

Biomarqueurs chez le poisson : un outil d'intérêt pour le contrôle d'enquête

Wilfried Sanchez, Anne Bado-Nilles, Jean-Marc Porcher

► **To cite this version:**

Wilfried Sanchez, Anne Bado-Nilles, Jean-Marc Porcher. Biomarqueurs chez le poisson : un outil d'intérêt pour le contrôle d'enquête. *La Houille Blanche - Revue internationale de l'eau*, EDP Sciences, 2012, pp.49-54. 10.1051/lhb/2012015 . ineris-00961773

HAL Id: ineris-00961773

<https://hal-ineris.archives-ouvertes.fr/ineris-00961773>

Submitted on 20 Mar 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

BIOMARQUEURS CHEZ LE POISSON : UN OUTIL D'INTERET POUR LE CONTROLE D'ENQUETE

Wilfried SANCHEZ⁽¹⁾, Anne BADO-NILLES^(1,2), Jean-Marc PORCHER⁽¹⁾

⁽¹⁾ Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), Unité d'Ecotoxicologie *in vitro* et *in vivo*, BP2, 60550 Verneuil-en-Halatte, France - e-mail: wilfried.sanchez@ineris.fr

⁽²⁾ Université de Reims Champagne-Ardennes, Unité de Recherche Vignes et Vins de Champagne – Stress et Environnement EA 2069, Laboratoire Ecologie-Ecotoxicologie, BP 1039, 51687 Reims Cedex 2, France

Développés et largement utilisés dans les programmes de recherche, les biomarqueurs sont des outils écotoxicologiques permettant d'évaluer l'exposition des organismes aquatiques et les effets associés. Ils sont toutefois peu utilisés pour la surveillance réglementaire de la qualité des milieux aquatiques. Cet article met en lumière les potentialités des biomarqueurs dans le cadre du contrôle d'enquête ou de l'investigation environnementale. Deux études de cas initiées suite à des observations de pêcheurs et portant respectivement sur les effets d'un rejet industriel et sur la diminution des captures de poissons sont analysées. Dans ce contexte, les biomarqueurs mesurés chez le poisson permettent de déterminer les mécanismes d'action des polluants susceptibles d'être à l'origine des effets observés. Des travaux complémentaires restent nécessaires pour établir de manière formelle des relations entre les effets précoces et les effets individuels et populationnels, permettant ainsi d'utiliser les biomarqueurs comme des signaux d'alerte.

MOTS CLEFS : écotoxicologie, biosurveillance, milieux aquatiques

Fish biomarkers as a powerful tool for investigative monitoring

Widely used in research activities, biomarkers are effect-based monitoring tools that allow assessing exposure of aquatic organisms and associated effects. However, they are weakly used in regulatory environmental monitoring programmes. The present manuscript highlights the potential of fish biomarkers for control monitoring or environmental investigation. Two cases studies based on angler observations were presented and discussed. The first one reports adverse effects of an industrial effluent in wild gudgeons and the second one describes the decrease of grayling catches. In this context, fish biomarkers allow to determine mechanisms of action of chemicals able to induce observed adverse effects. Complementary works are needed to determine relationship between biochemical responses and individual or populational effects and to define biomarkers as a predictive signal.

KEY WORDS : ecotoxicology, biomonitoring, freshwater ecosystems

I INTRODUCTION

L'introduction dans l'environnement de nombreux polluants issus des activités humaines et susceptibles de perturber différents processus physiologiques chez les organismes aquatiques, a contribué à la dégradation de la qualité chimique et écologique des milieux aquatiques. Afin d'enrayer ce phénomène, la Directive européenne Cadre sur l'Eau (DCE, directive 2000/60/EC) affiche comme principal objectif d'atteindre le bon état des masses d'eau. Aussi, différents programmes de surveillance des milieux étaient mis en place incluant le contrôle d'enquête. Ce dernier doit permettre de déterminer les causes de non-atteinte du bon état des masses d'eau dites à risques suite à un processus de surveillance incluant la mise en œuvre de mesures correctives. Si par définition le contrôle d'enquête est intimement lié à la DCE, cette notion peut être étendue aux études mises en œuvre afin d'identifier les causes d'un contentieux environnemental (impact d'une installation ou d'un rejet, déclin de populations piscicoles...). En raison de la multiplicité des molécules susceptibles d'être impliquées et des interactions possibles avec d'autres facteurs environnementaux physiques ou biologiques, les techniques d'analyses chimiques classiquement utilisées pour la surveillance des milieux et qui permettent de quantifier dans différentes matrices une sélection *a priori* de molécules semblent atteindre leur limites. De même, les méthodes biocénotiques ne permettent pas d'identifier les

causes à l'origine des perturbations éventuellement détectées. Aussi, le recours à des outils permettant de renseigner sur les effets des stress environnementaux au niveau individuel tels que les biomarqueurs, apparaît comme une approche féconde susceptible d'apporter des éléments de réponse quant aux origines des détériorations environnementales.

