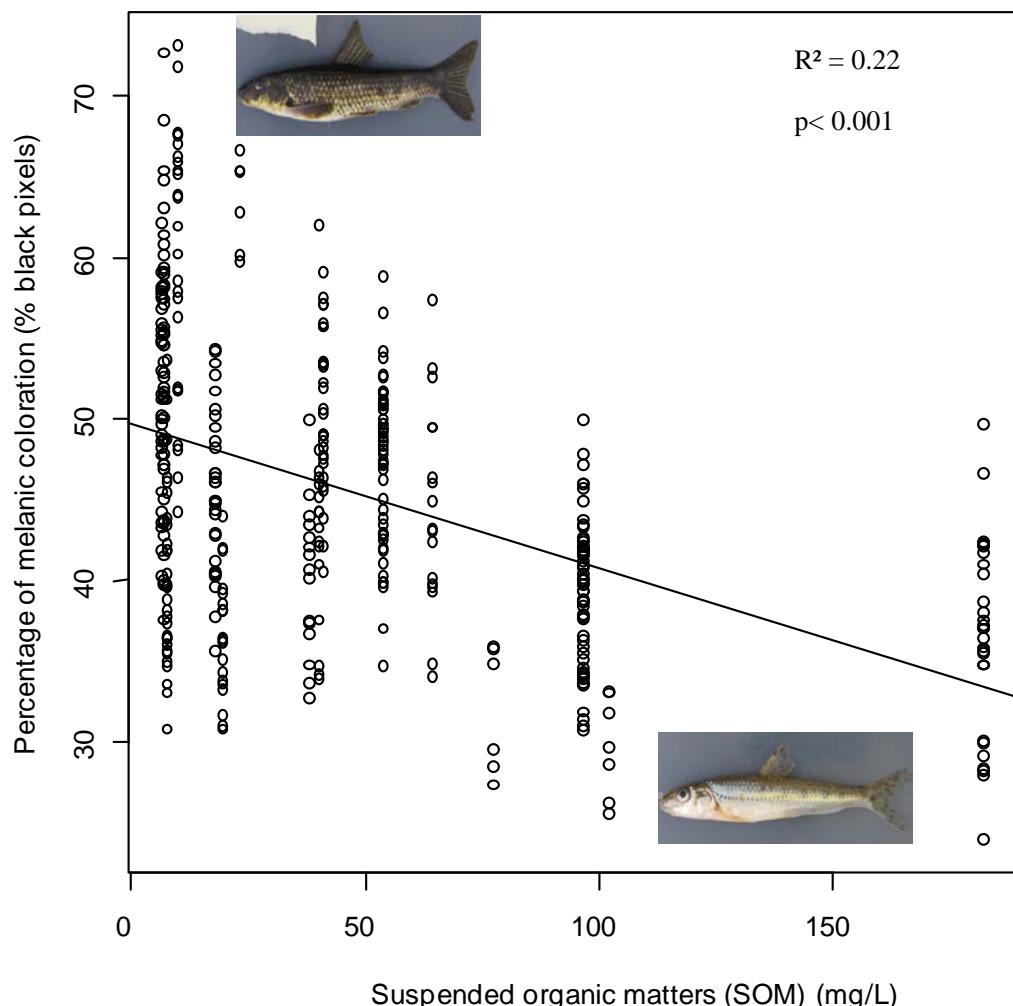


Figure 17. Relation entre la coloration mélânique (du plus clair au plus foncé, en % de pixels noirs) et les matières organiques en suspension de l'eau (SOM in mg/L) des différentes populations. Chaque point représente un individu.

La première expérience d'encagement (voir méthodes) a également montré que **les poissons des sites peu eutrophisés transférés en cage dans des sites eutrophisés devenaient rapidement plus clairs** (interaction habitat d'origine x habitat de transplantation $X^2= 6.07$, $P= 0.014$), ce qui suggère que ce changement de coloration est rapide et plastique. Les autres traits morphologiques et physiologiques ne répondaient pas de manière parallèle entre les deux réplicats, et ne seront pas détaillés dans ce rapport. Les résultats de cette expérience sont décrits dans (Côte et al., 2019).

5. Condition et croissance

Il existait un lien significatif entre condition corporelle, eutrophisation et urbanisation (Table 3). Les tests de Mantel montrent aussi des liens significatifs entre matrices de distance ($r_{Mantel} = 0.37$, $p = 0.01$ and $r_{Mantel} = 0.42$, $p = 0.01$ pour l'eutrophisation et l'urbanisation, respectivement). Les poissons des sites les plus eutrophisés et les plus urbains avaient une condition corporelle plus élevée que les poissons des sites moins urbains (Figure 18). Les analyses des modèles SEM montrent également un effet de la température sur la condition corporelle : les poissons des sites les plus chauds sont également en meilleure condition corporelle (estimate: 0.56, $p = 0.015$).

La croissance n'était pas affectée par l'eutrophisation, ni l'urbanisation. En revanche elle était liée à l'interaction contamination x température. Les poissons des sites les plus chauds et les plus contaminés avaient un taux de croissance ralenti par rapport aux autres poissons (estimate = -0.77, $P=0.010$).

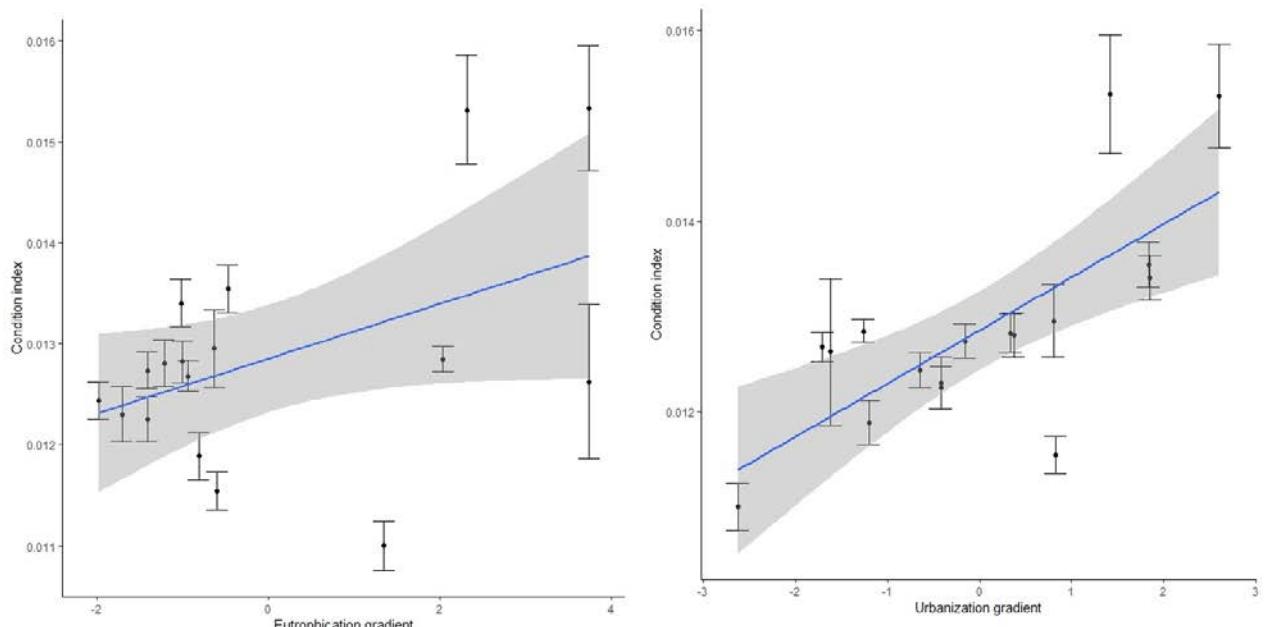


Fig 18: lien entre condition corporelle des poissons (indice de Fulton) et eutrophisation (axe 1 de l'ACP environnementale, gauche) et urbanisation (axe 2 d'ACP, droite). Les poissons des sites les plus eutrophes et ceux des sites les plus urbains avaient un indice de Fulton plus élevé.

