

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE - EAU TERRE ENVIRONNEMENT

**IMPACTS CUMULATIFS DES CONTAMINANTS ET DES FACTEURS
BIOLOGIQUES SUR LES RÉPONSES DE BIOMARQUEURS
MOLÉCULAIRES ET HISTOPATHOLOGIQUES CHEZ L'ANGUILLE
ATLANTIQUE**

Par
Géraldine PATEY
M.Sc. Ecotoxicologie

Thèse présentée pour l'obtention du grade
Philosophiae Doctor (Ph. D.) en science de l'eau

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Daniel Cyr INRS – Institut Armand Frappier
Examinatrice externe	Nadia Aubin-Horth Université Laval
Examineur externe	Jean Laroche Université de Brest
Co-directrice de recherche	Catherine Couillard MPO – Pêche et Océans Canada
Directeur de recherche	Patrice Couture INRS Centre - Eau, Terre et Environnement

Septembre, 2017

" En vérité, le chemin importe peu, la volonté d'arriver suffit à tout. "
Albert Camus

RÉSUMÉ

Historiquement abondante et répandue en Europe et en Amérique du Nord, l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et l'anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*) sont des espèces en déclin ayant des cycles de vie semblables. Les explications possibles de ce déclin incluent les changements climatiques, la surpêche, la dégradation de l'habitat, le parasitisme et la contamination. Confrontée à un mélange de contaminants et à des facteurs de stress environnementaux de plus en plus nombreux, l'anguille subit un stress pouvant provoquer l'apparition de dommages cellulaires, l'apparition de lésions histopathologiques et affecter sa croissance, sa reproduction ou sa survie. De plus, les gradients écologiques tels que la localisation géographique, la distance de la zone de frai et les conditions physicochimiques de l'habitat de croissance affectent directement ou indirectement le taux de croissance et la taille de l'anguille, ce qui pourrait affecter également l'absorption, la distribution, le métabolisme et le taux d'accumulation des contaminants. Cette étude spatiale (huit sites et deux pays) et comparative (deux espèces d'anguille) a pour objectif de déterminer l'impact d'un mélange complexe de contaminants (organiques et métalliques) sur l'état de santé de l'anguille européenne et américaine au stade jaune en tenant compte des facteurs environnementaux et biologiques. À cette fin, une batterie de biomarqueurs associée aux enzymes de biotransformation, aux capacités antioxydantes et aux lésions histopathologiques a été utilisée. L'activité de l'enzyme éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) et les activités antioxydantes de la catalase (CAT) et de la superoxyde dismutase (SOD) ont été mesurées dans le foie. Les mesures de la densité et de la surface des centres mélanomacrophages (CMM) ainsi que les dépôts pigmentaires d'hémossidérine et de lipofuscine ont été déterminés dans la rate des anguilles. À l'été 2011 et 2012, les anguilles jaunes (stade de croissance) ont été recueillies à deux sites de référence et deux sites contaminés le long du Système du Saint-Laurent (SSL) et du Système de la Gironde (SG). Les concentrations tissulaires des contaminants organiques et inorganiques ont été mesurées dans les anguilles. Notre étude a démontré que les anguilles américaines originaires des sites en amont du SSL présentaient des croissances significativement plus rapides que celles originaires des sites en aval contrairement aux anguilles européennes originaires de l'amont du SG qui avaient des croissances plus lentes que celles situées en aval. Ce résultat remet en question le paradigme courant concernant le patron de variabilité spatiale des taux de croissance chez *A. rostrata*. Par la suite, des relations entre

les variables biologiques, les contaminants et les biomarqueurs ont été mises en évidence et interprétées à l'aide d'analyses en composantes principales (ACP). Chez l'anguille américaine, aucune influence majeure des contaminants organiques persistants sur l'activité hépatique d'EROD, les enzymes antioxydantes et les biomarqueurs histopathologiques n'a été identifiée dans les anguilles échantillonnées dans les sites contaminés et de référence. Chez l'anguille européenne, des relations entre la contamination organique (PCB, PBDE et DDT et métabolites) et les niveaux d'activité de la CAT et entre la contamination métallique (mercure et cadmium) et la densité des CMM ont été mis en évidence chez les anguilles des sites contaminés. D'autres associations entre biomarqueurs, facteurs biologiques et environnementaux ont également été discutées. Chez les deux espèces, des teneurs élevées d'hémosidérine dans les CMM de la rate ont été mesurés chez les anguilles des sites d'eau saumâtre par rapport aux anguilles originaires des sites d'eau douce. Les résultats ont montré une association possible entre les teneurs élevées d'hémosidérine et la contamination métallique (l'arsenic pour *A. anguilla* et le plomb pour *A. rostrata*). À travers ces résultats, les anguilles européennes originaires du SG semblent plus affectées par les contaminants que leurs cousines américaines du SSL. Les liens entre concentrations tissulaires de PCB ou de cadmium et biomarqueurs (EROD et CMM) ont aussi été documentés chez des anguilles de Certes exposées en laboratoire à chaque contaminant individuellement et présentant des conditions nutritionnelles variées. Les anguilles ont été soumises à différentes conditions environnementales (salinité et sous-alimentation) et à différentes concentrations de contaminants. Les résultats ont mis en évidence une relation dose réponse significative de l'activité d'EROD mesurée dans les anguilles exposées aux PCB les plus toxiques présents dans la solution de pyralène. Aucun effet du Cd n'a été détecté sur l'activité d'EROD ou sur la densité des CMM. Enfin, l'augmentation de la surface des CMM semble être associée à un dépôt d'hémosidérine dans les CMM ainsi qu'à des concentrations élevées de cadmium dans le foie. Ces travaux de thèse fournissent une base de données pour mieux cibler et prioriser les futures études sur les impacts des contaminants sur la santé de l'anguille dans les bassins de la Gironde et du fleuve Saint-Laurent.

ABSTRACT

Historically abundant and widespread in Europe and North America, the European eel (*Anguilla anguilla*) and the American eel (*Anguilla rostrata*) are declining species with similar life cycles. Possible explanations for this decline include climate change, overfishing, habitat degradation, parasitism and contamination.

The presence of complex mixtures of contaminants combined with other potentially confounding factors (i.e. natural factors) are known to cause cell damage, histopathological lesions and could affect eel growth, its reproduction or survival. Moreover, ecological gradients such as latitudinal cline, distances from the spawning site, and physicochemical conditions (for example, salinity and temperature) of eel's growth habitat could directly or indirectly affect eel's growth rate and could also influence the absorption, distribution, metabolism and accumulation of contaminants. The present field study was conducted on Atlantic eels in eight sites varying in organic and metal contamination along the Saint Lawrence and the Gironde systems, respectively. The aim of the study was to investigate the impact of contaminants on the health status of Atlantic yellow eels, taking into account environmental and biological factors related to the sampling. To the end, a battery of biomarkers was used: liver ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity, antioxidant enzymes (catalase and superoxide dismutase) and spleen histopathological biomarkers (density and surface of MelanoMacrophage Centers (MMCs), hemosiderin and lipofuscin pigments). EROD, CAT and SOD enzymatic activities were measured in the liver. Density, surface of MMCs as well as deposition of hemosiderin and lipofuscin pigments were determined in spleen. In summer 2011 and 2012, yellow eels were collected at two reference sites and two contaminated sites along the St. Lawrence System and the Gironde System (SG). Concentrations of organic and inorganic contaminants were measured in eel tissues.

Our study showed that the early size-at-age of *A. anguilla* were higher in downstream and more saline Gironde system habitats than in the upstream fluvial section and that early size-at-age of *A. rostrata* from the upstream Saint Lawrence system, most distant from the spawning area, exceeds those of eels sampled downstream, at less distant sites in the estuarine section. This result calls into question the current paradigm concerning the pattern of spatial variability of growth rates in *A. rostrata*. Then, principal component analysis was useful to discriminate effects of anthropogenic contaminant gradients, biological characteristics on biomarker responses, over

a large geographic scale. For *A. rostrata*, no major influences of persistent organic contaminants on hepatic EROD activity, antioxidant enzymes and splenic histopathological biomarkers were identified in eels sampled in contaminated and reference sites. For *A. anguilla*, higher hepatic catalase activity in eels from contaminated sites was related to higher concentration of organic contaminants (DDT and metabolites, sum of PCBs, sum of PBDEs) and density of MMC in eels from the contaminated river Garonne with higher muscle Hg and Cd. In both species, higher depositions of spleen hemosiderin pigment were measured in eels from the most brackish sites compared to eels living in freshwater environments. Results showed a possible association between higher hemosiderin pigment and metals contamination (Arsenic for *A. anguilla* and lead for *A. rostrata*). In comparison to its American cousin from the SLS, *A. anguilla* from Southwest France may be more affected by contaminants.

In order to specifically verify impact of contaminant and environmental factors on biomarker responses, a laboratory experiment on European yellow eels was carried out. Eels were exposed during 45 days to natural factors (high salinity or diet restriction) or contaminants (PCBs or Cd) at levels close to those found in the contaminated sites. Our results revealed a dose-response relationship between EROD activity and muscle PCB concentrations and confirmed that EROD activity is a sensitive tool to detect exposure for the most toxic PCBs. No effect of Cd was detected on EROD or spleen density of MMC. However, a higher surface of MMC was associated with higher liver concentrations of Cd and higher hemosiderin deposition in MMC suggesting a potentially toxic effect of Cd. Finally, this work provides a database to better target and prioritize future studies on the impacts of contaminants on eel health in the Gironde and St. Lawrence River basins.

AVANT PROPOS

Ce projet de thèse a été financé par le Conseil de Recherches en Sciences Naturelles et en Génie du Canada (CRSNG) intégrant le programme de subventions « environnement et écosystèmes sains » au Canada et par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) en France. Il inclut également la participation de deux autres organismes d'appui gouvernementaux directement concernés par l'application des résultats de cette recherche, soit le Ministère des Pêches et des Océans du Canada (MPO) et le Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP). Ces travaux de thèse se sont déroulées majoritairement au Centre Eau Terre et Environnement de l'INRS sous la direction du chercheur Patrice Couture. Les analyses moléculaires de stress oxydatif ont été menées dans les laboratoires du centre. Durant une période de deux ans, j'ai été accueillie à l'institut Maurice Lamontagne au MPO et encadrée par ma co-directrice et chercheuse Catherine Couillard. La majorité des analyses biochimiques et histopathologiques des poissons ont été réalisés et financés au MPO. Les analyses histochimiques sur l'âge des poissons ont été réalisées au MFFP sous la direction de Guy Verreault. Enfin, la collaboration avec une équipe française de l'université de Bordeaux a permis grâce à leur expertise de quantifier les concentrations de contaminants organiques et d'obtenir un second échantillonnage d'anguilles. Cette alliance a formé le programme de recherche CRSNG/ANR intitulé « IMMORTEEL » comprenant trois volets : l'influence des contaminants sur (volet 1) la diversité génétique de l'anguille Atlantique ; (volet 2) la croissance et la santé de l'anguille jaune ; et (volet 3) le potentiel reproducteur de l'anguille argentée.

La présente étude porte sur le volet 2 et résume un travail réalisé depuis mai 2011. Cette thèse a un format « par articles », c'est à dire qu'elle comporte en première partie, une synthèse générale de l'ensemble du doctorat, constituée de la problématique, des objectifs et hypothèses de recherche et finalement de la description et la discussion des résultats. Ce travail a donné lieu à la rédaction de trois articles soumis ou en préparation qui constitue la deuxième partie de la thèse. Enfin, les méthodes complémentaires et les études supplémentaires qui n'ont pas été publiées sont présentées en annexes.

Cette thèse m'a également permis de réaliser trois communications orales lors des colloques GAGILAU (Gironde Garonne saint-LAurent), ÉcoBIM et lors de la conférence « Gananoque Environmental Science and Engineering » ainsi que deux communications écrites lors du colloque GAGILAU et du congrès « American Fisheries Society ».

Listes des articles présentés dans ce manuscrit :

Article 1 : Géraldine Patey, Catherine M. Couillard, Hilaire Drouineau, Guy Verreault, Fabien Pierron, Patrick Lambert, Magalie Baudrimont et Patrice Couture. Early Growth of Atlantic yellow eels sampled along ecological gradients in the Gironde and St. Lawrence hydrographical systems. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences (sous presse). DOI: 10.1139/cjfas-2017-0025

Géraldine Patey : Échantillonnage sur le terrain, mesure des données morphométriques, traitement et interprétation des données et rédaction de l'article.

Catherine M. Couillard : Contribution à l'interprétation des données et rédaction de l'article.

Guy Verreault : Analyses des otolithes et traitement des données.

Hilaire Drouineau et Patrick Lambert : Conception d'un modèle mixte linéaire pour valider et améliorer les résultats et révision de l'article.

Fabien Pierron, Magalie Baudrimont et Patrice Couture : Révision de l'article.

Article 2 : Géraldine Patey, Catherine M. Couillard, Fabien Pierron, Magalie Baudrimont et Patrice Couture. Biotransformation, antioxidant and histopathological biomarker responses to contaminants in European and American Yellow Eels from the Gironde and St. Lawrence Estuaries. Chemosphere (sous presse). DOI :10.1016/chemosphere-2017-08-139

Géraldine Patey : Échantillonnage sur le terrain, analyses biochimiques et histopathologiques, traitement et interprétation des données et rédaction de l'article.

Catherine M. Couillard : Contribution aux traitements des analyses biochimiques et histopathologiques, interprétation des données et rédaction de l'article.

Patrice Couture : Contribution à l'interprétation des données et rédaction de l'article.

Fabien Pierron et Magalie Baudrimont : Révision de l'article.

Article 3 : Géraldine Patey, Catherine M. Couillard et Patrice Couture. Effects of a chronic exposure to cadmium, PCBs, diet restriction and salinity on hepatic EROD activity and spleen histopathological biomarkers in yellow European eels. En préparation.

Géraldine Patey : Analyses biochimiques et histopathologiques, traitement et interprétation des données et rédaction de l'article.

Patrice Couture : Contribution à l'interprétation des données et rédaction de l'article.

Catherine M. Couillard : Contribution à l'interprétation des données et rédaction de l'article.

REMERCIEMENTS

Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le support de mes deux directeurs de thèse, Catherine Couillard (MPO) et Patrice Couture (INRS). Merci de m'avoir fait partager votre passion et votre expérience dans le domaine de l'écotoxicologie.

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Patrice Couture pour m'avoir accueillie au sein de son équipe d'écotoxicologie et m'avoir guidé dès les premiers jours dans ce projet. Ton sens de la communication et ton positivisme sont de précieuses qualités qui m'ont permis de ne jamais baisser les bras face à la difficulté. Merci pour la confiance que tu m'as démontrée en me permettant de mener ce projet de doctorat qui n'a pas toujours été facile. Je te remercie également du temps que tu as consacré aux corrections des manuscrits et articles. Merci également pour le support financier et technique.