L'objectif de cet article est de mettre en avant, au travers de deux études de cas, les potentialités de ces outils écotoxicologiques dans un contexte de contrôle d'enquête mais également d'identifier les limites à leur utilisation et de dégager des perspectives tant cognitives qu'opérationnelles afin de permettre leur intégration dans la réglementation environnementale.

II BIOMARQUEURS : DEFINITION, AVANTAGES ET LIMITES

Un biomarqueur est défini comme une variation biochimique, cellulaire, physiologique ou comportementale qui peut être mesurée dans un tissu, un fluide biologique ou au niveau d'un organisme entier et qui apporte la preuve d'une exposition et/ou de l'effet d'un ou plusieurs polluants chimiques biologiques ou encore des radiations [Depledge, 1993]. Toutefois, du fait de la diversité des contaminants environnementaux, de la multiplicité de leurs effets et des nombreuses interactions entre eux, le diagnostic environnemental doit s'appuyer sur la mise en œuvre d'approches multi-biomarqueurs basées sur l'association de paramètres complémentaires en terme de substances prises en compte, d'effets mesurés et de niveau d'intégration biologique [Minier et al., 2000 ; Sanchez, Porcher, 2009].

De telles approches présentent l'avantage d'intégrer dans le temps et, selon les espèces modèles sélectionnées, dans l'espace, les expositions et/ou les effets des polluants environnementaux biodisponibles. Les approches multi-biomarqueurs restituent alors, à un instant donné, une image intégrative des variations qualitatives et quantitatives de la contamination intégrant les facteurs environnementaux, toxicologiques et écologiques [Depledge, 1993]. Cet important pouvoir intégrateur des biomarqueurs réduit toutefois grandement les possibilités d'utilisation de ces outils comme sondes chimiques, leurs capacités d'identification se limitant généralement à un ensemble de familles chimiques.

Les biomarqueurs, et à plus forte raison les approches multi-biomarqueurs, trouvent donc leur sens dans la description des effets toxicologiques. De plus, de récents travaux tendent à mettre en avant le caractère prédictif de ces outils. Par exemple, des travaux rapportent, suite à l'exposition de truites à un génotoxique modèle, une relation entre le niveau d'endommagement de l'ADN des spermatozoïdes et des perturbations de la descendance se traduisant par une augmentation des anomalies embryo-larvaires et de la mortalité [Devaux et al., 2011]. Un tel résultat met alors en lumière la pertinence écologique de la mesure de l'endommagement de l'ADN dans les cellules germinales. Des indications similaires sont disponibles pour d'autres biomarqueurs comme l'induction de la vitellogénine, un marqueur reconnu des effets oestrogéniques [Kidd et al., 2007], ou les marqueurs du stress oxydant pour lesquels le lien avec des phénomènes de mortalité des espèces aquatiques est désormais établi [Uchimura et al., 2003]. Peu des outils à la disposition des écotoxicologues peuvent toutefois être considérés comme prédictifs d'effets populationnels, limitant alors la portée du résultat à la description d'un effet biologique réel mais aux conséquences incertaines sur le long terme.

Les biomarqueurs sont largement utilisés dans les programmes de recherche en écotoxicologie visant à déterminer le potentiel toxique des substances chimiques ou à statuer sur l'impact de la contamination des milieux sur les organismes qui y vivent. Leur utilisation reste beaucoup plus sporadique dans les programmes réglementaires de surveillance des milieux aquatiques. En milieu marin, les travaux d'OSPAR en Atlantique Nord et ceux du Programme pour l'Environnement des Nations Unies en Méditerranée (MEDPOL) s'appuient sur l'utilisation d'un ensemble de biomarqueurs pour déterminer la qualité de ces différentes zones géographiques. En milieu continental, le réseau américain BEST-LRMN (Biomonitoring of Environmental Status and Trends – Large Rivers Monitoring Network) apparaît comme l'unique réseau national qui utilise les biomarqueurs pour évaluer la contamination de l'environnement par des contaminants persistants et pour détecter des changements à de faibles niveaux d'organisation biologique avant que des effets populationnels soient visibles [Bauch et al., 2005]. Ce réseau qui a pour objectif d'évaluer, dans différents bassins versants (Mississippi, Rio Grande, Yukon,...), les effets des contaminants environnementaux sur les poissons, s'appuie sur un ensemble de marqueurs mesurés au niveau de l'organisme ou à des niveaux d'organisation inférieurs [Hinck et al., 2006 ; Hinck et al., 2007] sur différentes espèces de poissons autochtones échantillonnées sur environ 150 stations.