6. Infection parasitaire

Les modèles mixtes montrent que la charge parasitaire n'était pas corrélée à l'eutrophisation et ni à l'urbanisation ($P>0.1$). De même les analyses de SEM montrent que la contamination aux métaux lourds, ou la température n'affectaient pas la charge parasitaire des poissons (détails dans Petitjean et al. soumis dans STOTEN). La charge parasitaire des poissons était uniquement affectée par le gradient de parasitisme. Les poissons les plus exposés au risque parasitaire (prévalence moyenne de parasites par site) étaient aussi ceux qui portaient le plus grand nombre de parasites (charge parasitaire individuelle) (estimate = 0.29, $P=0.009$). De plus les poissons des sites les plus parasités avaient également une activité immunitaire N/L plus forte (estimate = 0.19, $P=0.01$), ce qui peut être dû à une immunostimulation par les parasites, mais il n'existe aucun lien entre l'état immunitaire du poisson et sa charge parasitaire. Au final, **les stress chimiques n'avaient donc pas d'impact évident sur la charge parasitaire des poissons.**

7. Bioaccumulation

Les modèles SEM montrent que les **poissons accumulaient une quantité significative de métaux dans leurs muscles** (Table 4), notamment en fonction de leur taille et du niveau de contamination de l'eau (TU plus élevée) (estimate = 0.16, $P=0.034$). Les détails des taux de métaux dans les muscles sont donnés dans le tableau ci-dessous. **Les poissons des sites les plus contaminés aux métaux lourds avaient donc plus de métaux dans leurs muscles.** Les métaux les plus discriminants dans l'eau et les muscles étaient le Cu, Zn et Cd (Table 4).

Table 4. Concentration moyenne ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec) et déviation standard (SD) pour 9 éléments trace métalliques dans les muscles des poissons. La fiabilité des analyses a été établie par comparaison avec le standard TORT-3 (lobster hepatopancreas) sauf pour l'Al (standard SLRS-6).

Sites	TU	n	Al	As	Co	Pb	Zn	Ni	Cd	Cr	Cu
GIVAB	-1	21	11.0 \pm 9.7	0.18 \pm 0.094	0.024 \pm 0.012	0.11 \pm 0.10	50.9 \pm 23.7	0.38 \pm 0.31	0.056 \pm 0.12	0.31 \pm 0.31	1.66 \pm 0.37
ARIMAS	-0.9	19	7.18 \pm 9.9	0.11 \pm 0.047	0.018 \pm 0.012	0.17 \pm 0.25	47.7 \pm 12.3	0.19 \pm 0.14	0.064 \pm 0.15	0.16 \pm 0.12	1.68 \pm 0.35
CELFIG	-0.9	20	17.7 \pm 29.1	0.30 \pm 0.16	0.033 \pm 0.023	0.14 \pm 0.17	43.9 \pm 15.7	0.35 \pm 0.18	0.06 \pm 0.04	0.39 \pm 0.28	1.53 \pm 0.36
GARMAR	-0.9	21	5.3 \pm 2.64	0.14 \pm 0.047	0.021 \pm 0.007	0.056 \pm 0.03	48.9 \pm 20.7	0.37 \pm 0.24	0.101 \pm 0.33	0.22 \pm 0.23	1.80 \pm 0.64
VOLPLA	-0.9	19	6.97 \pm 3.94	0.08 \pm 0.022	0.017 \pm 0.01	0.055 \pm 0.03	42.5 \pm 14.0	0.34 \pm 0.25	0.013 \pm 0.01	0.42 \pm 0.60	1.56 \pm 0.45
CELCAB	-0.8	17	7.59 \pm 8.78	0.29 \pm 0.079	0.02 \pm 0.01	0.051 \pm 0.03	34.9 \pm 8.4	0.31 \pm 0.16	0.076 \pm 0.07	0.673 \pm 0.64	1.75 \pm 0.83
GARCAZ	-0.8	29	17.1 \pm 14.5	0.18 \pm 0.08	0.043 \pm 0.05	0.17 \pm 0.2	42.4 \pm 12.9	0.48 \pm 0.33	0.245 \pm 0.83	0.43 \pm 0.53	1.74 \pm 0.39
GARPOR	-0.8	3	7.98 \pm 2.96	0.19 \pm 0.074	0.017 \pm 0.008	0.10 \pm 0.05	34.7 \pm 3.28	0.32 \pm 0.12	0.138 \pm 0.11	0.31 \pm 0.19	1.42 \pm 0.47
CAUSAL	-0.7	19	8.39 \pm 5.39	0.24 \pm 0.16	0.02 \pm 0.013	0.097 \pm 0.06	49.1 \pm 24.91	0.26 \pm 0.15	0.011 \pm 0.01	0.36 \pm 0.24	1.87 \pm 1.27
SAVGRE	-0.6	8	25.5 \pm 30.2	0.177 \pm 0.037	0.014 \pm 0.004	0.094 \pm 0.05	56.8 \pm 22.16	0.79 \pm 1.38	0.23 \pm 0.25	0.20 \pm 0.15	1.87 \pm 0.53
VENSAL	-0.6	19	11.5 \pm 10.0	0.136 \pm 0.041	0.018 \pm 0.007	0.12 \pm 0.107	25.3 \pm 4.3	0.43 \pm 0.54	0.24 \pm 0.57	0.34 \pm 0.21	1.72 \pm 1.03
GARBLA	-0.5	17	6.20 \pm 3.12	0.187 \pm 0.046	0.024 \pm 0.016	0.18 \pm 0.37	48.9 \pm 23.0	0.24 \pm 0.12	0.048 \pm 0.074	0.25 \pm 0.17	1.82 \pm 0.49
GARBOU	-0.3	8	8.15 \pm 6.01	0.288 \pm 0.038	0.015 \pm 0.005	0.20 \pm 0.31	40.1 \pm 9.9	0.35 \pm 0.30	0.17 \pm 0.30	0.27 \pm 0.23	1.79 \pm 0.42
SAUPOR	-0.3	6	8.59 \pm 7.98	0.476 \pm 0.169	0.022 \pm 0.021	0.11 \pm 0.11	58.5 \pm 34.3	0.28 \pm 0.21	0.012 \pm 0.006	0.31 \pm 0.32	2.34 \pm 1.46
AUSEI	-0.2	21	6.70 \pm 4.28	0.093 \pm 0.025	0.022 \pm 0.02	0.073 \pm 0.05	38.6 \pm 14.3	0.26 \pm 0.17	0.04 \pm 0.10	0.22 \pm 0.17	1.57 \pm 0.61
RIOU	1.3	15	1.85 \pm 0.67	0.343 \pm 0.11	0.014 \pm 0.005	0.093 \pm 0.05	93.0 \pm 52.1	0.17 \pm 0.10	0.29 \pm 0.14	0.073 \pm 0.05	2.5 \pm 1.81
Recovery in % (Tort-3)	NA	8	99 \pm 2 *	85 \pm 12	90 \pm 12	100 \pm 15	95 \pm 12	89 \pm 9	91 \pm 15	104 \pm 8	89 \pm 9