J'adresse également mes sincères remerciements à Catherine Couillard, ma directrice de thèse. Mon passage à Rimouski a été une expérience très enrichissante tant d'un point de vue scientifique que personnel. Catherine, j'ai beaucoup appris à tes côtés, tu as su me faire partager ta passion pour la recherche, ta rigueur dans les analyses de laboratoire et dans la rédaction ainsi que ton déterminisme. Je n'oublierai jamais les longues réunions du vendredi après-midi à discuter des résultats ce qui fut toujours très constructif. Merci pour tes conseils et tes critiques, ton écoute, tes encouragements et ta disponibilité à répondre à mes questions malgré ton horaire chargé.

Je remercie tous les membres de l'équipe « anguilles », en commençant par Antoine Caron, Audrey Moffett, Pauline Pannetier et Élodie Drevet qui ont participé aux campagnes d'échantillonnage. Nous avons passé des moments inoubliables à disséquer des anguilles à la frontale le soir sous une tente envahie de mouches noires, maringouins et autres mouches qui piquent, j'en garde de très bons souvenirs. J'aimerais également remercier l'aide précieuse de Guy Verreault (MFFP) et de son équipe technique sur le terrain mais également pour leur expertise dans la préparation et l'analyse de la lecture d'âge sur les otolithes d'anguille. Je suis aussi redevable de l'aide de Benoit Légaré (MPO) pour m'avoir transmis son expertise sur les analyses de l'activité enzymatique d'EROD et ainsi que sur l'évaluation des dommages oxydants chez les anguilles et à Catherine pour m'avoir formé aux techniques histologiques et à l'identification des pathologies chez l'anguille. Merci pour le temps que vous m'avez consacré et pour votre bonne humeur. J'ai également une pensée pour Mélanie Boudreau avec qui j'ai pu

partager le laboratoire d'histopathologie ainsi que les nombreuses marches sur la banquise. Tu es devenue une amie à Rimouski et tu le resteras. Merci pour ton accueil et ta spontanéité.

Je remercie les membres de mon jury d'évaluation, Nadia Aubin-Horth, Daniel Cyr et Jean Laroche pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ces travaux et pris le temps de lire ce manuscrit avec intérêt.

Aussi, plus sérieusement, j'aimerais remercier ma famille car sans vous, ce projet n'aurait pas pu se faire. Plus particulièrement à ma mère, merci de m'avoir épaulé durant toutes ces années de travail, de m'avoir écouté et aidé personnellement et financièrement lors des moments plus difficiles. Tu es pour moi une source d'inspiration et de ténacité puisque toi aussi tu as poussé les études longues en devenant médecin histo-pathologiste, professeur à l'université et maître de conférence. Tu m'as donné le goût pour les sciences depuis toute petite et tu m'as toujours laissé choisir ma voie, je t'en remercie. Bien sûr, je n'oublie pas mon père ainsi que mon frère qui m'ont soutenue dans mon travail et ont su me faire rire lors des moments difficiles.

J'ai une pensée particulière à ma petite famille, et en particulier à toi, mon amour, mon Bastien qui partage ma vie, le père de notre fils Matteo. Je ne sais pas comment j'aurais pu terminer ce beau projet sans ta présence, ton soutien et ton énergie au quotidien. Il n'y a pas de mots pour décrire ce que tu m'as apporté durant la fin de ma thèse...Merci d'être là, je t'aime.

Enfin, je termine ces remerciements par une pensée et non des moindres à mon grand-père, Max Poll, conservateur de musée, ichtyologiste reconnu, professeur d'université et membre de l'académie royale des sciences, des lettres et des beaux-arts de Belgique. Tu n'es malheureusement plus parmi nous depuis plusieurs années mais je sais que tu aurais été fière de ta petite fille en lisant ce manuscrit sur l'anguille.

Je dédie cette thèse à mes parents, Martine et Jean-Louis

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	v
ABSTRACT	vii
AVANT PROPOS.....	ix
REMERCIEMENTS.....	xiii
TABLE DES MATIÈRES	xvi
LISTE DES FIGURES.....	xix
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xx
PARTIE I : SYNTHÈSE	xxi
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Historique de la contamination dans les systèmes de la Gironde et du Saint Laurent.....	8
1.1.1 La Gironde	8
1.1.2 Le Saint Laurent	9
1.2 Choix du modèle biologique : l'anguille européenne et l'anguille américaine.....	11
1.2.1 L'anguille, un bio-indicateur de pollution	11
1.2.3 Une catadromie facultative	12
1.3 État des connaissances sur la variabilité de la croissance chez l'anguille européenne et américaine.....	13
1.4 Choix des biomarqueurs utilisés dans l'évaluation des effets des contaminants chez l'anguille jaune	17
1.4.1 Les enzymes de biotransformation et antioxydantes dans le foie de l'anguille	18
1.4.2 Les biomarqueurs histopathologiques dans la rate de l'anguille	23
1.5 Influence des contaminants, des facteurs biologiques et environnementaux sur les réponses des biomarqueurs	25
1.6 Schéma de synthèse des relations proposées entre les différents facteurs et les réponses des biomarqueurs chez l'anguille jaune.....	28

2. INTÉRÊT DE L'ÉTUDE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE.....	29
2.1 L'intérêt de l'étude	29
2.2 L'objectif général	30
2.3 Objectifs des chapitres	30
2.4 L'originalité	31
3. MATERIEL ET METHODES COMMUN AU PROJET	33
3.1 Échantillonnage sur le terrain	33
3.1.1 Capture des anguilles jaunes américaines.....	33
3.1.2 Capture des anguilles jaunes européennes	34
3.1.3 Mesures morphométriques et prélèvement des tissus	35
3.1.4 Détermination de l'âge	36
3.1.5 Longueur estimée par rétro-calcul.....	37
3.2 Expérience de laboratoire	37
3.2.1 Capture des anguilles jaunes européennes	38
3.2.2 Conditions générales des expositions	38
3.2.3 Expositions aux polluants.....	39
3.2.4 Expositions aux facteurs environnementaux	40
3.3 Analyses des indicateurs d'exposition et contenu lipidique	41
3.3.1 Métaux	41
3.3.2 Contaminants organiques	42
3.3.3 Contenu lipidique.....	42
4. ANALYSES DES BIOMARQUEURS.....	43
4.1 Activité d'EROD.....	43
4.2 Enzymes antioxydantes	44
4.3 Biomarqueurs histopathologiques	45
4.4 Les traitements statistiques.....	48
5. CHAPITRES DE THÈSE	51
5.1 Chapitre 1 : variations de croissance chez les anguilles jaunes échantillonnées le long des systèmes hydrographiques de la Gironde et du Saint-Laurent.	51
5.2 Chapitre 2 : impact de la contamination sur les réponses de biomarqueurs chez l'anguille jaune américaine et européenne en milieu naturel.....	57
5.3 Chapitre 3 : Effets de l'exposition au cadmium et aux PCB à différentes concentrations, à la sous-alimentation et à la salinité sur l'activité d'EROD et les réponses histopathologiques de la rate chez l'anguille européenne	62
6. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES.....	67
6.1 Conclusions générales.....	67
6.2 Perspectives de recherche	71

7. BIBLIOGRAPHIE	76
PARTIE II : ARTICLES SCIENTIFIQUES.....	91
8. ARTICLE 1.....	92
9. ARTICLE 2.....	138
10. ARTICLE 3.....	184
11. ANNEXES.....	220
ANNEXE I-1 Les effets des contaminants, des facteurs biologiques et environnementaux sur les réponses de biomarqueurs de biotransformation et des capacités antioxydantes chez l'anguille.....	220
ANNEXE I-2 : Les effets des contaminants, des facteurs biologiques et environnementaux sur les réponses de biomarqueurs histopathologiques chez l'anguille.	228
ANNEXE II Relation linéaire entre la croissance (taille à la capture/âge à la capture) et l'âge à la capture a) chez les anguilles européennes échantillonnées le long du SG (DOR, GAR ET GIR) et dans le marais salant de Certes (CER) et b) chez les anguilles américaines échantillonnées le long du SSL dans la partie fluviale (LSP et LSF) et dans les tributaires de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent (RSO et RSJ).	231
ANNEXE III Protocole de l'analyse biochimique d'EROD adapté au foie de l'anguille	232
ANNEXE IV Photographies numériques de l'histologie de la rate chez l'anguille jaune	235

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Le cycle vital de l'anguille présentant les différentes phases de vie et les métamorphoses (d'après Van Ginneken, 2006 et adaptée par G. Patey)	5
Figure 1.2 : Synthèse de la démarche générale suivie au cours de la thèse	9
Figure 1.3 : Schéma général qui décrit A) la première phase de biotransformation d'un xénobiotique organique via le complexe enzymatique de biotransformation (EROD) et B) la deuxième phase d'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO) toxiques via les enzymes antioxydantes (SOD et CAT) dans un hépatocyte chez l'anguille (D'après Monod, 1997 et adaptée par G. Patey)	22
Figure 1.4 : Mécanisme d'induction du stress oxydant par le Cd (d'après Ercal et al. 2001 et traduit par G. Patey)	24
Figure 1.5 : Relations proposées entre les contaminants, les facteurs environnementaux, biologiques et les réponses des biomarqueurs chez l'anguille jaune	30
Figure 3.1 : Carte de localisation des sites de pêche des anguilles jaunes au Québec	36
Figure 3.2 : Carte de localisation des sites de pêche des anguilles jaunes en France.....	37
Figure 4.1 : Synthèse des différentes méthodes utilisées pour quantifier les réponses des biomarqueurs.....	48
Figure 5.1 : Schéma de synthèse du chapitre 1 dans le cadre du système du Saint Laurent.....	56
Figure 5.2 : Schéma de synthèse du chapitre 1 dans le cadre du système de la Gironde	57
Figure 5.3 : Schéma de synthèse du chapitre 2. La partie supérieure du schéma présente la contamination mesurée dans le muscle et le foie des anguilles échantillonnées dans les différents sites ainsi que le gradient de salinité. La partie inférieure résume les principales relations mis en évidence entre les contaminants mesurés dans les anguilles des sites et les réponses des biomarqueurs	62
Figure 5.4 : Schéma de synthèse du chapitre 3 dans le cadre de l'expérience en laboratoire	67

LISTE DES ABRÉVIATIONS

CAT	Catalase
COSEPAC	Comité sur la situation des espèces en péril au Canada
CMM	Centre mélano-macrophage
CRSNG	Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada
DDT	Dichlorodiphényltrichloroéthane
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
EROD	Éthoxyrésorufine O-dééthylase
GC/MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GC-ECD	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un ECD : détecteur à absorption électronique
GST	Glutathion S-transférase
HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
HAPH	Hydrocarbure aromatique polycyclique halogéné
IRSTEA	l'Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture
LPTC	Laboratoire de toxico et physico-chimie de l'environnement
LSF	Lac Saint-François
LSP	Lac Saint-Pierre
MFFP	Ministère des forêts, de la faune et des parcs
MPO	Ministère des pêches et des océans
OPG	Ontario power generation
PBDD	Polychlorodibenzo-p-dioxine
PBDE	Polybromodiphényléther
PBDF	Polychlorodibenzofuranne
PBT	Persistant bioaccumulable et toxique
PCB	Polychlorobiphényle
SG	Système de la Gironde
SSL	Système du Saint-Laurent
SOD	Superoxyde dismutase
RSJ	Rivière Saint-Jean
RSO	Rivière Sud-Ouest
UICN	Union internationale pour la conservation de la nature

PARTIE I : SYNTHÈSE

1. INTRODUCTION

Les estuaires et les fleuves sont des écosystèmes d'une grande diversité faunique et floristique façonnés par les gradients d'hydrométrie et de salinité. Ces différents espaces constituent un filtre entre le bassin versant et l'océan. Ces milieux sont constitués par les marais saumâtres, les prairies, les friches et les boisements humides qui abritent des espèces végétales et piscicoles et qui sont idéaux pour la reproduction et la croissance des organismes aquatiques.

Les fleuves sont des milieux hydrauliques et énergétiques très puissants. Ils sont d'une importance majeure pour les écosystèmes d'eau douce et pour l'utilisation humaine d'eau. Leur débit et leur température jouent un rôle direct sur la qualité de l'eau (Ducharne, 2008), le taux de croissance et la distribution des organismes d'eau douce (Mohseni et al., 2003). L'homme y a toujours vu un enjeu économique notamment pour la production d'énergie thermoélectrique et hydroélectrique (Forster et Lilliestam, 2011), la production d'eau potable (Ramaker et al., 2005), la pêche (Ficke et al., 2007) et les loisirs (Webb et al., 2008). Les estuaires quant à eux sont des plans d'eaux semi-fermés où les eaux douces des rivières et des fleuves viennent fusionner avec l'océan (McLusky et Elliott, 2004). L'estuaire est une voie de passage obligée pour les poissons migrateurs. Les espèces les plus emblématiques sont l'esturgeon (*Acipenser sp.*), le saumon (*Salmo salar*), la truite de mer (*Salmo trutta trutta*), les lamproies (*Ichthyomyzon* et *Petromyzon sp.*) et l'anguille (*Anguilla sp.*). D'autres espèces viennent dans l'estuaire pour s'y reproduire ou s'y nourrir tel que le maigre (*Argyrosomus regius*) ou la Sole commune (*Solea solea*) (Lobry et al. 2003). Les estuaires constituent aussi une nourricerie pour les formes larvaires et un abri pour les jeunes poissons (Boehlert et Mundy, 1988). Les fleuves, et surtout l'estuaire constituent un territoire privilégié pour les espèces migratrices.

En raison de la croissance démographique et du développement industriel et agricole, les estuaires et les fleuves sont pollués par une grande variété de contaminants chimiques qui s'y mêlent. On distingue plusieurs sources de pollution affectant les estuaires et les fleuves et par conséquent les organismes qui y habitent: l'appauvrissement en oxygène (hypoxie, et même anoxie) (Sáiz-Salinas, 1997), l'accumulation de substances toxiques (comme les composés organiques toxiques, les produits pétroliers et les métaux) (Bryan et Langston, 1992), les déversements (déversements de pétrole) (Colombo et al., 2005), les agents pathogènes (à partir des eaux usées) (Lipp et al., 2001), et également les sédiments agissant comme un réservoir pour les contaminants (Budzinski et al., 1997; Chapman et Wang, 2001 ; Santos et al., 2008). Plus récemment, les changements climatiques exercent une pression supplémentaire sur les

systèmes estuariens et fluviaux ainsi que sur les populations qui s'y trouvent. Parmi les pressions, notons l'élévation du niveau des eaux, la variabilité accrue dans les températures et les précipitations (modification de la salinité) qui ont des effets directs ou indirects sur les populations de poissons (Reist et al., 2006 ; Church et al., 2011). Comme nous l'avons mentionné précédemment les polluants sont donc rarement seuls dans les milieux aquatiques, la plupart du temps ils sont mélangés et interagissent avec les multiples facteurs de stress environnementaux incluant la hausse des températures, les variations de salinité, l'hypoxie, l'acidification et des radiations UV, la diminution de la disponibilité de nourriture (rapport annuel de l'agence européenne pour l'environnement). En considérant l'ensemble de ces facteurs environnementaux et anthropiques, les organismes aquatiques subissent au cours de leur vie de multiples stress pouvant modifier leur cycle de vie, conduire à des changements physiologiques et entraîner des dommages cellulaires et tissulaires menant parfois à la mort de l'organisme.