Différents auteurs mettent donc en avant le potentiel des biomarqueurs pour la surveillance des milieux aquatiques continentaux et préconisent l'utilisation de ces outils dans les programmes réglementaires de suivi

de l'environnement, notamment les programmes définis par la DCE. Le déploiement à large échelle des biomarqueurs se heurte toutefois aux problèmes liés à l'analyse des données et plus particulièrement à la définition de valeurs de référence [Sanchez, Porcher, 2010]. En effet, les nombreuses interactions entre le poisson, son statut physiologique et son environnement rendent la définition de valeurs de référence absolues particulièrement complexe. Aussi, sous réserve de travailler avec des espèces sédentaires ou sur des sites physiquement séparés, la comparaison amont/aval apparaît comme une alternative intéressante pour mettre en œuvre les biomarqueurs [Sanchez et al., 2008].

III UTILISATION DES BIOMARQUEURS POUR LE CONTROLE D'ENQUETE

III.1 Anomalies morphologiques en aval d'un rejet

En 2008, des pêcheurs rapportaient la présence de goujons (*Gobio gobio*) présentant un gonflement de l'abdomen associé à une hypertrophie des gonades dans une zone soumise à des rejets d'origine urbaine (deux stations d'épuration de 8100 et 1800 EH) et recevant également les effluents d'une industrie. Afin de déterminer les causes de ces anomalies morphologiques, des prélèvements de goujons ont été réalisés par pêche électrique au cours de l'automne 2008 et 2009 sur 3 sites dont 2 sont situés en aval des effluents urbains et industriel (Figure 1). En raison de la possible implication de polluants perturbateurs endocriniens dans les effets observés, des paramètres liés à la fonction de reproduction ont été mesurés sur chaque poisson :

- i) La vitellogénine (VTG) qui est une protéine oestrogéno-réglée naturellement présente chez les poissons femelles et induite chez les mâles et les juvéniles exposés à des oestrogènes [Sumpter, Jobling, 1995] a été mesurée dans le sang des poissons afin de caractériser une éventuelle exposition à des contaminants œstrogéniques.
- ii) Une analyse histologique du tissu gonadique a été réalisée afin de confirmer le sexe des poissons et de mettre en évidence des perturbations du tissu reproducteur. Le premier type de perturbation examiné est la présence d'intersexe c'est-à-dire de cellules femelles dans des gonades mâles ou inversement. D'autres anomalies comme les fibroses ou les nécroses sont également recherchées.
- iii) L'indice gonado-somatique qui traduit la proportion de gonade dans le poisson a également été calculé afin de mettre en évidence une atteinte au niveau de l'organe reproducteur.

Les goujons échantillonnés en aval des rejets se caractérisent par une induction significative de la VTG (Tableau 1) et une importante intersexualité gonadique (Figure 2) par rapport aux poissons provenant du site amont. Ce résultat confirme l'implication de polluants perturbateurs endocriniens dans les effets observés. De plus, l'analyse du sex-ratio des populations de goujons rencontrées sur les sites d'étude montre un déséquilibre de ce paramètre avec, sur les sites en aval des rejets, une diminution du nombre de goujons femelles au profit des individus intersexués (Figure 3). Ce profil de réponse apparaît comme atypique. En effet, peu d'études scientifiques décrivent la masculinisation des populations sauvages alors que la féminisation est plus couramment observée notamment en aval des stations d'épuration urbaines. Les réponses observées semblent toutefois cohérentes avec la nature du rejet industriel provenant d'une installation impliquée dans la production de substances hormonales telles que la dexaméthasone et la spironolactone [Sanchez et al., 2011] dont les effets masculinisant sont décrits au travers d'études réalisées en laboratoire [Howell et al., 1994 ; Hattori et al., 2009].