8. Réserves énergétiques

Les modèles mixtes montrent que les poissons des sites les plus eutrophisés avaient un plus haut niveau d'énergie disponible (AE) dû à une plus forte concentration de lipides dans leurs muscles comparés avec les poissons des sites les moins eutrophisés (Table 3) (Côte et al. en révisions dans *Freshwater Biology*). De plus, les analyses SEM montrent que les poissons des sites les plus contaminés ont plus d'énergie dans leurs muscles, dû à un taux plus élevé de lipides (estimate =0.57, P=0.002), ce qui amplifiait la bioaccumulation de métaux décrite ci-dessus (estimate =0.24, P=0.008).

9. Immunité

La bioaccumulation de métaux provoquait une augmentation importante du ratio N/L (estimate= 0.10, P=0.03), qui suggère un phénomène d'**inflammation causé par l'accumulation de métaux dans les tissus du poisson**.

10. Lésions cellulaires

Cette inflammation causée par l'accumulation de métaux dans les tissus du poisson provoquait à son tour une **augmentation des lésions cellulaires** dans le foie (estimate =0.30, P=0.013), mais pas d'impact sur l'indice Hépatosomatique HSI (Fig 19).

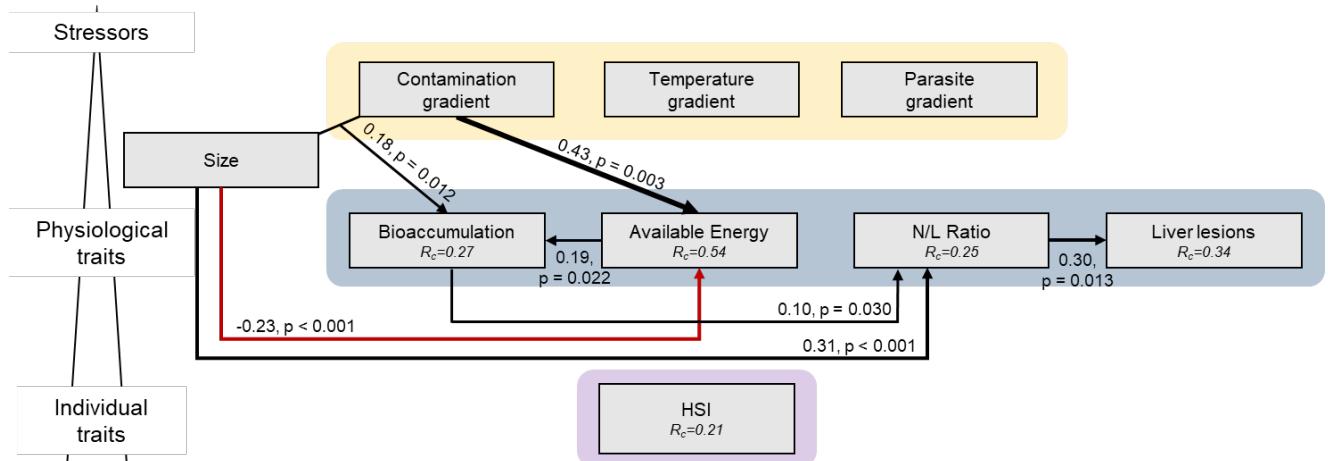


Fig 19. Modèles à Equation Structurelle testant les effets des stress environnementaux sur le foie et les mécanismes physiologiques sous-jacents ($CFI = 14.592$, $df = 18$, $n=113$ poissons testés). Les relations significatives sont représentées par des flèches solides (rouge : relation négative, noir : relation positive). Les coefficients et les p values sont données au-dessus des flèches. Les modèles montrent que la contamination aux métaux lourds de l'eau (en jaune) provoque une bioaccumulation de métaux dans les muscles amplifiée par un stockage d'énergie (gris), ce qui provoque une augmentation du ratio immunitaire d'inflammation N/L, qui provoque à son tour des lésions du foie. Ces différents processus sont plus marqués chez les grands poissons (effet taille/âge).

11. Télomères

Aucun effet des stress environnementaux n'a été trouvés sur la longueur des télomères, même corrigé par l'âge du poisson (goodness of fit: $p = 0.525$, $CFI = 11.05$, $df = 12$, $n = 107$).

12. Génétique

Au sein des populations du bassin de la Garonne, les analyses montrent une bonne diversité allélique (N et AR) et peu de consanguinité FIS (voir Table 5). De plus la différenciation génétique neutre Fst moyenne entre populations est de 0.05 (entre 0.003 et 0.2), ce qui suggère une structuration génétique faible entre nos populations échantillonnées, c'est-à-dire des **flux**

de gènes importants entre populations de goujons et une faible contribution de la dérive génétique aux différences phénotypiques observées. L'eutrophisation et l'urbanisation n'avaient pas d'impact significatif sur la diversité génétique, ni sur la différenciation génétique (Fst) entre populations.

Table 5 Indices de diversité génétique (N: nombre d'allèles, AR: Richesse Allélique, He: Hétérozygotie attendue, Ho: Hétérozygotie observée, Fis: coefficient de consanguinité) pour chaque site

Site	Nbe poissons	N allèles	Ar	He	Ho	Fis
ARIMAS	24	6.4	3.99	0.566	0.5639	0.025
AUSEI	58	11.6	5.16	0.6983	0.6954	0.013
CAUSAL	28	5.33	3.59	0.561	0.5381	0.059
CELCAB	20	8.53	5.32	0.6967	0.6467	0.097
CELFIG	29	10.33	5.27	0.6868	0.6943	0.007
GARBLA	20	9.13	5.39	0.6906	0.6933	0.022
GARBOU	15	8.13	5.47	0.7119	0.6978	0.054
GARCAZ	29	11.13	5.40	0.6844	0.6759	0.03
GARMAR	50	12.33	5.19	0.6711	0.6547	0.035
GARMU	16	8.13	5.15	0.6471	0.6292	0.06
GARPOR	15	8.07	5.19	0.6475	0.6349	0.054
GIVAB	24	8.67	4.67	0.6127	0.6139	0.019
SAULUN	6	5.13	5.13	0.6222	0.6333	0.073
SAUPOR	6	5.2	5.2	0.6417	0.6889	0.017
SAVGRE	7	6	5.55	0.683	0.7048	0.045
VENSAL	30	9	5.06	0.6624	0.6622	0.017
VOLPLA	30	9.87	5.07	0.6515	0.6422	0.031

De plus, la différenciation phénotypique globale ($Pst= 0.049$ en moyenne) entre sites est plus élevée que la différenciation génétique neutre Fst ($P< 0.001$) pour les traits morphologiques (PCA1, PCA2) et la plupart des traits physiologiques (condition, réserves, croissance). Ce résultat suggère que les différences phénotypiques observées entre populations ne sont pas causées uniquement par la dérive neutre, et que **la sélection naturelle liées aux activités humaines joue sans doute un rôle important** (Fig 20).