Parmi les espèces migratrices menacées dans l'Atlantique Nord, notons la présence de l'anguille (*Anguilla sp.*). L'anguille européenne (*Anguilla anguilla*, Linnaeus, 1758) et l'anguille américaine (*Anguilla rostrata*, LeSueur 1821) sont deux espèces d'anguille qui occupent cette aire géographique. L'anguille européenne se retrouve au Nord-Ouest de l'Afrique et le long de la côte Ouest du continent européen, de la Méditerranée jusqu'en Islande (Avisé, 2003). L'anguille américaine quant à elle, se distribue le long des côtes Est de l'Amérique et s'étend du Venezuela au sud jusqu'au Groenland au nord (Tesch et Rohlf, 2003). Les anguilles Atlantiques (européenne et américaine) ont un cycle de vie unique. Leur cycle comprend 4 phases de vie (embryonnaire, larvaire, juvénile et adulte) et 2 métamorphoses (Figure 1.1). La phase adulte est séparée en deux stades : le stade dit « jaune » et le stade dit « argenté » en relation avec l'apparition de certains pigments. L'anguille jaune passe toute sa phase de croissance dans les eaux douces des cours d'eau, des rivières et des lacs ou en milieu estuarien et côtier pendant des dizaines d'années puis quitte le milieu continental ou estuarien lorsqu'elle a accumulé suffisamment de réserves énergétiques et devient sexuellement mature pour aller se reproduire en mer. Elle ne se reproduit qu'une seule fois au cours de sa vie avant de mourir. *A. anguilla* et *A. rostrata* constituent deux populations distinctes d'anguilles, une en Amérique et l'autre en Europe qui se reproduisent séparément dans la même zone, la Mer des Sargasses (Wirth et Bernatchez, 2003). On parle d'espèces sémelpares et panmictiques. Après la période de reproduction, le cycle débute vers le printemps lors de l'éclosion de l'œuf, c'est le début de la phase larvaire. La larve est appelée leptocéphale et se développe dans l'océan. Puis débute la période de dispersion océanique : la larve va croître tout en gagnant les côtes américaines et

européennes à l'aide des courants océaniques notamment le courant de Floride, le Gulf Stream et le courant de l'Atlantique Nord. À l'approche du milieu continental, et plus particulièrement au niveau des estuaires, a lieu la première métamorphose de la leptocéphale en civelle (Antunes et Tesch, 1997). La civelle amorce la phase juvénile. Lors de l'apparition des premiers pigments jaune, la civelle devient anguilette. Elle quitte souvent les estuaires et remonte les cours d'eau et les rivières pour atteindre les lacs et les marais en quête de nourriture. Quand le processus de pigmentation est complété, on parle d'anguille jaune. À la fin de cette période, la plupart des individus subissent une 2^{ème} métamorphose appelée « argenture », dont le nom est lié au changement de pigmentation : les anguilles prennent une couleur plus métallique et argentée. La métamorphose correspond à l'arrêt de l'alimentation et de la croissance et à l'amorce du développement du système reproducteur.

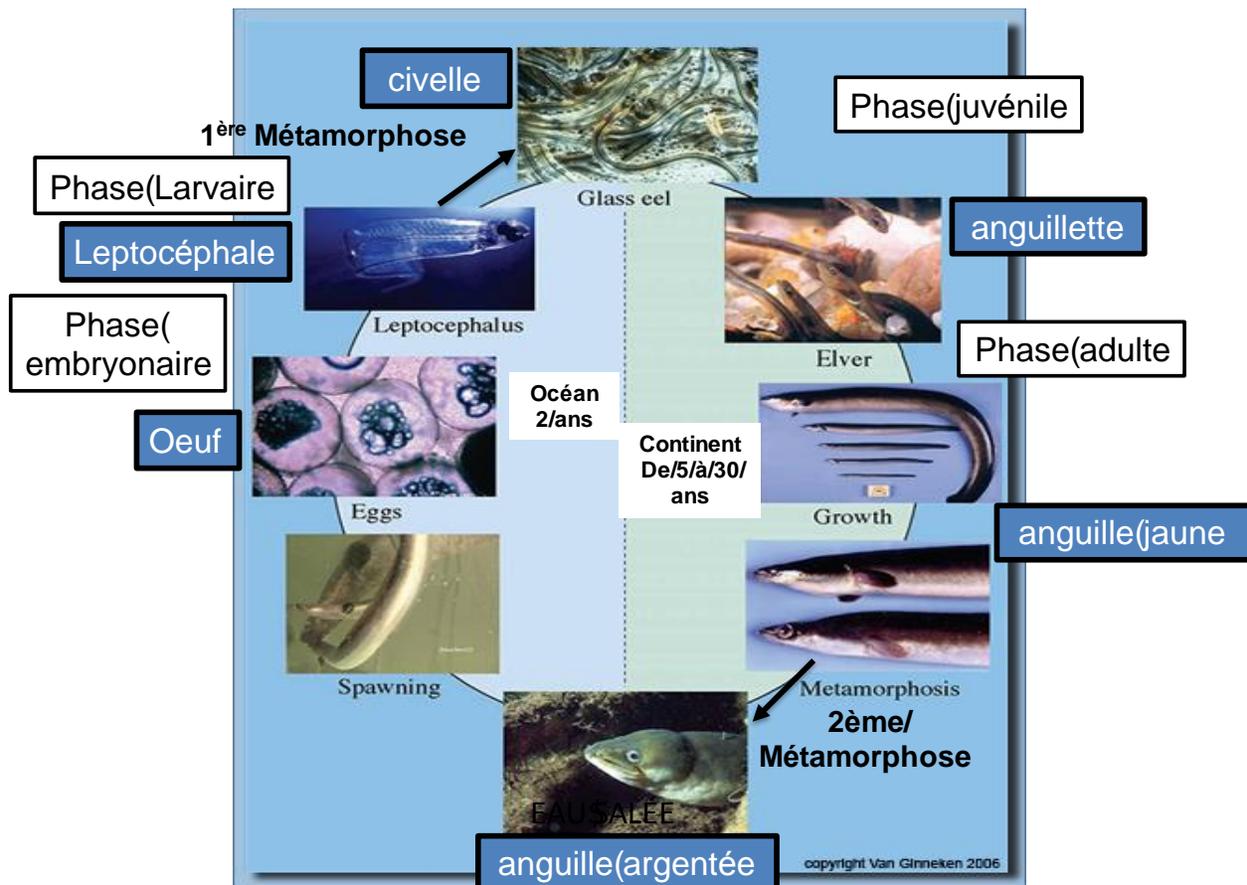


Figure 1.1 : Le cycle vital de l'anguille présentant les différentes phases de vie et les métamorphoses (d'après Van Ginneken, 2006 et adaptée par G. Patey)

Depuis un peu plus d'une vingtaine d'années, les populations d'anguilles européennes et américaines font l'objet d'un déclin très important (Bruslé, 1990 ; Moriarty et Dekker, 1997 et Stone, 2003). En Europe, l'anguille européenne est inscrite sur la liste rouge en danger majeur

d'extinction par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (IUCN, 2015). Depuis mai 2012, l'anguille américaine est inscrite sur la liste de la loi sur les espèces en péril du gouvernement fédéral, elle a été désignée comme « espèce menacée » (COSEWIC, 2012). Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ce déclin. Les changements climatiques et océanographiques engendrant des modifications de température, de stratification et de courant peuvent affecter la disponibilité de nourriture pour les larves et leur transport vers les côtes continentales (Moriarty et Dekker, 1997 ; Knights, 2003 ; Bonhommeau et al., 2009). Les changements climatiques peuvent également affecter la disponibilité de nourriture pour les anguilles jaunes, engendrer des restrictions alimentaires et avoir des répercussions sur les capacités à migrer et à se reproduire (Belpaire et al. 2009). Chez l'anguille jaune, une restriction alimentaire peut influencer l'accumulation de réserves lipidiques nécessaire pour sa reproduction, par exemple par une remobilisation des graisses et des contaminants lipophiles chez le poisson en manque de nourriture ce qui pourrait avoir des répercussions sur son métabolisme (Belpaire et al. 2009). La modification des conditions hydriques sur les continents pourrait également avoir un effet sur la croissance et la migration des anguilles toujours en lien avec une augmentation de la température et des changements au niveau des précipitations (Knight, 2003). La surpêche pourrait être un facteur important, qui aggrave les effets des changements océaniques et climatiques (Fontenelle et al., 1997). Un autre facteur est la construction de barrages hydroélectriques et autres aménagements dans les fleuves et les rivières qui représentent des obstacles à la migration anadrome des jeunes anguilles vers leur habitat dulcicole mais également lors de la dévalaison des anguilles matures, prêtes à se reproduire (Amilhat, 2007 ; Liermann et al., 2012). Les pathogènes constituent également une menace pour l'anguille. Le nématode pathogène le plus invasif retrouvé actuellement chez l'anguille est *Anguillicola crassus*. Il est originaire du sud-est de l'Asie et est endémique de l'anguille japonaise. On le rencontre aussi bien chez l'anguille européenne qu'américaine (Moravec, 1992 ; Li et al., 2015). Les conséquences sont considérables puisque les anguilles infestées ont des problèmes de fonctionnement de la vessie natatoire, une diminution des réserves énergétiques et des capacités de nage, une réduction de la croissance, une forte réponse inflammatoire et une diminution de la résistance aux autres stress environnementaux (kirk, 2003). Enfin, l'un des facteurs le plus étudié de nos jours pour expliquer leur disparition est la pollution des écosystèmes aquatiques (Feunteun, 2002 ; Belpaire et al., 2009, Geeraert et Belpaire, 2010). Par sa position au sommet de la chaîne alimentaire, l'anguille intègre non seulement les effets directs des contaminants (contamination via la nourriture et l'eau) mais également les effets indirects engendrés à des niveaux trophiques inférieurs (Rasmussen et

Morrissey, 2008). Par sa longue phase de croissance, son régime alimentaire varié et son mode vie benthique, elle est une espèce particulièrement exposée aux polluants et peut servir d'indicateur des concentrations locales de polluants métalliques (Durrieu et al., 2005) et organiques (Couillard et al., 1997; Tapie et al., 2011, Byer et al., 2013).

Le programme de recherche sur lequel repose mes travaux de thèse vise à avancer nos connaissances sur les aspects des relations entre la pollution de l'environnement dulcicole continental, la contamination de l'anguille et les effets de cette pollution sur la variabilité physiologique et la santé de l'anguille. En améliorant notre compréhension de l'implication de la pollution reliée aux activités minières, industrielles et urbaines dans le déclin des anguilles d'Amérique et européennes, ce projet contribuera à mieux comprendre les conséquences écologiques à long terme de la pollution anthropique et à orienter les politiques et programmes de recherche visant à protéger ce précieux poisson, à favoriser son rétablissement et à empêcher sa disparition.

Pour cela, nous avons effectué une campagne d'échantillonnage d'anguilles sauvages originaires de deux systèmes fluvio-estuariens caractérisés tant par des variations physico-chimiques (salinité et température) que par leur imprégnation historique en contaminants. Il s'agit des hydrosystèmes du Saint-Laurent (Québec, Canada) et de la Gironde (France). Nous nous sommes particulièrement intéressés au stade jaune de croissance de l'anguille. Durant ce stade, la principale activité de l'anguille est de se nourrir pour croître et accumuler suffisamment de réserves énergétiques et atteindre une taille assez grande pour se reproduire. Cette période est marquée par une accumulation potentiellement importante de contaminants dans les anguilles. Dans le but de comprendre l'influence de la contamination de l'habitat où s'effectue la croissance sur la santé de l'anguille, nous avons utilisé une batterie de biomarqueurs d'exposition et d'effets. Les biomarqueurs d'exposition permettent de détecter la présence d'une substance exogène, de son métabolite ou le produit d'une interaction entre un agent xénobiotique et une molécule ou cellule cible (Van der Oost, 2003). Les biomarqueurs d'effet sont des mesures biomoléculaires, cellulaires ou tissulaires qui indiquent des altérations dues à de multiples stressseurs (Van der Oost, 2003). Une grande proportion des biomarqueurs d'effets sont non-spécifiques et répondent à l'effet cumulatif de stress environnementaux variés incluant une contamination multiple et chronique dont la source est diffuse et mal connue (Kelly et Janz, 2009).

Dans notre étude, la meilleure façon de comprendre l'impact de ces multiples stress est d'utiliser une approche systématique, en d'autres termes, appréhender la complexité en élaborant différentes étapes afin de comprendre la complexité des multiples stress sur l'anguille. L'une des premières étapes a été de caractériser la variabilité de la croissance à un jeune âge des anguilles capturées en lien ou non avec les caractéristiques des différents habitats (salinité, distance de la mer des Sargasses). Cette stratégie d'étude a permis de comprendre davantage les différences morphologiques entre les anguilles ainsi que leur histoire de vie. Ces différences peuvent influencer l'exposition des anguilles aux contaminants durant leur période de croissance et les réponses des biomarqueurs en lien avec la contamination. Ensuite, nous avons augmenté la complexité de l'étude, en essayant de comprendre les effets des contaminants mesurés en tenant compte des facteurs de stress environnementaux. Pour cela des analyses multivariées ont été effectuées entre l'ensemble des contaminants, les biomarqueurs et les données morphométriques des anguilles dans le but d'associer un seul ou un ensemble de contaminants à une réponse de biomarqueur. Ces analyses ayant été réalisés à partir de données provenant du terrain et ayant révélé des effets biologiques liés aux contaminants chez *A. anguilla*, nous avons tenté de vérifier les effets toxiques et environnementaux obtenus dans les conditions naturelles chez *A. anguilla* à l'aide d'une exposition en laboratoire à différents contaminants et facteurs naturels de façon séparée. Cette analyse en laboratoire a permis de mettre en évidence des réponses d'origine toxique mais également de les distinguer des réponses aux variations naturelles du milieu. La démarche générale des travaux réalisés dans cette thèse est illustrée en figure 1.2.