Dans cette étude, la mise en œuvre d'une batterie de biomarqueurs a permis de mettre en évidence l'existence d'un phénomène de perturbation endocrinienne chez les poissons échantillonnés en aval de rejets urbains mais aussi industriel. Afin d'évaluer une éventuelle conséquence de ces perturbations de la fonction de reproduction au niveau du peuplement piscicole, une étude populationnelle a été réalisée en parallèle sur les 3 sites étudiés. Les résultats obtenus mettaient alors en évidence une diminution significative de la densité de poissons entre l'amont et l'aval de la zone d'étude, cette dernière passant de 301 à 74 individus pour 938 m² [Sanchez et al., 2011]. Ces travaux ne permettent pas d'identifier formellement les molécules impliquées dans les effets observés. Aussi, des études complémentaires sont en cours afin de caractériser la contamination chimique du milieu et d'établir un lien entre cette contamination et les effets biologiques rapportés dans le cours d'eau.

III.2 Déclin d'une population de poissons

Depuis 2008, les pêcheurs du Haut-Allier observent une diminution des captures d'Ombre commun (*Thymalus thymalus*). Afin de comprendre l'origine de ce phénomène, des études portant sur l'altération hydro-morphologique du milieu ou encore la dégradation des frayères ont été initiées. Les résultats négatifs de ces travaux ont amené les acteurs locaux à envisager une perturbation en lien avec la présence de micro-polluants dans le milieu. Pour vérifier cette hypothèse, une étude a été mise en œuvre sur deux espèces de poissons présentes sur la zone d'étude : la truite fario (*Salmo trutta*) et le goujon. L'objectif de ce travail est d'évaluer trois mécanismes d'action des polluants environnementaux pouvant expliquer la diminution des captures d'ombre commun :

- i) Des perturbations de la reproduction des poissons pourraient affecter le peuplement piscicole. Plusieurs travaux menés chez le poisson mettent en évidence un lien entre l'exposition à des perturbateurs endocriniens, des perturbations biochimiques, histologiques ou physiologiques de la reproduction et des atteintes au niveau des populations [Kidd et al., 2007]. Afin d'évaluer cette hypothèse, la VTG a été mesurée chez les poissons échantillonnés et une analyse histologique similaire à celle décrite dans l'exemple précédent a été réalisée.
- ii) Des effets neurotoxiques pourraient perturber le comportement des poissons et affecter les populations. De nombreux polluants environnementaux sont en effet connus pour leur capacité à inhiber l'AChE, perturbant ainsi la transmission de l'influx nerveux. Une exposition à ces molécules peut également induire des perturbations du comportement de fuite, de la nage ou du comportement alimentaire des poissons susceptibles d'entraîner la mort de l'organisme et à terme des perturbations populationnelles [Garcia de la Parra et al., 2006 ; Vieira et al., 2009].
- iii) Une immunosuppression pourrait accroître la sensibilité des individus aux maladies et perturber les populations de poissons. L'immunité est une fonction centrale chez le poisson visant à protéger ce dernier des agressions par les pathogènes. Toutefois, de nombreux contaminants sont connus pour diminuer les capacités de défense des organismes, augmentant ainsi leur susceptibilité aux maladies. De tels effets au niveau individuel pourraient avoir des conséquences au niveau du peuplement piscicole [Bols et al., 2001]. Afin de tester cette hypothèse, la distribution leucocytaire et la viabilité cellulaire sont mesurées. De même, l'activité de phagocytose et la flambée oxydative basale qui sont deux paramètres impliqués dans la neutralisation et l'élimination des pathogènes sont étudiés.