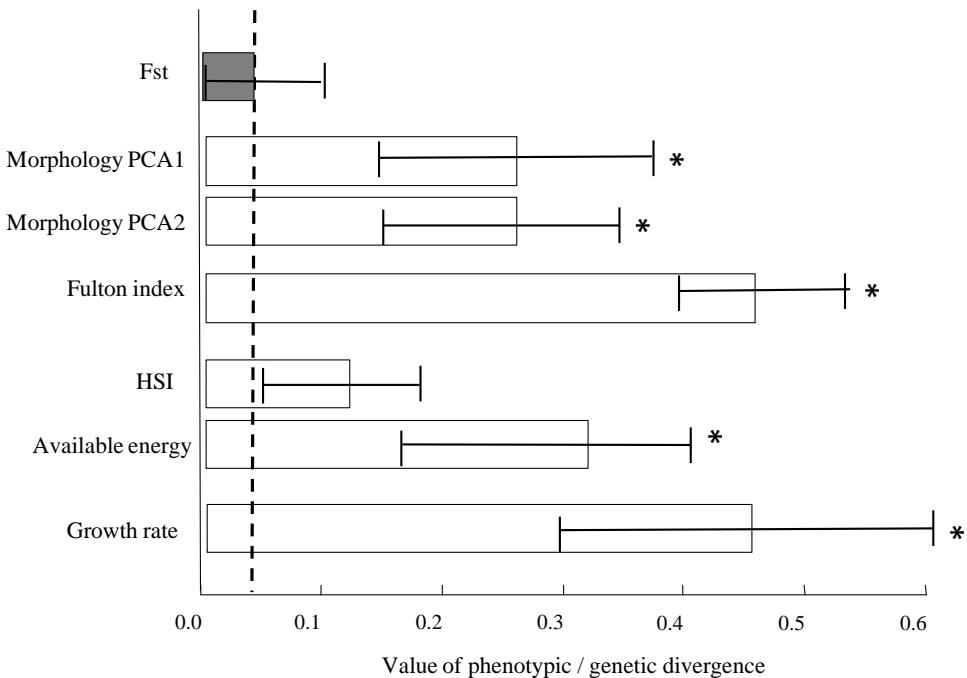


Figure 20. Divergence génétique neutre (Fst) et phénotypique (Pst) entre sites : axes de morphologie, indice de condition corporelle de Fulton, Indice Hépatosomatique (HSI), énergie disponible dans les muscles, et taux de croissance. La ligne pointillée marque la valeur moyenne de Fst, et les barres d'erreur correspondent aux intervalles de confiance à 95%. Les étoiles représentent les traits pour lesquels la valeur de divergence phénotypique Pst est significativement supérieure à la divergence génétique neutre (Fst), ce qui indique un effet probable de la sélection naturelle sur ce trait.

13. Adaptation locale : encagement en rivière

La deuxième expérience d'encagement a été très probante et a montré des réponses parallèles entre réplicas. Le premier résultat important est que les poissons des sites d'origine les plus contaminés aux métaux lourds (en rouge) sont moins affectés par une transplantation en milieu contaminé (survie de 100%), tandis que les poissons issus de sites moins contaminés (en vert) subissent une baisse de survie 14 jours après avoir été transplantés en milieu contaminé (70% à 80% de survie) (Fig 21 gauche) (effet interaction origine x transplantation : $\text{Chisq}=6.54$, $P=0.011$). De plus, des différences de réponses physiologiques importantes existaient entre ces poissons selon leur origine. Notamment, les poissons issus des sites peu contaminés (en vert) subissaient une immunodépression en réponse à l'injection lorsqu'ils étaient transplantés en milieu contaminé (Fig 21 droite) (interaction origine x transplantation : $\text{chisq} = 4.37$, $P= 0.037$). En revanche les autres biomarqueurs ne répondaient pas de manière parallèle entre réplica et les autres résultats ne sont donc pas présentés dans ce rapport. Ces différences de réponse suggèrent des phénomènes d'adaptation locale à la contamination chez les poissons exposés depuis plusieurs générations dans leur rivière d'origine, mais des expériences complémentaires sur leurs descendants F1 ou F2 soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

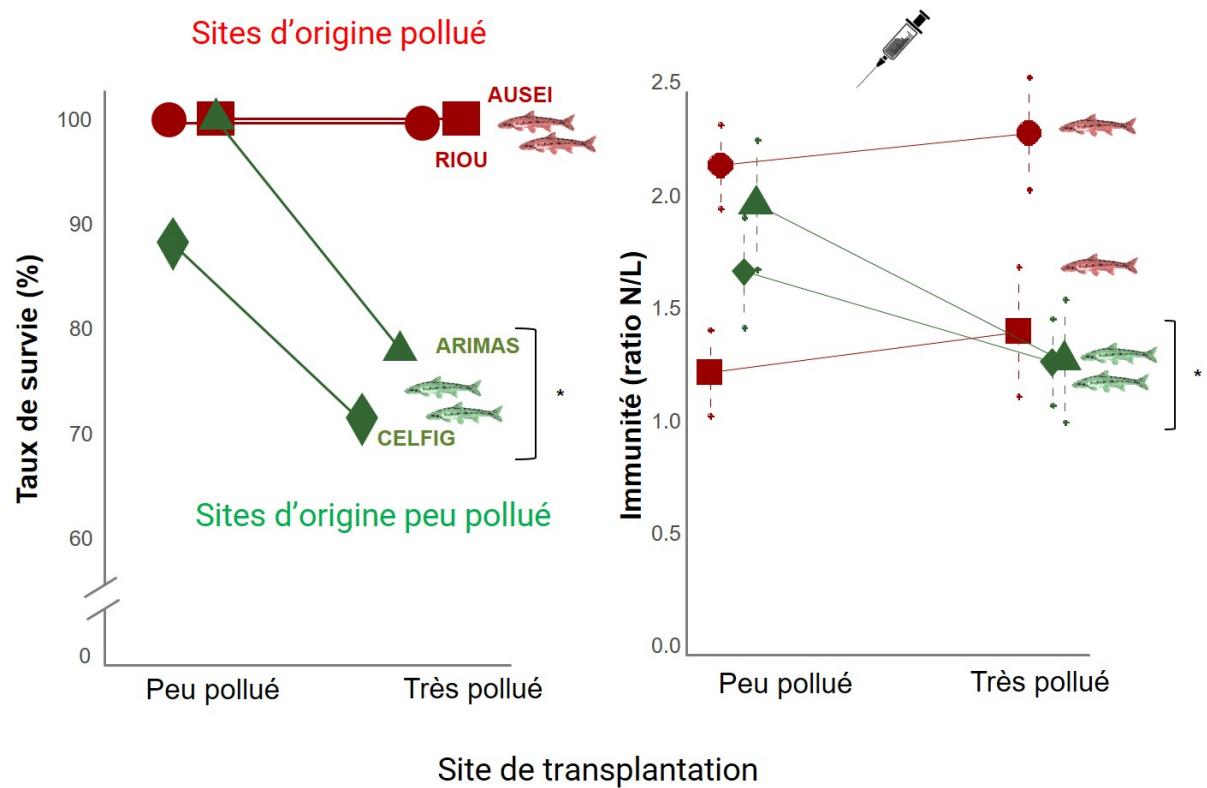


Fig 21 : survie (gauche) et de réponse immunitaire inflammatoire (droite, poissons injectés AMIX) entre poissons transplantés dans un site peu pollué ou très pollué aux métaux lourds, selon leur population d'origine (vert : poissons issus de sites d'origine peu pollués, rouge : poissons issus de sites d'origine pollué).