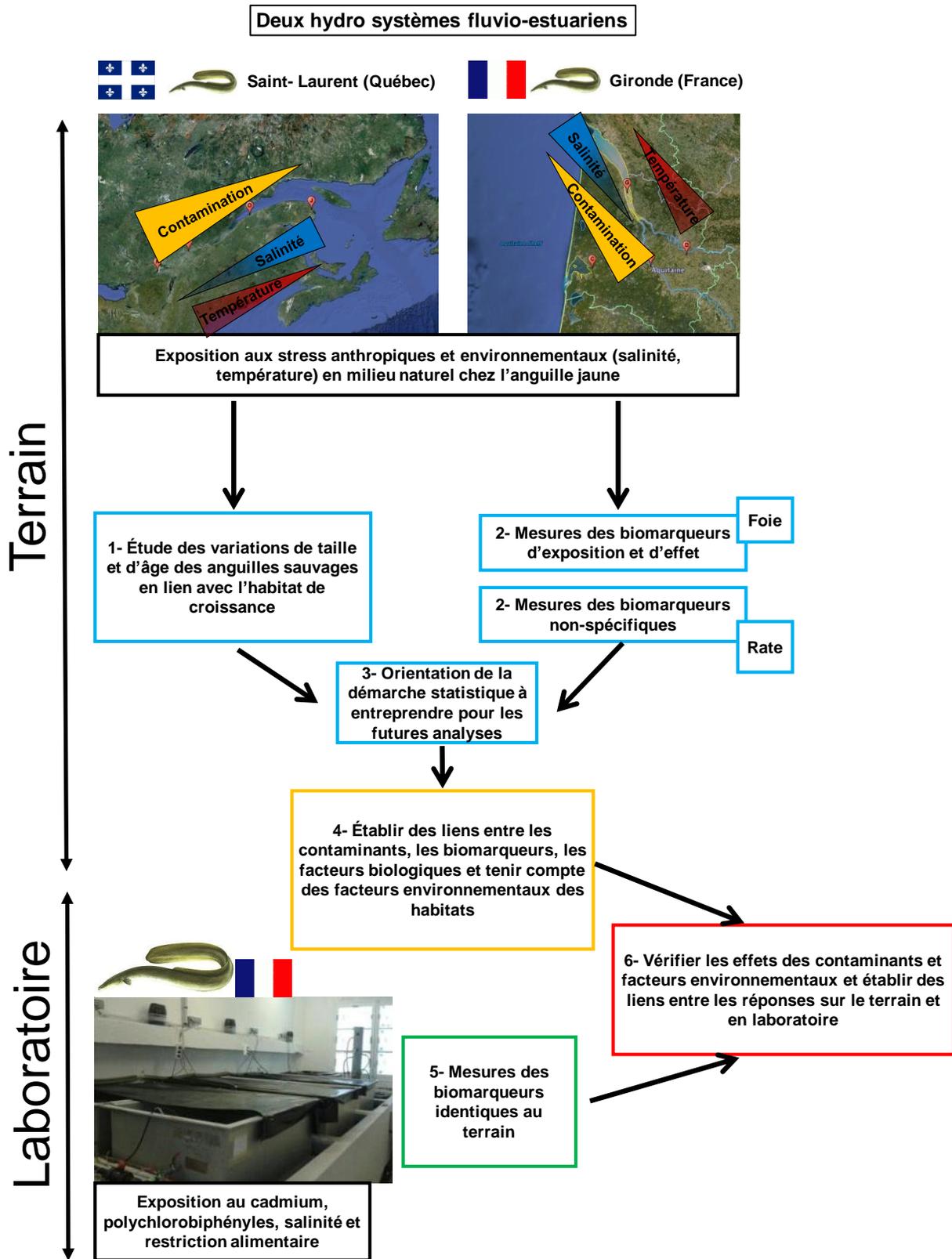


Figure 1.2 : Synthèse de la démarche générale suivie au cours de la thèse

1.1 Historique de la contamination dans les systèmes de la Gironde et du Saint Laurent

1.1.1 La Gironde

L'estuaire de la Gironde est le plus vaste estuaire d'Europe avec une longueur de 75 km et jusqu'à 12 km de largeur (cependant peu comparable à la grandeur de l'estuaire du Saint-Laurent) et une superficie de 635 km². D'un point de vue hydrodynamique, il subit les effets cumulés de deux systèmes hydrographiques : la Dordogne et la Garonne qui apportent de 800 à 1 000 m³/s d'eau douce chargée de sédiments.

L'estuaire est pollué par certains métaux comme le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le mercure (Hg), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn). D'après Pierron et al. (2008), les anguilles de la Gironde sont exposées au cadmium soit directement via le métal dissous dans l'eau (concentration moyenne de Cd = 0,2 µg/l) soit par la voie alimentaire (concentration moyenne de Cd = 400 ng/g de poids sec dans la nourriture). Des teneurs élevées en Cd (> 100 pg/g de poids sec) ont été découvertes à la fin des années 1970 dans les huîtres (*Crassostrea gigas*) de l'embouchure de l'estuaire (Claisse, 1989). S'en est suivie une interdiction de leur consommation et de leur production depuis 1996 (Audry et al., 2004). La principale source de pollution était la mine de charbon et de traitement de Zc située dans le bassin de Decazeville (Castelle et al., 2007). Depuis sa fermeture en 1986 et malgré des teneurs décroissantes pour le Cd, le Pb et le Hg, les teneurs en Cd restent tout de même supérieures au seuil mesuré au niveau des sites de référence situés en amont de la mine (Audry et al., 2004). Des récents travaux ont révélé de fortes concentrations en argent (Ag) (jusqu'à 60 mg/kg en 2003-2004) dans les huîtres sauvages à l'embouchure de l'estuaire de la Gironde (Chiffolleau, 2005).

On retrouve essentiellement comme pesticides, le lindane, qui après une augmentation dans les années 1980, a tendance à diminuer, ainsi que le dichlorodiphényltrichloroéthane DDT dont les teneurs diminuent au cours du temps mais restent élevées (Cruz, 2015). Parmi les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), le fluoranthène, le phénanthrène et l'anthracène se retrouvent dans les sédiments de l'estuaire de la Gironde ainsi que le pérylène en quantités plus élevées et qui prédomine par rapport aux autres (Budzinski et al., 1997). Pour les polychlorobiphényles (PCB), le bureau Communautaire de référence de la Commission de la communauté européenne a défini en 1982, 7 congénères majoritaires à suivre parmi les 209 congénères possibles. Ces composés majoritaires dans l'environnement sont les PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153 et 180. En France, l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments

(AFSSA), conformément aux recommandations de l'OMS, a recommandé un apport quotidien acceptable (ADI) de 0,02 µg/kg/ jour, une concentration exprimée en équivalent arochlor 1254. Si l'on considère un homme moyen de 75 kg, il ne peut manger que 20 g d'anguille par semaine pour respecter cette directive, au lieu d'une portion normale de poisson (environ 150 g). Selon l'étude de Tapie et al. (2011), les civelles de l'estuaire de la Gironde (incluant la Garonne) présentent un niveau faible de contamination en PCB et le polybromodiphényléther (PBDE) avec 28 ± 11 ng/g de poids sec et 5 ± 3 ng/g de poids sec respectivement. Pour la somme des 7 PCB prioritaires, le niveau de contamination des anguilles augmente du stade civelle au stade argentée avec des concentrations musculaires allant de 203 à 615 ng/g de poids sec pour les civelles et de 348 à 1676 ng/g de poids sec pour les anguilles jaunes et argentées collectées durant 2004 et 2005.

1.1.2 Le Saint Laurent

L'estuaire du Saint-Laurent est le plus grand estuaire de l'Amérique du Nord. Il est alimenté en eaux douces principalement par le fleuve Saint-Laurent qui possède un bassin de drainage de 1 610 000 km² (soit près de 25 % des réserves mondiales en eau douce) comprenant les Grands Lacs, ainsi qu'une bonne portion du réseau hydrographique du continent (Burton, 1998). Il draine vers l'océan Atlantique par un parcours d'environ 4 000 km. L'estuaire est divisé en trois sections : l'estuaire fluvial du lac St-Pierre à l'île d'Orléans (constitué d'eau douce), l'estuaire moyen jusqu'au Saguenay et l'estuaire maritime jusqu'à Pointe-des-monts (constitué d'eau saumâtre et marine). Il abrite une faune aquatique riche et diversifiée, incluant une population endémique de mammifères marins, les bélugas (*Delphinapterus leucas*), aujourd'hui menacée (COSEWIC, 2006).

L'estuaire reçoit des quantités importantes de contaminants provenant des secteurs industrialisés des Grands Lacs et du fleuve Saint-Laurent, transportés par voies fluviales et/ou atmosphériques (Lebeuf et al., 2005). Les effluents des usines de pâtes et papiers et les alumineries, les rejets agricoles et municipaux, les ports, les marinas et le trafic maritime sont des sources locales de contamination (Vigliano et Pelletier, 2006). Les effluents urbains sont responsables d'une partie des apports métalliques dans les eaux qui sont véhiculées de la partie fluviale vers la partie estuarienne et maritime. D'après Gobeil et al. (2005), la contribution des effluents urbains aux flux métalliques totaux est de l'ordre de 60% pour l'Ag, entre 8 et 13% pour le cuivre (Cu), le Zc, le molybdène (Mo), le Cd et le bismuth (Bi). La présence de calcium (Ca), Cd, chrome (Cr), Cu, nickel (Ni) et Zc dans les eaux de surface et les matières en suspension le

long de la partie fluviale du Saint-Laurent a été confirmé par Kwan et al. (2003) démontrant une bioaccumulation significative associée à une forte variabilité saisonnière d'accumulation chez la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*). Au sein du projet, Pannetier et al. (2016) a également démontré une bioaccumulation de Cu, Hg, Ag, Cd et sélénium (Se) chez les anguilles en fonction de leur taille et de leur âge ce qui suppose un possible risque sur la santé des poissons. Depuis les années 1970, les concentrations de Hg, de HAP et de PCB ont baissé dans les sédiments et dans le biote (Lebeuf et al., 2007). Cependant, les organismes demeurent exposés à un mélange complexe de contaminants pouvant avoir un impact sur les populations, seuls ou en interaction avec d'autres facteurs environnementaux (Couillard et al., 2008).

D'après Byer et al. (2012), (2013) et (2015), les anguilles capturées dans les eaux du lac Ontario en 2007 et en 2008 présentent de plus fortes concentrations en polluants organiques persistants (POP) de type dioxine, furane, PCB et OCP par rapport aux anguilles capturées les mêmes années, dans les eaux du fleuve et de l'estuaire du Saint Laurent ainsi que celles des côtes du Canada Atlantique. Ces concentrations diminuent d'ouest en est le long du fleuve Saint-Laurent et de l'estuaire pour augmenter légèrement sur les côtes des maritimes. Par ailleurs, une diminution des concentrations moyennes des POP (jusqu'à 3 fois plus faible) a été observé chez les anguilles en 2008 par rapport à celles collectées en 1988 et 1998. Indépendamment de l'année d'échantillonnage, en moyenne, les PCB représentent 64% de la contamination totale en POP chez les anguilles, les OCP représentent 32% et les dioxines et furanes seulement 0.002% soit une contribution très faible à la contamination totale en POP. En 2008, la concentration moyenne en PCB (46 congénères mesurés dans la totalité de l'anguille) dans les anguilles jaunes et immatures (ayant une taille moyenne de 106,2 cm) étaient de 364 ng/g de poids sec dans le lac Ontario, 2 fois plus que pour les anguilles du fleuve Saint-Laurent, et 5 fois plus que celles de l'estuaire. Les plus faibles concentrations ont été mesurées dans les anguilles de la Rivière Sud-Ouest (10,9 ng/g de poids sec). Les concentrations en OCP sont 2 fois moins élevées dans le fleuve Saint-Laurent, 4 fois moins dans l'estuaire, et 10 fois moins dans la rivière Sud-Ouest par rapport au lac Ontario. Les pesticides les plus abondants présents dans les anguilles du système du Saint-Laurent sont le 4,4'-DDE et le Mirex. En 2007 et 2008, la concentration moyenne de la somme des PBDE (IUPAC numéros 17, 25, 28, 33, 47, 49, 66, 75, 99, 100, 153, 154, 155, 183) est la plus élevée au lac Ontario (26,7 ng/g de poids sec) par rapport aux autres sections du système du Saint-Laurent, et similaire à celle mesurée dans les anguilles européennes capturées en Belgique en 2009. Celle mesurée dans les anguilles du fleuve du Saint-Laurent (mélange d'anguilles jaunes et argentées) est environ 4 fois inférieures

à celle du lac Ontario et est différente chez les anguilles de l'estuaire. La concentration moyenne des PBDE dans la rivière Sud-Ouest est environ 9 fois inférieure à celle du lac Ontario. Même si les dioxines, furannes et PCB coplanaires sont présents à de faibles concentrations chez les anguilles du fleuve du Saint-Laurent, ils contribuent néanmoins de façon importante à la toxicité (Rigaud et al., 2016).

1.2 Choix du modèle biologique : l'anguille européenne et l'anguille américaine

1.2.1 L'anguille, un bio-indicateur de pollution

Sur le plan ichthyologique, l'anguille est une espèce possédant une distribution géographique étendue et occupe une grande diversité d'habitats au sein du territoire mondial (Laffaille et al., 2004). Elle est abondante et facile à capturer. Sur le plan écologique, l'anguille est considérée comme un excellent bioindicateur de l'intégrité du continuum fluvial et de la qualité des hydrosystèmes (Feunteun, 2002). Sa présence dans les cours d'eau indique en effet l'existence et l'accessibilité d'habitats diversifiés (marais, plaines d'inondation des vallées fluviales, zones amont des cours d'eau), mais également une bonne qualité physico-chimique de l'eau, l'espèce étant particulièrement sensible aux pollutions diffuses (Robinet et Feunteun, 2002). On la retrouve également dans les rivières, les lacs et les zones estuariennes. Elle est longévive, au stade adulte, elle peut vivre de 10 à 30 ans pour les femelles. Elle est benthique et se déplace sur le fond des cours d'eau et des plans d'eau et est capable de ramper sur divers substrats. Elle possède plusieurs stades de vie vulnérables impliquant des changements physiologiques complexes facilement perturbés (Robinet et Feunteun, 2002) et elle est située à un haut niveau trophique. Son régime alimentaire se compose de plusieurs espèces animales aquatiques marines ou d'eaux douces (dulçaquicoles) surtout celles vivant à proximité du fond, dans les sédiments et généralement contaminées. Elle est aussi une source alimentaire importante pour de nombreux prédateurs aquatiques et volatiles (Feunteun et Marion, 1994). Parmi eux, on retrouve des poissons (comme l'aiglefin, le requin, l'espadon), les oiseaux (comme l'orfraie, le balbuzard pêcheur, le cormoran), mais aussi des mammifères marins comme le béluga (Scott et Crossman, 1974). Particulièrement, les stades leptocéphale, civelle et anguilette ont de nombreux prédateurs, incluant les anguilles elles-mêmes aux stades anguilette et anguille jaune (Nilo et Fortin, 2001). Elle joue également un rôle important dans le fonctionnement des hydrosystèmes, plus particulièrement dans les flux de matières organiques (Laffaille et al., 2000). Toutes ces raisons font que l'anguille est une espèce sentinelle de choix.