Pour cette étude, des poissons adultes des deux espèces retenues (truite fario et goujon) ont été échantillonnés par pêche électrique sur deux sites situés en amont et en aval de la zone sur laquelle la diminution des captures a été observée. Les résultats obtenus montrent, sur chaque station, des concentrations en VTG faibles (de l'ordre de la centaine de ng/mL de plasma) chez les deux espèces. Associé à l'absence d'anomalie histologique au niveau du tissu gonadique, ce résultat invalide l'hypothèse basée sur l'exposition des poissons à perturbateurs endocriniens œstrogéniques. Inversement, les profils de réponse de l'activité AChE et des paramètres immunitaires montrent un effet entre les zones amont et aval de l'étude (Tableau 2). En aval, les poissons présentent une inhibition de l'AChE de 31 et 27% respectivement chez la truite et le goujon, un résultat qui tend à signer l'exposition des poissons à des composés neurotoxiques. Des travaux de laboratoire montrent que des taux d'inhibition de l'AChE similaires peuvent induire des perturbations comportementales [Vieira et al., 2009]. Cependant, aucune donnée ne permet de transposer cette relation *in situ* et donc de statuer sur le réel caractère prédictif de l'AChE. Concernant les paramètres immunitaires, les truites et les goujons échantillonnés en aval de la zone d'étude se caractérisent par une augmentation de la mortalité cellulaire associée à une déstabilisation leucocytaire marquée par la réduction du pool de granulocytes/macrophages. Si ce phénomène tend à être compensé par une augmentation de l'activité de phagocytose (environ 8%), les capacités de dégradation des corps étrangers restent amoindries du fait de la diminution de la flambée oxydative basale. Les poissons vivant en aval du secteur étudié apparaissent donc comme immunodéprimés. Ces résultats sont en accord avec les données disponibles dans la littérature scientifique montrant l'impact de la contamination chimique du milieu sur la réponse immunitaire [Holladay et al., 1998 ; Sarmiento et al., 2004]. Toutefois, seule la conjonction avec une pathologie pourrait expliquer un déclin des populations. Aussi, une analyse anatomo-pathologique a été mise en œuvre sur les poissons échantillonnés. Cette dernière révèle, chez le goujon, une contamination par le ver monogène *Gyrodactylus sp.* et par un protozoaire cilié *Trichodina sp.*. La faible abondance de ces deux parasites semble toutefois insuffisante pour expliquer un déclin des populations piscicoles.

Cette étude, réalisée dans un contexte de déclin piscicole, permet d'émettre des hypothèses relatives au lien entre les effets des micro-polluants chez le poisson et les altérations populationnelles. Toutefois, le manque

de connaissances sur le lien entre les effets précoces des contaminants mesurés au niveau biochimique ou histologique et la santé des peuplements piscicoles ne permet pas de statuer sur les causes absolues du déclin observé. Si les effets neurotoxiques et immunotoxiques pourraient être impliqués, ces hypothèses doivent encore être étayées par une approche plus approfondie de l'infestation parasitaire des poissons mais également par l'intégration de paramètres en lien avec le statut nutritionnel des individus.

IV CONCLUSIONS

Largement utilisés dans les programmes de recherche, les biomarqueurs mesurés chez le poisson apparaissent comme des outils à fort potentiel pour la surveillance des milieux aquatiques et tout particulièrement dans le cadre du contrôle d'enquête. Comme cela est mis en avant dans les deux études de cas présentées ici, la mesure de réponses biologiques au niveau biochimique, histologique ou physiologique permet d'appréhender les mécanismes susceptibles d'être à l'origine de perturbations individuelles ou populationnelles. Ces outils s'avèrent donc être parfaitement complémentaires des analyses chimiques et biocénotiques classiquement mises en œuvre pour la surveillance des masses d'eau en apportant une information relative aux effets des stress environnementaux sur les poissons. Toutefois, en raison de la diversité des mécanismes susceptibles d'expliquer les perturbations environnementales à la base des investigations, les biomarqueurs ne doivent pas être utilisés seuls. Leur intégration dans des études pluri-disciplinaires intégrant en plus des mesures de biomarqueurs, des analyses chimiques, biocénotiques mais aussi des mesures portant sur la qualité hydro-morphologique du milieu ou encore sur la contamination biologique s'avère alors être importante pour garantir le succès de la démarche.

La mesure des biomarqueurs dans le cadre du contrôle d'enquête permet de s'affranchir, au moins partiellement, des problèmes liés à la diversité des espèces. En effet, la comparaison inter-sites au sein d'un réseau de surveillance est rendu délicate du fait de la variation géographique des peuplements piscicoles. *A contrario*, la faible étendue des zones étudiées pour le contrôle d'enquête permet de s'affranchir de cette variabilité et dans la majorité des cas, des variations amont/aval liées à l'hydro-morphologie des cours d'eau [Huet, 1949]. D'autres écueils peuvent toutefois limiter la mise en œuvre des biomarqueurs avec i) la disparition d'espèces d'intérêt en raison de la contamination du milieu et ii) l'absence d'espèces connues d'un point de vue écotoxicologique sur la zone d'étude. L'engagement de poissons provenant soit de la zone amont soit d'un élevage apparaît alors comme une alternative pertinente pour évaluer les causes éventuelles d'une détérioration de l'environnement.