DISCUSSION

O1 : caractérisation des stress environnementaux

L'objectif 1 était de caractériser les stress environnementaux associés aux activités humaines pouvant affecter l'état de santé des poissons. L'usage des sols, les perturbations physicochimiques, et la contamination, notamment métallique, ont été comparés dans 18 sites du bassin Adour-Garonne. Globalement, les résultats montrent que les **sites agricoles** étaient les plus perturbés, avec une **eutrophisation** importante (fort taux de phosphore, azote, et matière organique et faible taux d'oxygène). Les **sites urbains** étaient moins dégradés (hausse de température de l'eau). D'autre part, il existait une **contamination aux métaux lourds** importante dans certains sites agricoles et industriels qui était cohérent entre les données de l'Agence de l'Eau et les mesures directes effectuées dans l'eau, les sédiments et les muscles de poisson. La **base de données SIE est donc très fiable** pour estimer la contamination métallique des rivières du bassin Adour-Garonne. Les contaminants organiques (pesticides et phtalates notamment) étaient plus difficiles à mesurer en raison de difficultés techniques et/ou de leur métabolisation rapide dans l'organisme. La partie O2 s'attache à caractériser les effets des stress chimiques (notamment eutrophisation et métaux lourds) sur l'état de santé des poissons.

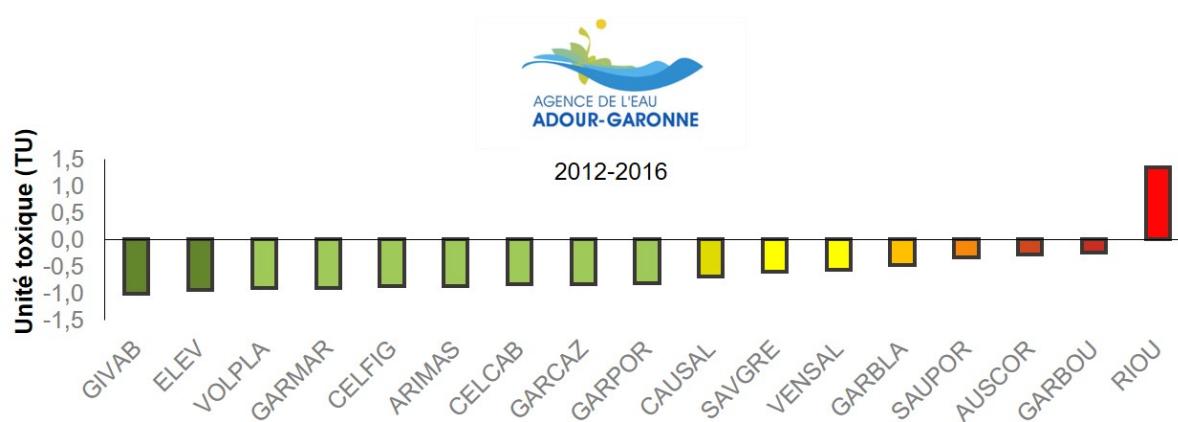


Fig 22. Sites d'étude le long du gradient de contamination aux métaux lourds dans l'ordre d'Unité Toxique (TU) croissante. Le site le plus contaminé était le site du Riou Mort, un site industriel et ancien site minier, caractérisé par des concentrations élevées de métaux, notamment Cu, Zn, et Cd dans l'eau, les sédiments, et les tissus de goujons.

02 : effets des stress sur l'état de santé des poissons

Deux études de terrain ont été menées pour caractériser les effets de ces différents stress environnementaux sur les poissons à l'aide de différents biomarqueurs et les résultats sont résumés dans le tableau ci-dessous (Table 6).

Table 6: résumé des principaux effets des stress environnementaux sur l'état de santé des goujons dans les 18 sites du bassin de la Garonne

	Stress environnementaux					
Variable	Eutrophisation	Urbanisation	Métaux lourds	Température	Métaux x Temp	Parasitisme
Morphologie	Largeur du corps ++ Taille des mâchoires + Taille des nageoires - Taille des yeux + Coloration -	0	0	0	0	Taille +
Condition	+	+	0	+	0	0
Croissance	0	0	0	0	-	+
Charge parasitaire	0	0	0	0	0	++
HSI	0	0	0	0	0	0
Bioaccumulation de métaux	0	0	++	0	0	0
Energie disponible	++ (lipides)	0	++ (lipides)	0	0	0
Inflammation (ratio immunitaire N/L)	0	0	+	0	0	+
Lésions cellulaires	0	0	++	0	0	0
Télomères	0	0	0	0	0	0

Les stress environnementaux avaient différents effets selon les biomarqueurs et l'échelle biologique considérée. De plus, les **sites urbains étaient peu dégradés** et l'urbanisation avait peu d'effets détectables sur les poissons. En revanche l'**eutrophisation** des sites les plus **agricoles** était associée à des **changements morphologiques** importants à l'échelle de l'individu. Les poissons des sites eutrophisés avaient un **corps plus large, une mâchoire plus longue, des yeux plus gros et des nageoires plus petites**, ce qui suggère un changement d'**alimentation** important (Côte et al. en révisions dans Freshwater Biol) (Fig 23). Des analyses de macroinvertébrés et/ou de contenu stomacaux seraient cependant nécessaires pour caractériser leur régime alimentaire. D'autre part, les poissons des sites les plus eutrophisés avaient également une **coloration beaucoup plus claire** que les poissons des sites moins eutrophisés, ce qui soulève des inquiétudes quant aux effets de cette eutrophisation sur la **communication visuelle** entre individus et la sélection sexuelle (détails dans Côte et al. 2019 Biol J Linn Soc). De plus, les poissons des sites eutrophisés avaient une condition corporelle et des réserves énergétiques plus importantes, mais

le **fort taux de lipides** dans leurs muscles pourrait avoir des effets secondaires inquiétants, notamment en amplifiant la bioaccumulation de contaminants, notamment métalliques.