Une des raisons les plus importantes et qui a orienté notre projet de recherche est sa capacité à accumuler de fortes concentrations en contaminants Persistants, Bioaccumulables et Toxiques (PBT) et en certains métaux. Les contaminants organiques PBT, de par leurs propriétés fortement lipophiles, se concentrent dans les tissus adipeux de l'anguille jaune. Les métaux vont s'accumuler dans différents tissus comme les branchies, les muscles, le foie et les reins. Le stade jaune est une période de croissance durant laquelle la recherche de nourriture est prépondérante. En se nourrissant, elle accumule des acides gras sous la forme de triglycérides pour constituer des réserves qui lui serviront au cours de sa longue migration de reproduction jusqu'à la Mer des Sargasses (période de jeûne). Il a été estimé que le total des lipides stockés et accumulés durant le stade jaune doit dépasser 20% du poids corporel pour couvrir les besoins de la migratoire de reproduction chez l'anguille argentée européenne (femelle) (Robinet et Feunteun, 2002). L'anguille jaune est considérée comme un excellent bio-indicateur des niveaux de contaminants présents dans son milieu de vie et reflète également leurs variations au cours d'une période de temps (Geeraerts et Belpaire, 2010).

1.2.3 Une catadromie facultative

Des recherches menées sur plusieurs espèces d'anguillidés dont l'anguille européenne et américaine ont démontré qu'une phase de croissance en milieu d'eau douce n'est pas obligatoire et que la catadromie serait facultative (Daverat et Tomás, 2006 ; Arai et Chino, 2012). Certains individus ne pénètrent jamais en milieu d'eau douce et effectuent l'intégralité de leur croissance en milieu estuarien et/ou milieu marin ou encore font des mouvements entre les milieux saumâtres et les milieux d'eau douce à une ou plusieurs reprises durant leur vie continentale. Les premières études qui ont visé à étudier ce phénomène se sont concentrées sur les espèces de zones tempérées : l'anguille européenne (Tzeng et al., 2000 ; Limburg et al., 2003 ; Daverat et Tomas, 2006), ainsi que l'anguille d'Amérique (Jessop et al., 2002 ; Morrison et Secor, 2004 ; Lamson et al., 2006 ; Thibault et al., 2007). Daverat et Tomás (2006) et Edeline et al. (2007) ont proposé l'hypothèse que certains individus chez ces espèces exploitent les habitats estuariens et côtiers en raison d'une plus grande productivité observée par rapport aux rivières et aux milieux d'eau douce adjacents. Thibault et al. (2007) montre que les mouvements de migration entre les habitats de différentes salinités se font au cours des premières années de vie continentale des anguilles entre 1 et 3 ans. Dans le cadre de notre étude, c'est un facteur pouvant influencer l'accumulation totale de contaminants chez l'anguille car en se déplaçant d'un habitat à un autre, elle peut être mise en contact avec différents types de contaminants à

plus ou moins grandes concentrations. L'étude des profils microchimiques des otolithes permet de faire un lien entre le poisson et le milieu dans lequel celui-ci réside. L'interprétation de ces profils a permis de distinguer les individus qui complètent exclusivement leur phase de croissance en milieu saumâtre, marin ou eau douce et les individus qui effectuent des mouvements entre les habitats d'eau salée et d'eau douce (Benchetrit et al., 2017).

1.3 État des connaissances sur la variabilité de la croissance chez l'anguille européenne et américaine

Chez les poissons, l'âge est estimé à partir de l'analyse de pièces calcifiées (écaille, otolithe, vertèbre...). L'otolithe, situé dans l'oreille interne, est le plus utilisé en écologie car il est métaboliquement inerte et sa croissance est continue tout au long de la vie du poisson. Chaque poisson présente 3 paires d'otolithes (*sagitta*, *lapillus* et *astericus*) et leur forme sont différentes et spécifiques à chaque espèce. Le dénombrement des couches concentriques successives présentes sur les pièces calcifiées permettent d'estimer l'âge et la croissance somatique du poisson (Brothers et al., 1976).

Dans le cas de l'anguille, les plus anciennes études de croissance ne disposaient que de l'otolithométrie comme technique d'estimation de l'âge individuelle, technique particulièrement délicate à mettre en œuvre chez cette espèce (Lecomte-Finiger, 1985 ; Vollestand, 1988). Les premiers travaux effectués chez l'anguille dans son milieu naturel ont révélé des résultats de croissance peu cohérents notamment par le manque de validation absolue de l'âge. Plus récemment, des progrès dans la précision des données acquises sur la croissance ont été effectués, notamment avec l'utilisation du marquage vital comme moyen de validation des estimations d'âge et qui permet de préciser, pour chaque spécimen marqué, la croissance absolue (Mounaix, 1992 ; Panfili et Troadec, 1993). Dans tous les cas, les études ont démontré une forte variabilité individuelle de la croissance chez l'anguille. Cette variabilité a été observée dans divers habitats (Vollestad, 1992) ou à l'intérieur d'une population dans un même habitat (Moriarty, 1983 ; Vollestad et Jonsson, 1988). Elle peut être liée à divers facteurs de type environnemental et/ou génétique (Côté et al., 2009, Côté et al., 2014, Boivin et al., 2015, Pavey et al., 2015).

Comme nous l'avons vu, ces deux espèces ont un cycle de vie commun et présentent de nombreuses ressemblances. Géographiquement opposées, elles ont cependant quelques différences de comportement et de phénotype liées à leur génétique mais aussi à leur environnement. Le taux de croissance des larves européennes est de 0,149 mm/jour, soit

environ 2/3 du taux de croissance des larves américaines (0,213 mm/jour) (Kleckner et McCleave, 1988). Le taux de croissance des femelles jaunes et argentées américaines varie de 24 à 86 mm/an par rapport à 30 à 60 mm/an pour les européennes (Jessop, 2000).

La taille et l'âge des femelles en maturation augmentent en fonction de facteurs géographiques comme la latitude et la distance à parcourir du site de croissance au site de reproduction dans la mer des Sargasses. On constate que les anguilles jaunes américaines échantillonnées dans le système du Saint Laurent ont généralement des tailles et des âges plus élevés que les européennes qui grandissent dans le système de la Gironde. Chez les mâles, la taille n'augmente pas graduellement avec l'âge. Ces derniers présentent une stratégie de croissance totalement différente de celle adoptée par les femelles. Ils minimisent la durée de la phase jaune et entreprennent leur migration vers le site de reproduction à une taille plus faible que les femelles (Oliveira, 1999). Les femelles, au contraire, maximisent leur taille (et leur fécondité) en passant plus de temps sous forme d'anguille jaune et leur taux de croissance peut alors être le double de celui mesuré chez les mâles (Oliviera, 1997). Les anguilles mâles américaines se situent à des latitudes moins élevées que les femelles et on ne retrouve essentiellement que des femelles dans le Saint-Laurent et les Grands Lacs (Jessop, 2010).

Le taux de croissance des anguilles est également influencé par des facteurs environnementaux comme la température. Celle-ci est un moteur primaire dans tous les aspects de la physiologie des ectothermes, y compris la dynamique de croissance. La croissance des anguilles américaines et européennes est plus rapide dans les tronçons d'eau plus chaude et avec de faibles densités d'anguilles (Jessop, 2010, Yokouchi et Daverat, 2013). Cependant, les températures estivales élevées n'ont pas seulement un effet positif sur la croissance de l'anguille. En effet, les environnements thermiques les plus élevés pourraient entraîner des effets négatifs sur la croissance de l'anguille notamment dans les habitats localisés proche du site de reproduction de la mer des sargasses. Dans l'étude de Yokouchi et Daverat (2013), la croissance individuelle des anguilles européennes de la Gironde a été modélisée en fonction de variations thermiques enregistrées durant plusieurs années. Les résultats ont montré des corrélations positives avec une augmentation de la température, cependant, ils ont également démontré qu'un pic de chaleur (canicule) de 32°C (température maximale moyenne en aout 2003) aurait un effet négatif sur la croissance des anguilles jaunes.

Comme en témoignent les études utilisant la microchimie des otolithes de Daverat et Tomás (2006) et de Thibault et al. (2007), à l'échelle du bassin hydrographique, les anguilles utilisent un large éventail d'habitat grâce à leur catadromie facultative. Chez l'anguille européenne et

américaine, plusieurs études ont démontré que les anguilles avec des tactiques de migration différentes ont des taux de croissance différents (dans le système de la Gironde : Daverat et Tomás, 2006 ; Daverat et al., 2012 ; Edeline et al., 2005 ; Edeline et al., 2007 et dans le système du Saint Laurent : Boivin et al., 2015 ; Cairns et al., 2009 ; Jessop et al., 2004, 2007 ; Thibault et al., 2007). Pour les deux espèces, les anguilles d'eau douce sédentaires affichent des taux de croissance plus faibles que les anguilles d'eau saumâtre sédentaires et les taux de croissance des migrantes nomades varient en fonction de la salinité de l'habitat. La salinité et la température jouent donc un rôle positif sur la croissance des anguilles jaunes et expliquent en partie les différences de taille entre les anguilles de différents habitats pour un même âge.

Les anguilles capturées en amont et en aval d'un même système hydrographique diffèrent non seulement par leur taux de croissance mais aussi par leur taille à maturité. Des relations entre la taille à maturité, l'âge à maturité, la latitude et la distance avec le site de reproduction ont été démontrées ont montrent des patrons similaires chez les anguilles argentées américaines et européennes (femelles) (Vollestad, 1992, Jessop, 2010). La taille et l'âge à maturité augmentent avec l'augmentation de la latitude et celle de la distance du site de frai. Ce qui implique une taille à maturité plus tardive et une croissance plus lente chez les anguilles des sites d'eau douce en amont (plus éloignés de la mer des Sargasses) et une taille à maturité précoce associée à une croissance rapide chez les anguilles des sites d'eau salé en aval. Au sein du système du Saint Laurent, une petite anguille et une grosse anguille peuvent avoir le même âge et être au même stade de maturité, ce que l'on ne rencontre pas forcément chez les anguilles européennes provenant du système de la Gironde dont les différences environnementales entre les habitats (surtout concernant les écarts de température) sont moins importantes (Daverat et al., 2012). Une autre particularité liée à l'axe hydrographique du Saint Laurent allant du golfe, l'estuaire jusqu'au lac Ontario est l'augmentation de la taille à maturité des femelles argentées avec l'augmentation de la longitude vers l'ouest (donc une plus grande distance du site de reproduction) que l'augmentation de la latitude vers le nord.

Bien que le taux de croissance de l'anguille soit largement plastique (Drouineau et al., 2008 ; Côté et al. 2014), les différences génétiques et/ou épigénétiques en lien avec les différents patrons de migration ou à la sélection sont de plus en plus appuyées comme étant des facteurs contribuant aux différents taux de croissance observés chez les anguilles dès leur plus jeune âge à différentes latitudes (Côté et al. 2009, Côté et al. 2014) et à différentes salinités (Edeline et al., 2007, Côté et al., 2009, Pavey et al., 2015). L'étude de laboratoire de Côté et al. (2009) a démontré que deux groupes de civelles originaires de deux rivières géographiquement distantes

(La Grande-Rivière Blanche au Québec, estuaire moyen du Saint-Laurent et la rivière Mira en Nouvelle-Écosse) et ayant des traits d'histoire de vie distinct (âge ou taille à maturité) grandissaient plus rapidement en eau saumâtre qu'en eau douce. Toutefois, lorsque les anguilles des deux rivières étaient exposées dans des mêmes conditions en eau saumâtre, celles originaires de la rivière Mira (côte Atlantique, distance du site de frai plus proche et influence d'eau saumâtre plus prononcé) grandissaient plus rapidement que celles originaires de la Grande-Rivière Blanche (côte Nord du Saint-Laurent, distance du site de frai plus grande et eau douce). Les différences phénotypiques observées en habitat naturel entre les anguilles de deux origines s'expliquent donc à la fois par la plasticité phénotypique en réponse à l'environnement et par une base génétique quantitative. Afin de vérifier la précédente étude, les anguilles de l'expérience de croissance ont été transférées dans des bassins d'eau douce pendant 27 mois de plus. Les anguilles provenant de la rivière Mira ont maintenu une croissance supérieure à celles originaire de la Grande-Rivière blanche. Ces dernières produisaient une majorité de femelles à croissance lente peu importe l'environnement initial, tandis que celles de la rivière Mira présentaient une majorité de femelles à croissance lente lorsqu'initialement exposées à l'environnement eau douce et une majorité à croissance rapide lorsqu'initialement élevées en eau saumâtre. Ces nouveaux résultats ont permis de valider que la plasticité phénotypique et une base génétique expliquent les différences phénotypiques observées.

Dans le cadre de mon étude, l'échantillonnage des anguilles jaunes européennes et américaines a été réalisé dans 4 bassins hydrographiques différents : la Gironde, le Saint-Laurent ainsi que deux tributaires de l'estuaire du Saint-Laurent. L'ensemble de ces bassins présente un gradient de salinité et de température susceptible d'avoir un effet sur la croissance des anguilles capturées selon leur positionnement le long du bassin et leur déplacement saisonnier. D'après la littérature, une plus grande variation dans les tailles à maturité et taille à l'âge est attendue dans le système du Saint Laurent plus vaste, que dans le système de la Gironde (Jessop, 2010, Vollestad, 1992, Daverat et al., 2012). Comme nous l'avons mentionné précédemment, selon la distance de l'aire de frai, les anguilles deviennent matures sexuellement à différentes tailles, caractéristiques de leur habitat de croissance. Ainsi, selon l'habitat, l'âge et la taille maximales des anguilles varient et également le temps nécessaire pour atteindre la maturité. Comme les anguilles accumulent de nombreux contaminants au cours de leur croissance, de manière générale, la concentration tissulaire totale des contaminants persistant et bioaccumulable augmentera avec la durée de la phase continentale. Ces contaminants de part leur propriété de persistance dans l'environnement vont résister aux dégradations biologiques et de part leur propriété de bioaccumulation, vont s'accumuler dans les

tissus et se transmettre à la descendance pour les œufs. Le taux de croissance de l'anguille diminue avec l'âge tandis que l'accumulation de contaminants augmente avec l'âge (Larsson et al., 1990). Cela s'explique par une dilution des contaminants dans la biomasse chez les anguilles qui grandissent rapidement et une faible et continue augmentation des contaminants chez les anguilles à croissance lente. Dans un même habitat de croissance, les anguilles à croissance lente seraient donc plus vulnérables aux effets des contaminants que les anguilles qui auraient des croissances plus rapides. Pour répondre au mieux à la question des effets des contaminants sur la santé de l'anguille dans mon étude, il était donc primordial de considérer les variations de taille à l'âge entre les anguilles originaires des différents habitats.