Si l'utilisation d'un ensemble cohérent de biomarqueurs permet de déterminer des mécanismes d'action susceptibles d'être à l'origine des effets observés, le manque de spécificité des biomarqueurs empêche l'identification formelle de polluants ou de familles de polluants pouvant expliquer les effets mesurés. Cette identification demeure pourtant un élément nécessaire à la mise en place de mesures correctives. Pour combler cette lacune, des méthodologies d'identification des polluants associant analyses chimiques et tests biologiques ont été développées et permettent de relier une activité biologique à une ou plusieurs molécules [Dévier et al., 2011]. Cette méthodologie apparaît alors comme complémentaire à la mesure des biomarqueurs dans un contexte de contrôle d'enquête.

Enfin, si les biomarqueurs peuvent apporter une information mécanistique importante, leur capacité à prédire des effets individuels et populationnels reste limitée. L'interprétation des données acquises se réduit alors en la définition d'hypothèse dont la validation repose sur une accumulation de preuves indirectes. Aussi, il semble important de réaliser des études visant à mettre en évidence et à caractériser les relations pouvant exister entre la réponse précoce des organismes et des effets intégrés mesurés à des niveaux supérieurs d'organisation biologique.

V REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié du soutien financier du Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable, des Transports et du Logement (MEDDTL ; Programme 181-DRC43 & Programme 190 post-grenelle DEVIL) et de l'Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques (ONEMA ; Action INERIS/ONEMA 11-32).

Les auteurs remercient également Camille Fossier pour son aide dans la mise en forme du manuscrit.

VI REFERENCES ET CITATIONS

- Bauch N.J., Schmitt C.J., Crawford C.G. (2005). - Development of an approach for integrating components of the US Geological Survey Biomonitoring of Environmental Status and Trends (BEST) and National Stream Quality Accounting Network (NASQAN) programs for a large US rivers. US Geological Survey, Columbia. 53 p.
- Bols N.C., Brubacher J.L., Ganassin R.C., Lee L.E.J. (2001). - Ecotoxicology and innate immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol*, **25(8-9)**: 853-873.
- Depledge M.H. (1993). - *Nondestructive biomarkers in vertebrates*. Lewis Publisher, Boca Raton: 261-285.
- Devaux A., Fiat L., Gillet C., Bony S. (2011). - Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquat. Toxicol*, **101**: 405-411.
- Dévier M.H., Mazellier P., Aït-Aïssa S., Budzinski H. (2011). - New challenge in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures. *CR Chim*, **14(7-8)**:766-779.
- Garcia de la Parra L.M., Bautista-Covarrubias J.C., Rivera de la Rosa N., Betancourt-Lozano M., Guilhermino L. (2006). - Effects of methamidophos on acetylcholinesterase activity, behavior, and feeding rate of the white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Ecotoxicol. Environ. Saf*, **65(3)**: 372-380.
- Hattori R.S., Fernandino J.I., Kishii A., Kimura H., Kinno T., Oura M., Somoza G.M., Yokota M., Strüssmann C.A., Watanabe, S. (2009). - Cortisol-Induced Masculinization: Does thermal stress affect gonadal fate in Pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLOS one*, **4(6)**: e6548. doi: 10.1371/journal.pone.0006548.
- Hinck J.E., Blazer V.S., Denslow N.D., Echols K.R., Gross T.S., May T.W., Anderson P.J., Coyle J.J., Tillitt D.E. (2007). - Chemical contaminants, health indicators, and reproductive biomarker responses in fish from the Colorado River and its tributaries. *Sci. Total Environ*, **378(3)**: 376-402.
- Hinck J.E., Schmitt C.J., Blazer V.S., Denslow N.D., Bartish T.M., Anderson P.J., Coyle J.J., Dethloff G.M., Tillitt D.E. (2006). - Environmental contaminants and biomarker responses in fish from the Columbia River and its tributaries: Spatial and temporal trends. *Science of the Total Environment*, **366(2-3)**: 549-578.
- Holladay S.D., Smith S.A., Besteman E.G., Deyab A.S.M.I., Gogal R.M., Hrubec T., Robertson J. L., Ahmed S.A. (1998). - Benzo[a]pyrene-induced hypocellularity of the pronephros in tilapia (*Oreochromis niloticus*) is accompanied by alterations in stromal and parenchymal cells and by enhanced immune cell apoptosis. *Vet. Immunol. Immunop*, **64(1)**: 69-82.
- Howell W.L., Hunsinger R.N., Blanchard, P.D. (1994). - Paradoxical masculinization of female Western Mosquitofish during exposure to spironolactone. *Progressive Fish-Culturist*, **56(1)**: 51-55.
- Huet M. (1949). - Aperçu des relations entre la pente et les populations piscicoles des eaux courantes. *Schweizerische Zeitschrift für Hydrologie*, **11**: 332-351.
- Kidd K.A., Blanchfield P.J., Mills K.H., Palace V.P., Evans R.E., Lazorchak J.M., Flick R.W. (2007). - Collapse of fish population after exposure to a synthetic estrogen. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, **104(21)**: 8897-8901.
- Minier C., Levy F., Rabel D., Bocquene G., Godefroy D., Burgeot T., Leboulenger F. (2000). - Flounder health status in the Seine bay. A multibiomarker study. *Mar. Environ. Res*, **50(1-5)**: 373-377.
- Sanchez W., Piccini B., Maillot-Maréchal E., Porcher J.M. (2010). - Comparison of two reference systems for biomarker data analysis in a freshwater biomonitoring context. *Environ. Int*, **36(4)**: 377-382.