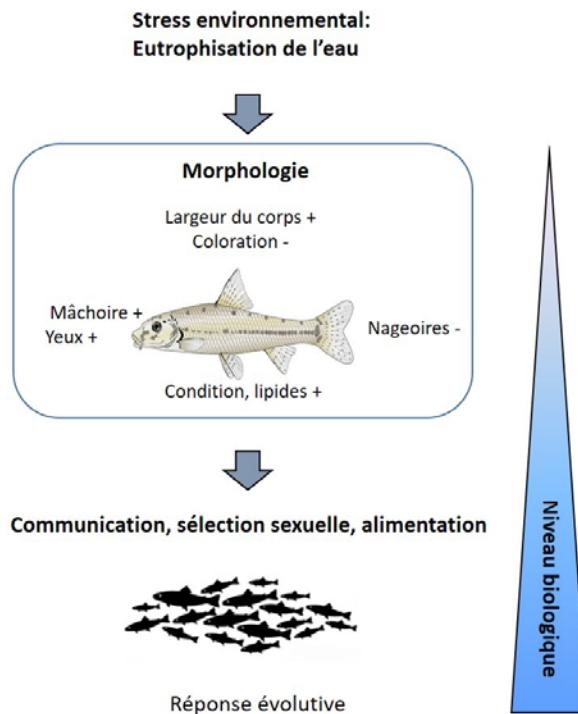


Fig 23: Résumé des effets de l'eutrophisation dans cette étude au niveau individuel et conséquences potentielles au niveau populationnel

Dans un second temps, une seconde étude de terrain a caractérisé plus finement le gradient de contamination métallique et ses effets sur la santé des poissons à plusieurs échelles biologiques grâce à des modèles d'équations structurelles (SEM). Les résultats ont montré que les **métaux lourds** étaient bien **bioaccumulés** par les poissons, ce qui causait une **hyperinflammation et des lésions cellulaires** sévères dans le foie (Fig 24). De plus, les poissons des sites les plus contaminés accumulaient aussi plus de **lipides** dans leurs muscles, ce qui amplifiait la bioaccumulation de métaux et ses effets négatifs sur l'état de santé des poissons (**boucle de rétroaction positive**). Des études complémentaires sur les effets des métaux sur le métabolisme de lipides seraient maintenant nécessaires pour décrypter les mécanismes sous-jacents. De plus, la croissance des poissons était affectée, mais seulement en cas de stress multiples, c'est-à-dire d'exposition conjointe à la contamination et une température élevée.

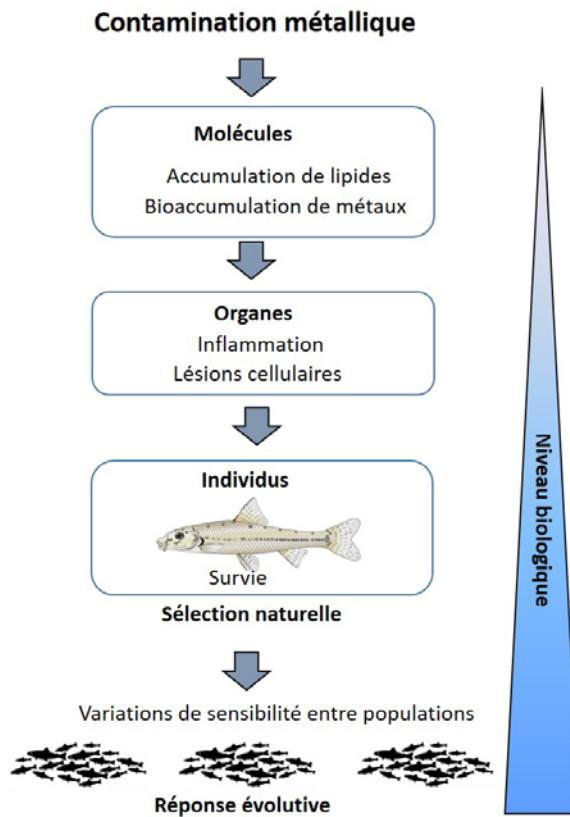


Fig 24: résumé des effets en cascade de la contamination métallique, des molécules aux individus, et effets potentiels sur les populations

En revanche, contrairement à nos attentes, les parasites (notamment *Gyrodactylus sp.*) avaient peu d'effets négatifs sur les poissons et induisaient surtout une immunostimulation, mais pas de lésions particulières. De plus, les différents **stress chimiques ne modifiaient pas la prévalence ou l'intensité du parasitisme** chez les poissons. Il est donc possible que les parasites soient également impactés par les stress environnementaux, mais des études expérimentales manipulant la charge parasitaire seraient nécessaires pour tester cette hypothèse (Budria, 2017).

03 : variabilité de sensibilité et adaptation locale

Des analyses génétiques (microsatellites) ont également été menées pour comparer la divergence phénotypique des différents traits morphologiques et physiologiques avec la divergence génétique neutre entre populations ayant évolué dans différents contextes de perturbations. Les analyses génétiques montrent tout d'abord que les goujons du bassin de la Garonne sont bien distincts génétiquement des goujons du bassin de la Loire notamment. De plus, la différenciation génétique neutre Fst entre nos 18 populations du bassin de la Garonne était faible, ce qui suggère des flux de gènes et/ou des tailles effectives de population importantes. De plus, aucun effet négatif des perturbations humaines étudiées n'a été détecté sur la **diversité génétique** (microsatellites) des populations. Ce résultat suggère que les flux de gènes et/ou les tailles de population sont suffisantes

dans le bassin de la Garonne pour assurer une bonne diversité génétique chez cette espèce (Côte et al. en révisions).

De plus, la divergence phénotypique (Pst) de morphologie, de coloration, de croissance et de physiologie entre populations étaient supérieure à la divergence génétique neutre (Pst>Fst), ce qui suggère que les différences phénotypiques entre les populations étudiées ne sont pas dues à la dérive génétique neutre mais sans doute à des phénomènes de **sélection naturelle**. Des études complémentaires chez les générations F1 et F2 seraient nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Une perspective scientifique en cours est de faire reproduire les populations sauvages les plus divergentes pour tester à nouveau leurs descendants F1 et F2 et tester les mécanismes évolutifs à l'origine de ces différences entre populations.

Une expérience d'engagement a également été conduite pour mesurer les effets des perturbations physiologiques causées par la contamination métallique sur la santé et la survie des poissons en conditions réalistes de terrain, et pour comparer la la plasticité physiologique des populations ayant évolué dans différents contextes de contamination métallique. Cette expérience, montre que les **populations des sites les plus pollués avaient de meilleures capacités physiologiques** à tolérer la contamination métallique, notamment via une meilleure gestion de la réponse inflammatoire, qui se traduisait ensuite par une meilleure survie en cage. Ces résultats, ainsi que l'ensemble de la thèse de Quentin Petitjean (2019), suggèrent des phénomènes **d'adaptation locale à la contamination** chez le goujon, qui pourraient expliquer la présence de cette espèce dans des rivières très polluées. Il serait maintenant intéressant de caractériser plus précisément les gènes qui pourraient conférer cette tolérance/résistance aux métaux lourds dans certaines populations de goujon pour tester cette hypothèse. Une autre piste de recherche que nous développons actuellement est de tester le **rôle du microbiote** dans la tolérance des goujons aux stress environnementaux. Nos études préliminaires ont en effet montré qu'il existait des différences importantes de microbiote de la peau des poissons de différents sites, et que la composition du microbiote répondait très rapidement à la transplantation.