1.4 Choix des biomarqueurs utilisés dans l'évaluation des effets des contaminants chez l'anguille jaune

Pour évaluer l'état de santé des anguilles, nous avons choisi des biomarqueurs associés à des mécanismes enzymatiques de biotransformation et de stress oxydatif ainsi que des mécanismes liés aux dommages tissulaires qui ont été largement utilisés dans la littérature, y compris chez l'anguille (Roche et al., 2000 ; Guimarães et al., 2009, Whyte et al., 2000). Dans le cas des mécanismes enzymatiques, ces réponses subcellulaires en lien avec les stress environnementaux se produisent avant le développement des maladies, de la mortalité ou des changements de population, et peuvent donc permettre d'évaluer d'éventuels impacts de la pollution sur la santé de l'anguille de façon précoce (Depledge et Fossi, 1994). Les analyses des dommages tissulaires se produisent dans un deuxième temps lors d'une exposition chronique à des contaminants et révèlent un dommage plus intense qui n'est pas toujours réversible. Les enzymes de biotransformation, de stress oxydatif, et les mesures des dommages tissulaires chez l'anguille, seuls ou combinés, sont des biomarqueurs utiles considérés comme prédictifs d'altérations à la santé de l'anguille menant à des altérations de croissance, de reproduction et de survie. En résumé, les principaux biomarqueurs qui ont été retenus pour répondre aux deux chapitres de ma thèse sur l'impact des contaminants, sont présentés ci-dessous :

- La mesure de l'activité enzymatique de l'éthoxyrésorufine-O-dééthylase (EROD) dans le foie
- La mesure des activités de deux enzymes antioxydantes, la catalase (CAT) et la superoxyde dismutase (SOD) dans le foie
- La mesure de la densité et de la surface des centres mélanomacrophages (CMM) dans la rate

- La mesure des dépôts pigmentaires de lipofuscine et d'hémosidérine dans les CMM de la rate

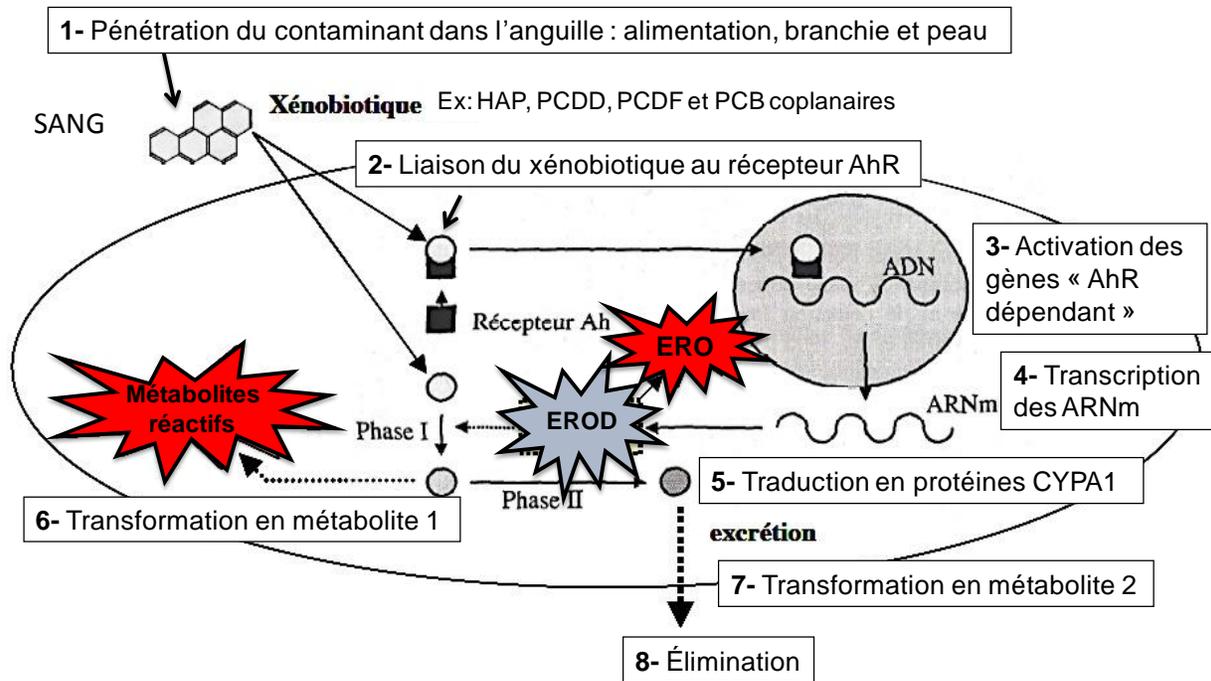
1.4.1 Les enzymes de biotransformation et antioxydantes dans le foie de l'anguille

Chez le poisson, la cellule contient une certaine quantité d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) qui est en équilibre avec le complexe enzymatique de détoxification des ERO. Les ERO peuvent être ou non des radicaux. Les trois plus connues sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}). Le stress oxydant chez le poisson correspond à une augmentation des concentrations initiales d'ERO (de manière transitoire ou chronique), à la perturbation du métabolisme cellulaire et sa régulation ainsi que des dommages au niveau de ces constituants. Plusieurs mécanismes sont à l'origine de la production d'ERO chez les poissons. Ceux retenus sont les sous-produits du métabolisme de l'oxygène, le système mitochondrial, les métaux et le catabolisme des produits chimiques cellulaires et étrangers par les cytochromes P450. Ce dernier mécanisme comprend des étapes d'oxydoréduction et est responsable de la production d'ERO dans le réticulum endoplasmique (Lushchak, 2011). Chez les poissons, il s'agit des enzymes de biotransformation qui sont des biomarqueurs sensibles et spécifiques en réponse aux composés apparentés aux dioxines tel que les polychlorodibenzo-p-dioxines (PBDD), les polychlorodibenzofuranne (PBDF), les polychlorobiphényles de type dioxine (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Van der Oost, 2003). Un grand nombre d'expériences en laboratoire et sur le terrain ont examiné l'induction de ces enzymes dans plus de 150 espèces de poisson dont l'anguille et ont démontré une fiabilité dans leur utilisation comme indicateurs d'exposition aux agents chimiques (Whyte et al., 2000). Ce type de biomarqueur est mesuré dans le foie de l'anguille.

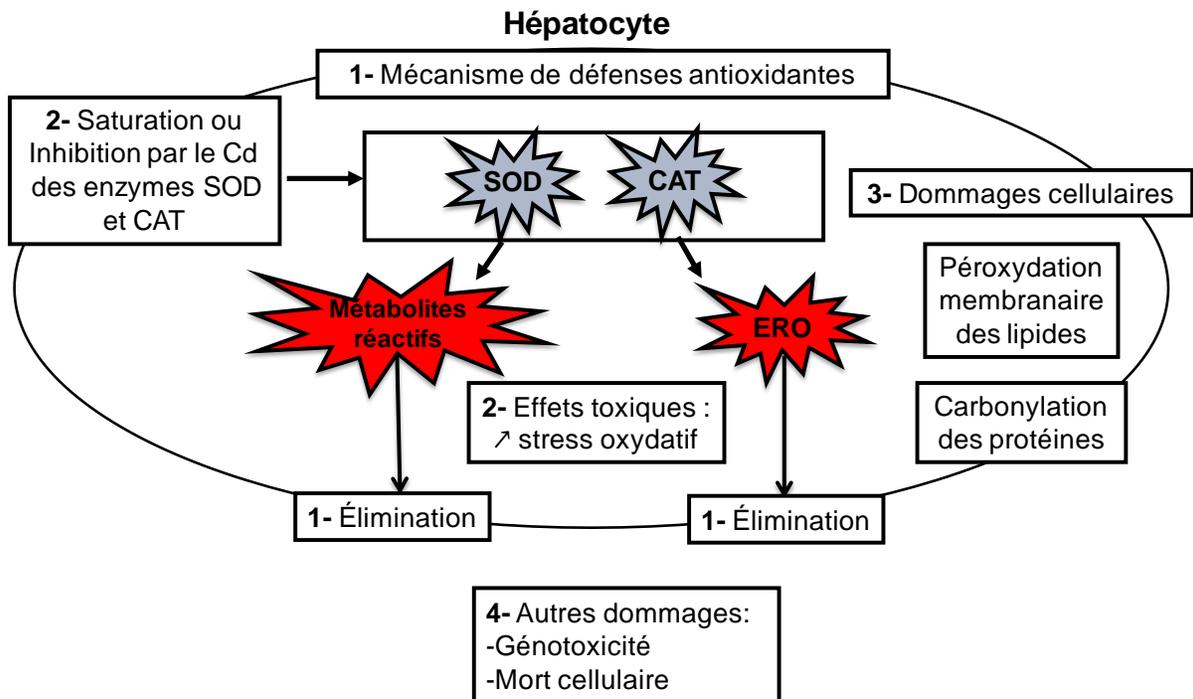
En présence d'hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés (HAPH) particuliers ou à des composés apparentés aux dioxines dans l'hépatocyte des poissons, l'induction du récepteur des monooxygénases dépendantes du cytochrome p450A1 (plus spécifiquement, la sous-famille CYP1A1) est initiée par la liaison du xénobiotique au récepteur spécifique aux hydrocarbures aromatiques ou récepteur AhR dans le cytosol de l'hépatocyte (Figure 1.3, 1- et 2-). Le cytochrome P450A1 ou CYP1A1 est une super famille d'enzymes qui a été classée par Nelson et al. (1996). Les xénobiotiques catégorisés comme fortement inducteurs du CYP1A1 mis en évidence chez le poisson et incluant l'anguille sont les HAP, les PCDD, les PCDF et les PCB coplanaires ou de type dioxine (Van der Oost, 1996 ; Whyte et al., 2000). La translocation du

complexe xénobiotique-AhR dans le noyau de l'hépatocyte active l'expression d'une série de gènes qui ont une séquence dans le promoteur qui est reconnu par le facteur « AhR dépendant » (3-) puis effectue leur transcription en plusieurs ARNm (4-) et enfin leur traduction en plusieurs protéines incluant les protéines enzymatiques CYP1A1 (5-). Une fois synthétisées, les enzymes hépatiques d'EROD et la glutathion-S-tranférase (GST) participent à la transformation des xénobiotiques lipophiles en métabolites plus hydrosolubles que la molécule initiale (phase I, 6-) puis en dérivés conjugués (phase II, 7-) afin de faciliter leur élimination (8-) (Whyte et al, 2000).

Cependant, l'exposition à de grandes quantités de ces produits réactifs peut engendrer une saturation de la production d'enzymes de biotransformation EROD ou une inhibition de son induction pour conduire à la formation de métabolites réactifs et d'ERO en grande quantité et provoquer des effets toxiques marqués dans la cellule. Afin de se protéger, la cellule possède des enzymes antioxydantes comme la SOD qui est une métalloprotéine avec une activité enzymatique qui va catalyser la dismutation d'un superoxyde en produisant de l'eau oxygénée (H_2O_2) et la CAT qui catalyse après la réaction de la SOD, la dismutation de l'eau oxygénée (H_2O_2) en oxygène (O_2) (figure 1.5, 1-). Ces enzymes spécialement adaptées pour éliminer les ERO sont utilisées comme biomarqueurs d'exposition à des multiples catégories de contaminants et répondent également à des facteurs environnementaux et leur mode de fonctionnement est sensiblement relié aux enzymes de biotransformation (Martinez-Alvarez et al., 2005). Lorsque la quantité de métabolites toxiques est trop élevée et que les fonctions antioxydantes de la cellule ne sont plus assez efficaces pour les éliminer ou sont affectées par des contaminants de type métalliques tel que le Cd, des dommages cellulaires surviennent comme la peroxydation des lipides membranaires, la carbonylation des protéines pouvant entraîner la formation de lésions tissulaires ainsi que des lésions au niveau du génome (2-, 3- et 4-).



A)



B)

Figure 1.3: Schéma général qui décrit A) la première phase de biotransformation d'un xénobiotique organique via le complexe enzymatique de biotransformation (EROD) et B) la deuxième phase d'élimination des espèces réactives de l'oxygène (ERO) via les enzymes antioxydantes (SOD et CAT) ainsi que les effets toxiques et dommages cellulaires à long terme dans un hépatocyte chez l'anguille (D'après Monod, 1997 et adaptée par G. Patey).

Comme mentionné précédemment, le Cd est capable d'induire l'apparition des espèces réactives de l'oxygène (ERO) par plusieurs mécanismes indirects (Sevcikova et al., 2011). Le Cd induit une protéine riche en cystéine (Cys) appelée métallothionéine (MT). Étant donné que les MT sont riches en cystéine et que les métaux ont une forte affinité pour les thiols, les MT sont connues pour séquestrer les métaux (Hamilton et Mehrle, 1986). Par conséquent, le Cd est stocké sous la forme d'un complexe Cd-MT dans le foie. Ce complexe Cd-MT est transféré du foie vers les reins au fil du temps, puis il est filtré et réabsorbé par les tubules proximaux rénaux. Si la synthèse de MT ne peut pas répondre à la demande accrue pour séquestrer le Cd et que la MT non lié au Cd est affectée à d'autres systèmes de défense, la toxicité du Cd s'ensuit. Plusieurs études indiquent que le Cd modifie les niveaux de glutathion (GSH). Le GSH est un tripeptide naturel constitué de 3 acides aminés (la glycine, le glutamate et la cystéine) connu pour protéger les cellules contre le stress oxydatif. Toute altération des niveaux de GSH (soit une diminution ou une augmentation) indique un état oxydatif perturbé dans la cellule. À mesure que le stress oxydatif se poursuit, la synthèse de GSH ne peut pas fournir efficacement la demande. Par conséquent, l'épuisement du GSH se produit. Le cadmium affecte également les enzymes antioxydantes, en particulier la SOD et la CAT, et peut déplacer le cuivre et le fer dans diverses protéines, libérant ces métaux pour ensuite participer à la réaction de Fenton qui joue un rôle majeur dans le stress oxydatif (Ercal et al., 2001). Ces mécanismes indiquent que le Cd provoque un stress oxydatif en remettant en question le statut thiol et en altérant les molécules antioxydantes des cellules hépatiques. Par la suite, les ERO vont engendrer une situation de stress oxydant dans la cellule et donc des dommages oxydatifs au niveau des macromolécules biologiques (peroxydation lipidique, lésions de l'ADN, modifications oxydatives des protéines). L'ensemble de ces mécanismes est résumé dans le schéma ci-dessous (Fig. 1.4).