- Sanchez W., Porcher J.M. (2009). - Fish biomarkers for environmental monitoring within the Water Framework Directive of the European Union. *TRAC-Trend Anal. Chem*, **28(2)**: 150-158.
- Sanchez W., Sremski W., Piccini B., Palluel O., Maillot-Maréchal E., Betoulle S., Jaffal A., Aït-Aïssa S., Thybaud E., Brion F., Hinfrey N., Porcher, J.M. (2011). - Adverse effects in wild fish living downstream from pharmaceutical manufacture discharges. *Environ. Int*, **37(8)**: 1342-1348.
- Sarmiento A., Guilhermino L., Afonso A. (2004). - Mercury chloride effects on the function and cellular integrity of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) head kidney macrophages. *Fish Shellfish Immun*, **17(5)**: 489-498.
- Sumpter J.P., Jobling S. (1995). - Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment. *Environ. Health Persp*, **103(S7)**:173-178.
- Uchimura Y., Yamashita H., Kuramoto M., Ishihara K., Sugimoto M., Nakajima N. (2003). - Damage to cultivated Japanese pearl oysters by oxidative stress that was related to “mass mortality”. *Biosci. Biotech. Bioch*, **67(11)**: 2470-2473.
- Vieira L.R., Gravato C., Soares A.M.V.M., Morgado F., Guilhermino L. (2009). - Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Linking biomarkers to behaviour. *Chemosphere*, **76(10)**: 1416-1427.



Figure 1 : Représentation schématique de la zone d'étude. Les flèches localisent les rejets des stations d'épuration des eaux usées urbaines (STEP) et de la station d'épuration des eaux industrielles (Industrie). Les deux points sur le cours d'eau indiquent la position des stations d'échantillonnage par rapport aux différents rejets.

Tableau 1 : Etude de cas 1 - Réponse des biomarqueurs mesurés chez les goujons (*Gobio gobio*). Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type sauf pour la vitellogénine où elles sont reportées sous la forme de moyenne géométrique \pm intervalle de confiance. Le nombre de poissons utilisé pour la mesure des biomarqueurs sur chaque site est présenté. Les valeurs annotées avec des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

	Année	Nombre de poissons (amont/aval)	Amont	Aval
Vitellogénine (ng/mL)	2008	5/9	242 (86-682) ^a	7756 (747-1660) ^b
	2009	10/17	390 (264-817) ^a	11998 (3521-4983) ^b
EROD (pmol/min/mg)	2008	12/10	41.0 \pm 35.2 ^a	41.1 \pm 38.0 ^a
	2009	20/20	32,5 \pm 18,6 ^a	29,6 \pm 19,3 ^a
CYP3A (pmol/h/mg)	2008	12/10	2.9 \pm 1.5 ^a	2.1 \pm 1.7 ^a
	2009	20/20	2,4 \pm 1,8 ^a	3,6 \pm 2,2 ^a
GST (U/g)	2008	12/10	4114 \pm 927 ^a	3865 \pm 645 ^a
	2009	20/20	3836 \pm 755 ^a	4627 \pm 937 ^a
AChE (U/mg prot.)	2008	12/10	137 \pm 20 ^a	141 \pm 36 ^a
	2009	20/20	118 \pm 16 ^a	134 \pm 22 ^a