Quels que soient les mécanismes sous-jacents, les résultats de cette étude soulignent l'importance de la variabilité intraspécifique de morphologie et de physiologie entre populations exposées aux perturbations humaines, et encourage la combinaison des approches **d'écotoxicologie et d'écologie évolutive** afin de mieux comprendre et anticiper les effets des stress actuels et futurs sur la biodiversité aquatique.

REFERENCES

- Acevedo-Whitehouse K, Duffus AJ. 2009. Effects of environmental change on wildlife health. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 364:3429–3438.
- Angelier F, Costantini D, Blévin P, Chastel O. 2018. Do glucocorticoids mediate the link between environmental conditions and telomere dynamics in wild vertebrates? A review. *General and Comparative Endocrinology* 256:99–111.
- Ardia DR, Clotfelter ED. 2006. The novel application of an immunological technique reveals the immunosuppressive effect of phytoestrogens in *Betta splendens*. *Journal of Fish Biology* 68:144–149.
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F. 2004. GENETIX4. 05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR 5000:1996–2004.
- Bize P, Criscuolo F, Metcalfe NB, Nasir L, Monaghan P. 2009. Telomere dynamics rather than age predict life expectancy in the wild. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276:1679–1683.
- Blanar CA, Munkittrick KR, Houlahan J, MacLatchy DL, Marcogliese DJ. 2009. Pollution and parasitism in aquatic animals: A meta-analysis of effect size. *Aquatic Toxicology* 93:18–28.
- Blévin P, Angelier F, Tartu S, Ruault S, Bustamante P, Herzke D, Moe B, Bech C, Gabrielsen GW, Bustnes JO, Chastel O. 2016. Exposure to oxychlordane is associated with shorter telomeres in arctic breeding kittiwakes. *Science of The Total Environment* 563–564:125–130.
- Bols NC, Brubacher JL, Ganassin RC, Lee LE. 2001. Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Developmental & Comparative Immunology* 25:853–873.
- Budria A. 2017. Beyond troubled waters: the influence of eutrophication on host–parasite interactions. *Funct Ecol* 31:1348–1358.
- Cable J, Van Oosterhout C. 2007. The role of innate and acquired resistance in two natural populations of guppies (*Poecilia reticulata*) infected with the ectoparasite *Gyrodactylus turnbulli*. *Biological Journal of the Linnean Society* 90:647–655.
- Cawthon RM. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e47.
- Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY. 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J Fish Biology* 47:775–787.
- Côte J, Morisseau O, Pilisi C, Veysièvre C, Perrault A, Jézéquel C, Laffaille P, Loot G, Blanchet S, Jean S, Jacquin L. Morphological and physiological divergence along gradients of urbanization and eutrophication in fish. *Freshwater Biology* Under revisions.
- Côte J, Pilisi C, Morisseau O, Veysièvre C, Perrault A, Jean S, Blanchet S, Jacquin L. 2019. Water turbidity affects melanin-based coloration in the gudgeon: a reciprocal transplant experiment. *Biological Journal of the Linnean Society* [Internet]. Available from: <https://academic.oup.com/biolinnean/advance-article/doi/10.1093/biolinnean/blz102/5546026>
- Cuevas N, Zorita I, Franco J, Costa PM, Larreta J. 2016. Multi-organ histopathology in gobies for estuarine environmental risk assessment: A case study in the Ibaizabal estuary (SE Bay of Biscay). *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 179:145–154.
- Davis AK, Maney DL, Maerz JC. 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Functional Ecology* 22:760–772.
- De Coen WM, Janssen CR. 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 6:43–55.
- Debes PV, Visse M, Panda B, Ilmonen P, Vasemägi A. 2016. Is telomere length a molecular marker of past thermal stress in wild fish? *Molecular Ecology* 25:5412–5424.
- van Dyk JC, Pieterse GM, van Vuren JHJ. 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66:432–440.
- Elie P, Girard P. 2014. La santé des poissons sauvages : les Codes pathologie, un outil d'évaluation | Pôle-relais lagunes méditerranéennes. Association Santé Poissons Sauvages. Available from: <http://www.pole-lagunes.org/documentation/autres-publications/livres/la-sante-des-poissons-sauvages-les-codes-pathologie-un-outi>

- Ferreira NGC, Morgado R, Santos MJG, Soares AMVM, Loureiro S. 2015. Biomarkers and energy reserves in the isopod <i>Porcellionides pruinosus</i>: The effects of long-term exposure to dimethoate. *Science of The Total Environment* 502:91–102.
- Fourtune L, Paz-Vinas I, Loot G, Prunier JG, Blanchet S. 2016. Lessons from the fish: a multi-species analysis reveals common processes underlying similar species-genetic diversity correlations. *Freshwater Biology* 61:1830–1845.
- Fourtune L, Prunier JG, Mathieu-Begne E, Canto N, Veyssiere C, Loot G, Blanchet S. 2018. Intraspecific genetic and phenotypic diversity: parallel processes and correlated patterns? Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/288357>
- Gandar A. 2015. Réponse aux stress multiples chez les poissons : effets croisés de la température et des cocktails de pesticides. Toulouse 3. Available from: <http://www.theses.fr/2015TOU30310>
- Gandar A, Laffaille P, Canlet C, Tremblay-Franco M, Gautier R, Perrault A, Gress L, Mormède P, Tapie N, Budzinski H, Jean S. 2017a. Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 188:60–72.
- Gandar A, Laffaille P, Marty-Gasset N, Viala D, Molette C, Jean S. 2017b. Proteome response of fish under multiple stress exposure: Effects of pesticide mixtures and temperature increase. *Aquatic Toxicology* 184:61–77.
- Gotanda KM, Delaire LC, Raeymaekers JAM, Pérez-Jvostov F, Dargent F, Bentzen P, Scott ME, Fussmann GF, Hendry AP. 2013. Adding parasites to the guppy-predation story: insights from field surveys. *Oecologia* 172:155–166.
- Goudet J. 1995. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity* 86:485–486.
- Grace JB. 2008. Structural Equation Modeling for Observational Studies. *Journal of Wildlife Management* 72:14–22.
- Grenier R, Costedoat C, Chappaz R, Dubut V. 2013. Two multiplexed sets of 21 and 18 microsatellites for <i>Phoxinus phoxinus</i> (L.) and <i>Gobio gobio</i> (L.) developed by cross-species amplification. *European Journal of Wildlife Research* 59:291–297.
- Hile R, Jobes FW. 1941. Age, Growth, and Production of the Yellow Perch, *Perca Flavescens* (Mitchill), of Saginaw Bay. *Transactions of the American Fisheries Society* 70:102–122.
- Jacquin L, Gandar A, Aguirre-Smith M, Perrault A, Hénaff ML, Jong LD, Paris-Palacios S, Laffaille P, Jean S. 2019a. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172:255–264.
- Jacquin L, Gandar A, Aguirre-Smith M, Perrault A, Hénaff ML, Jong LD, Paris-Palacios S, Laffaille P, Jean S. 2019b. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 172:255–264.
- Jacquin L, Gauthey Z, Roussille V, Le Hénaff M, Tentelier C, Labonne J, Fitzpatrick J. 2017. Melanin in a changing world: brown trout coloration reflects alternative reproductive strategies in variable environments. *Behav Ecol* 28:1423–1434.
- Jacquin L, Petitjean Q, Côte J, Laffaille P, Jean S. 2020. Effects of Pollution on Fish Behavior, Personality, and Cognition: Some Research Perspectives. *Frontiers in Ecology and Evolution* [Internet] 8. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fevo.2020.00086/full>
- Keith P, Persat H, Feunteun E, Allardi J. 2011. Les Poissons d'eau douce de France. France: Biotope. Available from: <http://sciencepress.mnhn.fr/fr/collections/inventaires-biodiversite/les-poissons-d-eau-douce-de-france>
- Kuzmanović M, López-Doval JC, De Castro-Català N, Guasch H, Petrović M, Muñoz I, Ginebreda A, Barceló D. 2016. Ecotoxicological risk assessment of chemical pollution in four Iberian river basins and its relationship with the aquatic macroinvertebrate community status. *Science of The Total Environment* 540:324–333.
- Le Guernic A, Sanchez W, Palluel O, Bado-Nilles A, Floriani M, Turc C, Chadili E, Vedova CD, Cavalié I, Adam-Guillermin C, Porcher J-M, Geffard A, Betoulle S, Gagnaire B. 2016. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25:1478–1499.
- Lefcheck JS. 2016. PIECEWISESEM : Piecewise structural equation modelling in R for ecology, evolution, and systematics. *Methods in Ecology and Evolution* 7:573–579.
- Lind MI, Ingvarsson PK, Johansson H, Hall D, Johansson F. 2011. Gene flow and selection on phenotypic plasticity in an island system of *Rana temporaria*. *Evolution* 65:684–697.