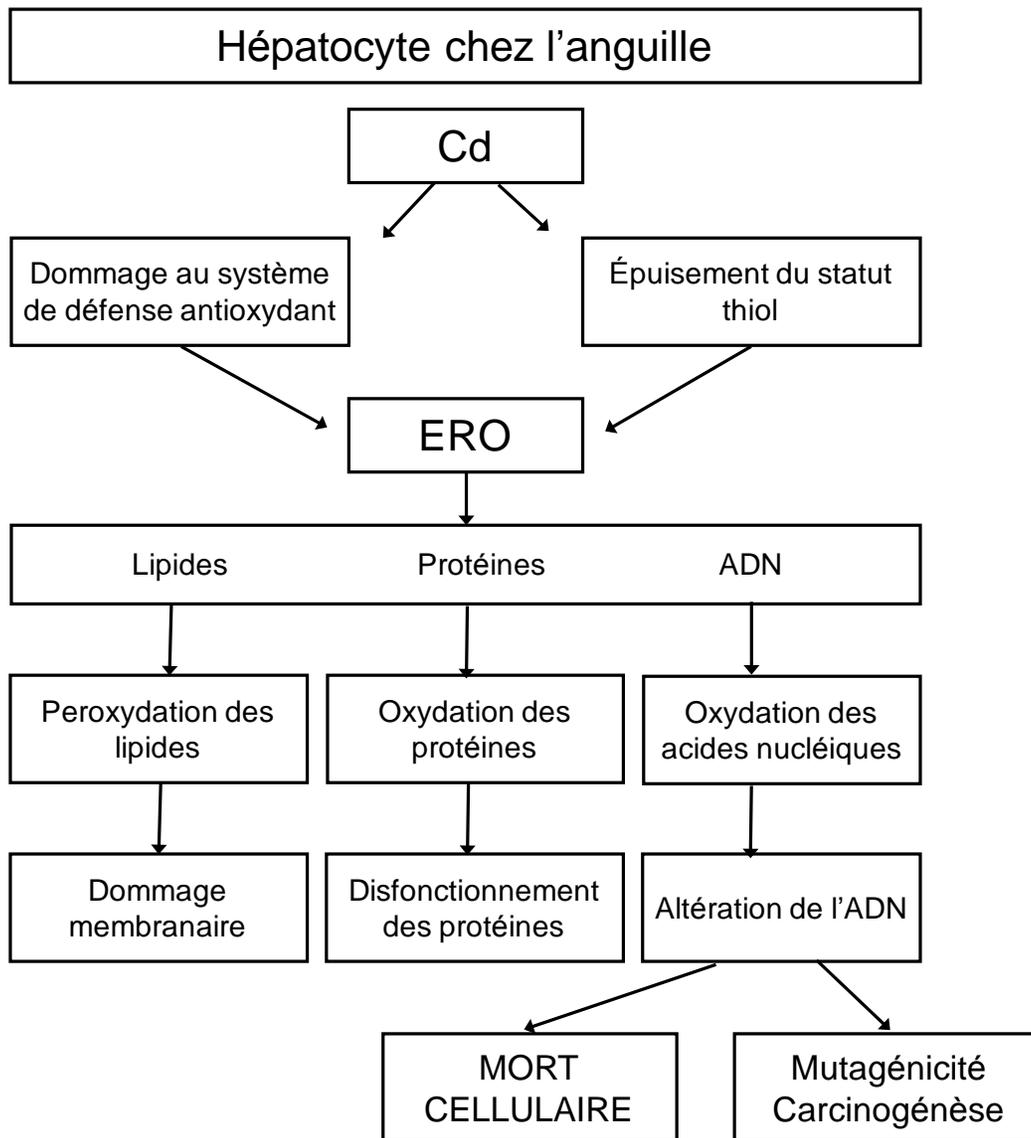


Figure 1.4 : Mécanisme d'induction du stress oxydant par le Cd (d'après Ercal et al. 2001 et traduit par G. Patey)

De façon générale, les études de laboratoire et de terrain démontrent un lien entre la contamination et la réponse des biomarqueurs sélectionnés tel que l'activité d'EROD et les enzymes antioxydantes. Cependant, une variabilité non négligeable dans les réponses a été soulevée dans plusieurs autres études et notamment sur le terrain suggérant l'influence d'autres facteurs confondants. Ces facteurs peuvent être de plusieurs sortes, environnementales et/ou biologiques. En considérant ceci, il est davantage recommandé d'utiliser plusieurs biomarqueurs

non spécifiques d'un contaminant ayant une réponse en lien avec une contamination chronique comme c'est le cas avec les biomarqueurs histopathologiques.

1.4.2 Les biomarqueurs histopathologiques dans la rate de l'anguille

Les dommages cellulaires liés au stress oxydant entraînent l'apparition de dommages tissulaires à plus long terme. Ils peuvent nuire à la croissance et mener à une diminution de la résistance immunitaire, à des problèmes de reproduction, à de l'embryotoxicité, de la neurotoxicité et parfois à des maladies graves comme des maladies infectieuses ou des cancers allant jusqu'à la mort de l'anguille (Palstra et al., 2006 ; Iwanowicz et al., 2009). L'utilisation de biomarqueurs histopathologiques est un outil pertinent pour évaluer la sévérité de ces dommages et les conséquences importantes sur la santé du poisson. Ces biomarqueurs ont des réponses à plus long terme que les biomarqueurs moléculaires et sont non spécifiques d'un contaminant, mais peuvent avoir un impact sur le fonctionnement des organes, la santé et la survie (Van der Oost, 2003). Les agrégats de macrophages également connus sous le nom de centres mélanomacrophages (CMM) sont des groupements de macrophages (cellules du système immunitaire). Ces agrégats sont le plus souvent présents chez les poissons dans la rate, le pronéphros, le mésonéphros, et le foie mais se retrouvent aussi dans d'autres organes particulièrement lors d'une inflammation. La rate a été choisie comme tissu de choix pour l'examen des impacts des contaminants sur les biomarqueurs histopathologiques chez les poissons (Au, 2004). Les CMM constitués de cellules du système immunitaire interviennent dans les processus physiologiques normaux pour la défense de l'organisme ou contre les agents nuisibles (bactérie, virus, parasites) (Wolke, 1992 ; Agius and Robert, 2003).

Les fonctions des CMM sont multiples, complexes et pas encore totalement élucidées. Elles peuvent être classifiées comme :

- a) Immunitaires, y compris humorales et inflammatoires ;
- b) Stockage, destruction, ou détoxification de substances exogènes et endogènes ;
- c) Recyclage de fer

L'activité des macrophages est l'un des premiers indicateurs de stress. Leur détection nous renseigne rapidement sur l'état de stress d'une population de poissons avant même que les signes d'une maladie ne se manifestent. L'hyperplasie des CMM dans la rate a été observée chez plusieurs espèces de poissons (par exemple la plie rouge, la sole anglaise, la truite arc-en-ciel) habitant des zones contaminées avec des concentrations élevées de xénobiotiques (Murchelano et Wolke, 1991) et exposées à des effluents de pâtes et papiers (Woodworth et al.,

1998). Une relation de dose-réponse a été validée entre des niveaux de concentration de benzo(a)pyrène (HAP) présents dans les sédiments de surface de huit baies urbaines en Angleterre et le nombre de CMM de la rate pour la plie rouge (Hinton et al., 1992).

Les CMM des poissons contiennent trois pigments : l'hémosidérine (un produit de la dégradation des érythrocytes) la lipofuscine (produit de l'oxydation des lipides insaturés) et la mélanine (pigment endogène produit à partir de l'acide aminé, la tyrosine). Ces trois types de pigments peuvent être présents dans un seul et même macrophage (Agius, 1985). Chez les poissons sains et malades, seulement les CMM présents dans la rate sont impliqués dans le traitement de l'hémosidérine (Agius, 1979). La quantité d'hémosidérine dans la rate n'est généralement pas élevée. Des accumulations excessives dans la rate ou dans d'autres organes sont reconnues comme étant de l'hémosidérose et reflètent un processus pathologique (Wolke, 1992). L'hémosidérose est une conséquence d'une augmentation du taux de destruction d'érythrocytes. Certains contaminants présents dans l'eau ont été associés à cette pathologie en raccourcissant la longévité de globules rouges (Van de Graaff, 1985). La lipofuscine est formée à partir de la polymérisation oxydative d'acides gras polyinsaturés et des protéines qui peut être augmentée lors d'un stress oxydant (Agius et Robert, 2003).

Les CMM sont reconnus comme biomarqueurs anatomiques et cytologiques, car ils changent de nombre, de taille et de contenu pigmentaire en fonction de l'état de santé des poissons (infections causées par des parasites, bactéries et virus), de la pollution anthropique (contaminants organiques et inorganiques), des critères biologiques du poisson (l'âge, l'amaigrissement, le stade sexuel, le déséquilibre nutritionnel) et des facteurs naturels (chaleur). Cependant, ils demeurent des biomarqueurs de santé non spécifiques pouvant être influencés par de nombreux autres facteurs physiologiques et environnementaux et leur réponse doit être interprétée à l'aide d'autres bioindicateurs. En présence de contaminants, les principales réponses observées dans les tissus sont une augmentation de la densité et de la surface des CMM, une augmentation de la dégradation des érythrocytes et donc des dépôts d'hémosidérine et une augmentation des dépôts de lipofuscine.

1.5 Influence des contaminants, des facteurs biologiques et environnementaux sur les réponses des biomarqueurs chez l'anguille

À partir d'études scientifiques déjà réalisées chez l'anguille, deux tableaux de synthèse ont été élaborés pour illustrer les influences de ces différents facteurs sur les réponses des biomarqueurs biomoléculaires (ANNEXE I-1) et histopathologiques (ANNEXE I-2) présentés dans l'annexe 1. Pour ce faire, nous avons sélectionné les contaminants, facteurs biologiques et environnementaux communs aux deux hydrosystèmes étudiés chez l'anguille. Lorsque peu ou pas d'études ont été réalisées chez l'anguille, nous avons considéré les informations apportées par les revues de littérature et les études sur le poisson en général. Dans cette partie, nous résumons les principaux effets observés sur les biomarqueurs détaillés dans les tableaux.

Les études de toxicité des contaminants chez l'anguille réalisées tant sur le terrain qu'en laboratoire ont montré que certaines catégories de contaminants, tels que les HAP, les PCB coplanaires, les PCDD/PCDF et certains effluents de pâtes et papiers (BKME) entraînent de très forte augmentation de l'activité hépatique d'EROD (ANNEXE I-1). L'induction d'EROD a été validée comme biomarqueur et est utilisée dans des programmes internationaux d'évaluation des risques environnementaux en supposant que toutes les variables potentielles susceptibles d'affecter ce paramètre soient prise en compte (Whyte et al., 2000 ; Van der Oost et al., 2003). Concernant les métaux, cette classe de contaminants n'a pas les caractéristiques requises pour se lier au récepteur AhR. Généralement, les observations de l'induction d'EROD chez les poissons exposés aux métaux ont lieu dans des études dont l'objectif était d'examiner comment les interactions entre les métaux et les composés organiques influencent l'induction du cytochrome CYP1A (Lemaire-Gony et al., 1992). Cependant, une étude expérimentale réalisée chez l'anguille a montré que les individus exposés à des concentrations toxiques de Cu séparément exprimaient des activités d'EROD élevées comparativement aux contrôles (Gravato et al., 2006). Une étude de terrain a également mis en évidence que le mélange Zn, Cr et Cu induisait chez l'anguille une inhibition de l'activité d'EROD (Pacheco et Santos, 2001). Tous ces composés chimiques (organiques et inorganiques) sont aussi capables d'inhiber l'activité d'EROD à des concentrations élevées et lors de mélanges complexes de contaminants ce qui créent une compétition entre les composés chimiques et le biomarqueur.

Les réponses de la CAT et de la SOD aux contaminants organiques sont variables et ne sont pas encore considérées comme des biomarqueurs fiables pour être utilisés dans des programmes d'évaluation des risques environnementaux car les réponses observées en laboratoire ont rarement été vérifiées dans des études sur le terrain (Van der Oost et al., 2003). Cependant, ils apportent des informations supplémentaires sur le déséquilibre des étapes

d'oxydo-réduction et sur la production de ERO dans la cellule hépatique. Ils sont également étroitement liés à l'activité d'EROD et aux dommages oxydatifs. Leurs activités varient et peuvent être inhibées en présence d'HAP de type anthracène et de benzo(a)anthracène dans la bile et de chrysène, de benzo(a)pyrène et de lindane dans le foie chez l'anguille européenne (Buet et al., 2006). À l'inverse d'EROD, les métaux interagissent davantage avec les enzymes antioxydantes, pouvant modifier leur activité. Le Cd, le Cu et le Hg sont des inducteurs des activités de SOD et de CAT. Les facteurs environnementaux tel que la température et la salinité ont également un effet sur les formations des ERO et les activités des enzymes de biotransformation et antioxydantes. L'augmentation de la température active les enzymes de biotransformation tandis qu'elle n'a pas démontré d'effet clair sur les enzymes antioxydantes dans les études de laboratoire. Les anguilles des habitats d'eau saumâtre ou marine pourraient avoir des activités d'enzymes antioxydantes supérieures à celles des habitats d'eau douce en partie en lien avec la salinité. Cependant, il n'y a pas encore d'effet de la salinité sur l'activité d'EROD de clairement démontré. Enfin les anguilles affaiblies par le manque de nourriture ou ayant subi une malnutrition auront des activités d'EROD et antioxydantes plus élevées que celles en bonne condition physiologique et physique.

Un nombre plus restreint d'études ont rapporté les effets d'une exposition chronique aux contaminants sur les dommages histopathologiques de la rate chez l'anguille. Les expositions chroniques en milieu naturel aux HAP, lindane, dieldrine et les mélanges de PCB ont entraîné des lésions tissulaires ainsi qu'une augmentation du nombre et de la taille des CMM dans la rate des anguilles (Ribeiro et al., 2005 ; Roche et al., 2002 ; Pacheco et Santos, 2002). Il a été également rapporté que chez le poisson, les effluents de pâtes et papiers (BKME) associés ou non à une maladie infectieuse entraînent d'importantes lésions histopathologiques (Couillard et al., 1996 et 1999). L'exposition à des concentrations toxiques en métaux est responsable d'une augmentation des surfaces des CMM (Roche et al., 2002 ; Kerambrun et al., 2012). Des études de terrain ont démontré que les teneurs en pigments dans les CMM varient entre les poissons des sites propres et contaminés. Le critère le plus couramment utilisé est l'hémossidérose avec l'augmentation d'hémossidérine chez l'anguille européenne dans des zones contaminées tel que la lagune d'Aveiro sur la côte ouest portugaise (Santos et Hall, 1990 ; Pacheco et Santos, 2002). Les effets de la malnutrition ont été étudiés plus soigneusement dans la rate et le rein de plusieurs espèces de poisson et il apparaît que la dégradation catabolique des tissus est un facteur important contribuant à une augmentation de la densité des CMM. Dans ce cas, une augmentation des dépôts de mélanine et de lipofuscine dans les CMM a été également relevé

(mais pas d'hémosidérine). Le stress dû à la chaleur semble également responsable de l'augmentation de la densité des CMM. Enfin, aucun effet direct de la salinité sur les biomarqueurs histopathologiques de la rate des poissons a été observé. Cependant, l'augmentation de la salinité joue un rôle direct sur la croissance, le type de nourriture et le métabolisme de l'anguille. En considérant que ces modifications biologiques influencent les réponses des biomarqueurs histopathologiques, la salinité pourrait être un facteur indirect à l'augmentation en nombre et taille des CMM ainsi que l'accumulation pigmentaire.