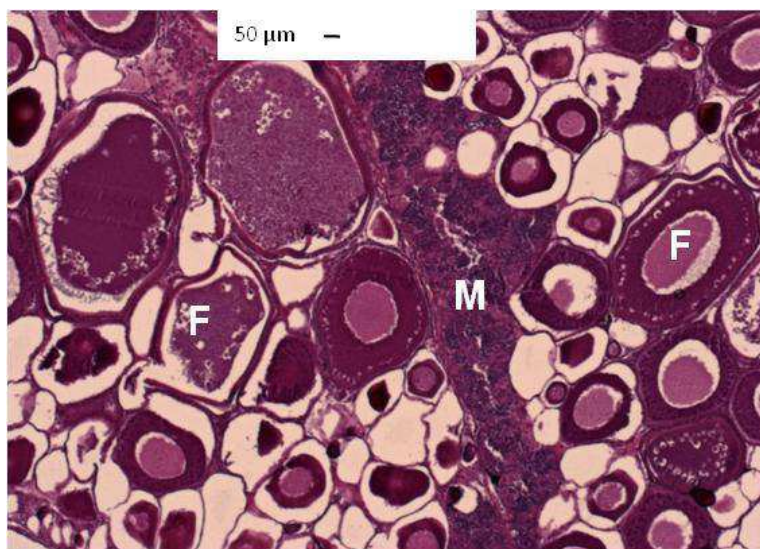


Figure 2 : Etude de cas 1 - Coupe histologique d'une gonade de goujon (*Gobio gobio*) échantillonné en aval de la zone d'étude et présentant un phénomène d'intersexualité sévère. M indique le tissu testiculaire (mâle) et F indique le tissu ovocytaire (femelle).

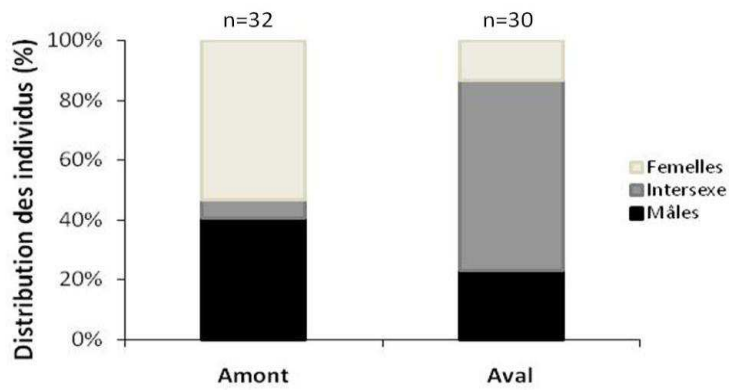


Figure 3 : Etude de cas 1 - Analyse du sexe-ratio de la population de goujon (*Gobio gobio*) échantillonnés en 2008 et 2009. Les effectifs représentent le nombre de poissons analysés au cours de deux années.

Tableau 2 : Etude de cas 2 - Réponse des biomarqueurs mesurés chez les goujons (*Gobio gobio*). Les données sont présentées sous la forme moyenne \pm écart-type sauf pour la vitellogénine où elles sont reportées sous la forme de moyenne géométrique \pm intervalle de confiance. Le nombre de poissons utilisé pour la mesure des biomarqueurs sur chaque site est présenté. Les valeurs annotées avec des lettres différentes sont statistiquement différentes ($p < 0,05$).

	Espèce	Nombre de poissons (amont/aval)	Amont	Aval
Vitellogénine (ng/mL)	Truite	10/6	482 (128-913)	396 (67-735)
	Goujon	2/11	-	351 (96-684)
AChE (U/mg prot.)	Truite	20/12	156 \pm 24 ^a	108 \pm 13 ^b
	Goujon	12/16	104 \pm 16 ^a	76 \pm 10 ^b
Lymphocytes (%)	Truite	19/12	70 \pm 7 ^a	64 \pm 6 ^b
	Goujon	11/14	91 \pm 1 ^a	78 \pm 4 ^b
Granulocyte/Macrophage (%)	Truite	19/12	30 \pm 7 ^a	36 \pm 6 ^b
	Goujon	11/14	9 \pm 1 ^a	22 \pm 4 ^b