- Loot G, Reyjol Y, Poulet N, Simkova A, Blanchet S, Lek S. 2007. Effects of small weirs on fish parasite communities. *Parasitology Research* 101:1265–1276.
- López SL. 1998. Acquired resistance affects male sexual display and female choice in guppies. *Proc Biol Sci* 265:717–723.
- Makrinos DL, Bowden TJ. 2016. Natural environmental impacts on teleost immune function. *Fish Shellfish Immunol* 53:50–57.
- Marcogliese D, Brambilla L, Gagné F, Gendron A. 2005. Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Diseases of Aquatic Organisms* 63:77–84.
- Martin LB, Han P, Lewittes J, Kuhlman JR, Klasing KC, Wikelski M. 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique. *Functional Ecology* 20:290–299.
- McLennan D, Recknagel H, Elmer KR, Monaghan P. 2019. Distinct telomere differences within a reproductively bimodal common lizard population. *Functional Ecology* 33:1917–1927.
- Molbert N, Alliot F, Santos R, Chevreuil M, Mouchel J-M, Goutte A. 2019. Multiresidue Methods for the Determination of Organic Micropollutants and Their Metabolites in Fish Matrices. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38:1866–1878.
- Monaghan P. 2010. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Ann N Y Acad Sci* 1206:130–142.
- Monaghan P. 2014. Organismal stress, telomeres and life histories. *Journal of Experimental Biology* 217:57–66.
- O’Hara RB. 2005. Bias and Precision in QST Estimates: Problems and Some Solutions. *Genetics* 171:1331–1339.
- Petitjean Q. 2019. Réponses aux stress multiples chez le goujon. Thèse de l’Université Toulouse 3 Paul Sabatier.
- Petitjean Q, Jacquin L, LeHénaff M, Perrault A, Cousseau M, Laffaille P, Jean S. Submitted. Physiological and behavioral costs of immune challenges in a freshwater fish.
- Petitjean Q, Jean S, Côte J, Perrault A, Laffaille P, Jacquin L. Multiple stressors effects on metal bioaccumulation and fish health: a field study in the common gudgeon. *Science of the Total Environment* submitted.
- Petitjean Q, Jean S, Gandar A, Côte J, Laffaille P, Jacquin L. 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Sci Total Environ* 684:371–380.
- Pierce CL, Rasmussen J, Leggett W. 1996. Back-Calculation of Fish Length from Scales: Empirical Comparison of Proportional Methods. *Transactions of the American Fisheries Society*.
- Reid NM, Proestou DA, Clark BW, Warren WC, Colbourne JK, Shaw JR, Karchner SI, Hahn ME, Nacci D, Oleksiak MF, Crawford DL, Whitehead A. 2016. The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish. *Science* 354:1305–1308.
- Rousset F. 2008. genepop’007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103–106.
- Schneegger R, Palt M, Segurado P, Schmutz S. 2016. Untangling the effects of multiple human stressors and their impacts on fish assemblages in European running waters. *Science of The Total Environment* 573:1079–1088.
- Schneegger R, Pucher M, Aschauer C, Schmutz S. 2018. Configuration of multiple human stressors and their impacts on fish assemblages in Alpine river basins of Austria. *Science of The Total Environment* 616–617:17–28.
- Scott ME. 1985. Dynamics of challenge infections of *Gyrodactylus bullataridis* Turnbull (Monogenea) on guppies, *Poecilia reticulata* (Peters). *Journal of Fish Diseases* 8:495–503.
- Segner H, Wenger M, Möller AM, Köllner B, Casanova-Nakayama A. 2011. Immunotoxic effects of environmental toxicants in fish - how to assess them? *Environ Sci Pollut Res Int* 19:2465–2476.
- Simide R, Angelier F, Gaillard S, Stier A. 2016. Age and Heat Stress as Determinants of Telomere Length in a Long-Lived Fish, the Siberian Sturgeon. *Physiological and Biochemical Zoology* 89:441–447.
- Sprague JB. 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Research* 4:3–32.
- Stauffer J, Panda B, Eeva T, Rainio M, Ilmonen P. 2017. Telomere damage and redox status alterations in free-living passerines exposed to metals. *Science of The Total Environment* 575:841–848.
- Tella JL, Lemus JA, Carrete M, Blanco G. 2008. The PHA Test Reflects Acquired T-Cell Mediated Immunocompetence in Birds. *PLoS ONE* 3:e3295.

- Toomey MB, Butler MW, McGraw KJ. 2010. Immune-system activation depletes retinal carotenoids in house finches (*Carpodacus mexicanus*). *Journal of Experimental Biology* 213:1709–1716.
- USEPA. 2008. ECOTOX 4.0 ecotoxicology database [Accessible]. <http://cfpub.epa.gov/ecotox>.
- Van Oosterhout C, Harris PD, Cable J. 2003. Marked variation in parasite resistance between two wild populations of the Trinidadian guppy, *Poecilia reticulata* (Pisces: Poeciliidae). *Biol J Linn Soc* 79:645–651.
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. 2004. micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538.
- Villeger S, Mason NWH, Mouillot D. 2008. New multidimensional functional diversity indices for a multifaceted framework in functional ecology. *Ecology* 89:2290–2301.
- Whitlock MC, Guillaume F. 2009. Testing for Spatially Divergent Selection: Comparing QST to FST. *Genetics* 183:1055–1063.
- Wolf JC, Wheeler JR. 2018. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquatic Toxicology* 197:60–78.
- Zuur AF, Ieno EN, Elphick CS. 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems: Data exploration. *Methods in Ecology and Evolution* 1:3–14.