1.6 Schéma de synthèse des relations proposées entre les différents facteurs et les réponses des biomarqueurs chez l'anguille jaune

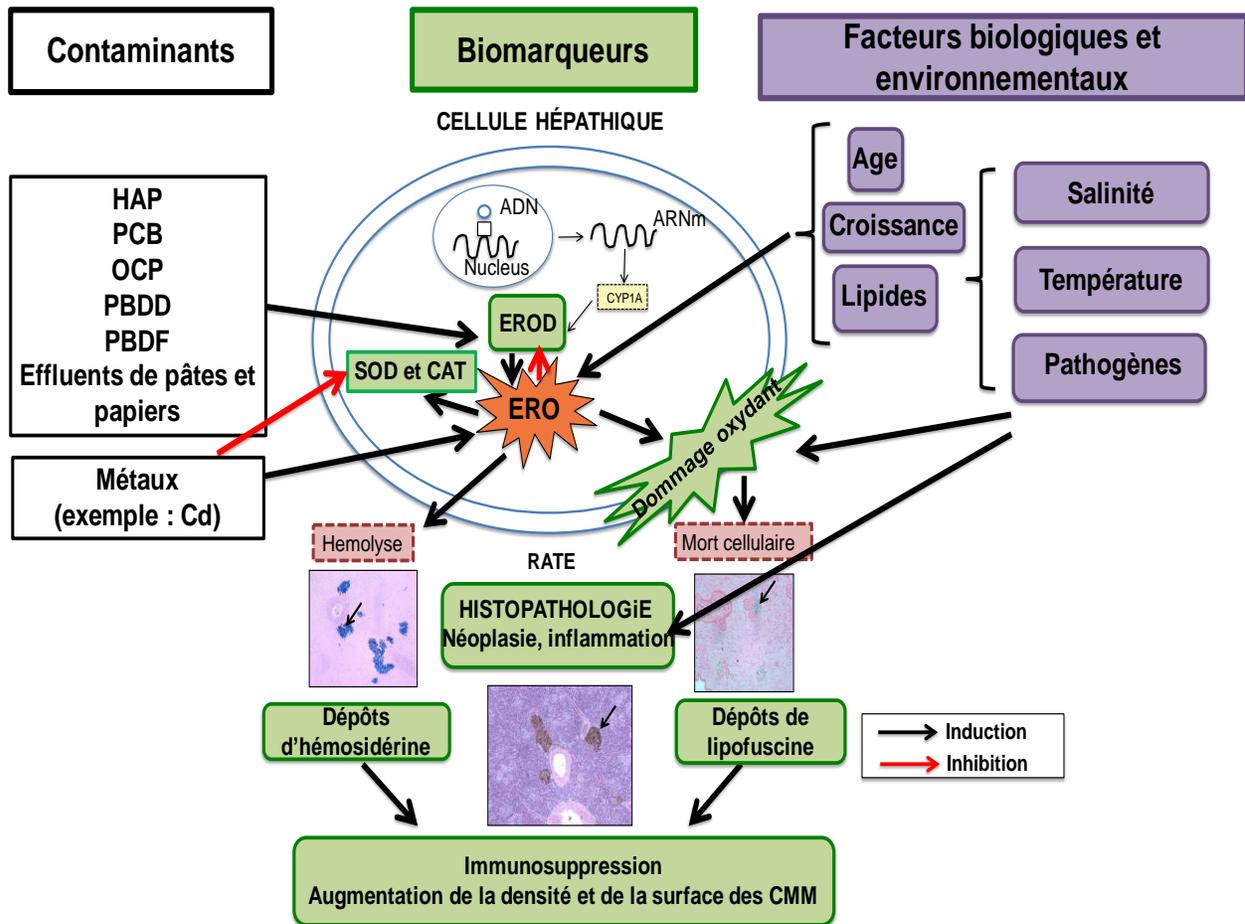


Figure 1.5: Relations proposées entre les contaminants, les facteurs environnementaux, biologiques et les réponses des biomarqueurs chez l'anguille jaune

2. INTÉRÊT DE L'ÉTUDE ET OBJECTIFS DE RECHERCHE

2.1 L'intérêt de l'étude

Le projet de recherche dont fait partie ma thèse comprend 3 principaux volets afin d'évaluer l'influence des contaminants sur :

- a- La diversité génétique
- b- La croissance et la santé de l'anguille au stade jaune
- c- Le potentiel reproducteur de l'anguille au stade argenté

Mes travaux intègrent le volet **b-** qui consiste à comprendre l'influence de la contamination de l'habitat où s'effectue la croissance de l'anguille sur l'accumulation d'énergie, les capacités métaboliques, la croissance et les dommages cellulaires et tissulaires. Plus précisément, ils portent sur les relations susceptibles d'exister entre la contamination, les facteurs environnementaux et biologiques et les activités de biotransformation, le stress oxydant, ainsi que les conséquences au niveau subcellulaire (histopathologie) chez les anguilles jaunes européennes et américaines. Un étudiant à la maîtrise, Antoine Caron, s'est intéressé davantage à la partie sur la relation entre la contamination, les réserves énergétiques et les capacités métaboliques. Concernant le volet **a-** les travaux de thèse de l'étudiante (Lucie Baillon) ont porté sur l'identification de marqueurs polymorphes de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) se retrouvant dans des gènes de fonction connue et dont les fréquences alléliques diffèrent entre sites contaminés et non contaminés. Les résultats ont permis également la construction d'une puce à ADN. Pour le volet **c-**, une étudiante au doctorat (Audrey Moffett) s'intéresse aux effets de la remobilisation des contaminants sur les capacités de migration (métabolisme, nage, condition), de maturation sexuelle (changements hormonaux et histologiques) et de reproduction (contamination, atrésie ovocytaire) chez les anguilles argentées. Ma démarche est d'explorer les mécanismes et la variabilité des réponses liées aux enzymes de biotransformation et antioxydantes dans la cellule hépatique en tenant compte des propriétés biologiques et environnementales des anguilles (âge, croissance, condition physique, site de prélèvement et espèce). L'observation et l'analyse des tissus de la rate m'ont permis d'identifier d'éventuels dommages au niveau cellulaire et subcellulaire pouvant être un signal pour de futures pathologies au niveau de l'individu et d'établir des liens avec les dommages oxydants, les propriétés biologiques du poisson et/ou les contaminants.

2.2 L'objectif général

Il s'agit d'une étude spatiale, comparative, de terrain et de laboratoire sur le stade de croissance de l'anguille (stade jaune) avec des expositions à des contaminants et des facteurs environnementaux. L'objectif général de ma thèse est d'examiner l'impact des contaminants sur l'état de santé de deux espèces d'anguille Atlantique en utilisant des biomarqueurs liés aux réactions de biotransformation, au stress oxydant et aux lésions tissulaires.

2.3 Objectifs des chapitres

Chapitre 1 : variations de la croissance chez les anguilles jaunes échantillonnées le long des systèmes hydrographiques de la Gironde et du Saint-Laurent.

Objectif 1 : À l'aide de rétro-calculs de la taille à un jeune âge (de 1 à 5 ans) et en tenant compte de la variabilité interindividuelle et de l'effet de cohorte, comparer les patrons de taille à l'âge des anguilles américaines ou européennes échantillonnées à différents habitats (salinité, latitude / distance de frayères, température) dans les deux hydro systèmes.

Objectif 2 : Vérifier la compatibilité avec le paradigme actuel des croissances plus rapides des jeunes anguilles grandissant dans des habitats en eau saumâtre/marine et/ou moins éloignés de la zone de frai de la mer des Sargasses.

Objectif 3 : Comparer les tailles rétro calculées à un jeune âge chez les anguilles américaines et celle chez les anguilles européennes avec les données historiques publiées sur la croissance des jeunes anguilles originaires des habitats des systèmes du Saint-Laurent et de la Gironde.

Chapitre 2 : impact de la contamination sur les réponses de biomarqueurs chez l'anguille jaune américaine et européenne en milieu naturel

Objectif 1 : Comparer les réponses de l'induction hépatique d'EROD, des capacités antioxydantes et les effets des dommages tissulaires entre les sites et les années d'échantillonnage au sein d'une même espèce et entre les deux espèces.

Objectif 2 : Étudier les relations entre les réponses des biomarqueurs, les concentrations tissulaires de contaminants (organiques et métalliques) et les facteurs biologiques ((la taille, le poids, l'âge et le contenu lipidique) pour chaque espèce échantillonnée dans différents sites et les deux années combinées.

Chapitre 3 : associations entre l'exposition au Cd et aux PCB à différentes concentrations, à la sous-alimentation et à la salinité sur l'activité d'EROD et les réponses histopathologiques de la rate chez l'anguille européenne

Objectif 1 : Étudier les influences des facteurs biologiques (la taille, le poids, le facteur de condition, le contenu lipidique et l'indice hépato-somatique) sur les réponses des biomarqueurs de biotransformation (EROD), de la densité et la surface des CMM ainsi que des dépôts pigmentaires d'hémosidérine et de lipofuscine chez les anguilles exposées.

Objectif 2 : Étudier les effets de l'exposition à la sous-alimentation et à l'exposition à la salinité sur les réponses des biomarqueurs

Objectif 3 : Mettre en évidence les possibles relations dose-effet entre les concentrations musculaires en PCB et les réponses des biomarqueurs.

Objectif 4 : Mettre en évidence les possibles relations dose-effet entre les concentrations hépatiques en Cd et les réponses des biomarqueurs.

2.4 L'originalité

Très peu de publications, de rapports ou de thèses discutent de ces deux espèces (*A. rostrata* et *A. anguilla*) ensemble et les comparent. Les principales études scientifiques retrouvées dans la littérature portent principalement sur l'anguille européenne. Depuis les années 80, de plus en plus s'intéressent à l'anguille américaine mais très peu comparent les deux espèces ensemble. L'objectif de mon projet est donc une nouvelle approche en soi car il compare en parallèle les réponses de l'anguille américaine et européenne dans des habitats présentant des gradients de contamination et écologiques très différents. Afin de mieux identifier les facteurs freinant le rétablissement des anguilles et d'éviter toutes erreurs concernant leur part de responsabilité, il est important de comparer les résultats issus des deux espèces. Les analyser et les comparer simultanément apportera des nouvelles connaissances sur l'anguille Atlantique et nous évitera de commettre certaines erreurs.

Un des plus grands défis aujourd'hui en écotoxicologie est de comprendre les effets de la toxicité d'un mélange de contaminants, communément appelés « l'effet cocktail » chez les animaux sauvages. Les réponses des biomarqueurs d'exposition dans les poissons sont couramment utilisées pour évaluer l'exposition des produits chimiques issue de l'Homme dans l'environnement aquatique. Toutefois, on en sait peu sur la façon dont l'effet cocktail affecte les réponses des biomarqueurs. Pour cette raison, il y a un risque évident d'une mauvaise

interprétation des données sur les biomarqueurs, et cela peut avoir des effets négatifs considérables sur les décisions et les actions entreprises pour réduire l'exposition à certains produits chimiques chez les populations de poissons en disparition et également pour leur restauration. Par ailleurs, les niveaux de sécurité chimique sont traditionnellement basés sur les expériences de laboratoire testant les effets des produits chimiques individuels, ce qui constitue une limite car un produit chimique peut parfois être plus toxique quand il est mélangé avec d'autres produits chimiques (Van der Oost et al., 2003). Les effets des composés n'agissant pas sur un même mécanisme (ex liaison avec récepteur AhR) peuvent être additifs et certains autres composés interagissent de façon synergiques ou au contraire antagonistes. De plus, les facteurs environnementaux tels que la température et la salinité et les facteurs en lien avec la biologie du poisson comme l'âge, la croissance et sa condition physique peuvent également avoir une influence sur les réponses des biomarqueurs.

Un autre aspect original de cette thèse a été l'étude des variations de croissance à un jeune âge entre les différents groupes d'anguilles échantillonnées dans les différents sites des deux hydrosystèmes. Chez l'anguille, une grande variabilité de la taille à l'âge donné est observée pour une population et des recouvrements de taille importants entre les diverses classes d'âge existent pour les deux espèces (Nilo et Fortin, 2001). La grande diversité des habitats occupés par l'anguille, tout comme la productivité du milieu (alimentation), la densité d'anguille (compétition), la température, la salinité et la distance séparant l'habitat de la zone de frai sont des facteurs pouvant contribuer à la variabilité de la croissance. Dans notre étude, il est clair que ces facteurs diffèrent d'un site à l'autre et d'un hydro-système à l'autre et pourraient avoir une influence sur la croissance des anguilles échantillonnées. C'est pour cela qu'il nous paraît indispensable de considérer ces différences écophysiologiques qui pourraient notamment affecter leur potentiel à bioaccumuler des contaminants et sur leur capacité à répondre aux stress (biomarqueurs).

3. MATERIEL ET METHODES COMMUN AU PROJET

3.1 Échantillonnage sur le terrain

3.1.1 Capture des anguilles jaunes américaines

Les campagnes d'échantillonnage des anguilles américaines se sont déroulées au printemps 2011 et 2012 et cela en parallèle avec celles de la France dans le but notamment de limiter un effet de la saison sur la physiologie des poissons et sur la pollution (Alberto et al. 2001). Les captures d'anguilles ont eu lieu dans deux sites de référence situés dans le nord-est du Québec (Canada) : la rivière Sud-Ouest (RSO) et la rivière Saint-Jean (RSJ) (deux tributaires et bassins hydrographiques de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent par des collaborateurs du Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (MFFP) et deux sites contaminés, le lac Saint François (LSF) et le lac Saint Pierre (LSP) (deux lacs du bassin hydrographique du fleuve Saint-Laurent). Les anguilles originaires des lacs ont été échantillonnées par le personnel d'Ontario Power Generation (OPG) près de leurs barrages et turbines hydroélectriques et par des pêcheurs commerciaux. Les tributaires sont alimentés en amont en eau douce et en aval en eau saumâtre par la remontée des eaux salines de l'estuaire et du golfe tandis que les lacs sont constitués uniquement d'eau douce. À chaque site, 15 anguilles jaunes ont été pêchées et disséquées sur place soit un total de 60 anguilles jaunes par an pour le Québec. Les zones d'étude et les sites d'échantillonnage des anguilles jaunes capturées au Québec sont présentés dans la figure 3.1 ci-dessous. Par ailleurs, la carte et les informations sur la localisation des sites ainsi que leurs propriétés sont détaillées dans l'article 1 du chapitre 1 (Figure 1 a et tableau 1).



Figure 3.1 : Carte de localisation des sites de pêche des anguilles jaunes au Québec

3.1.2 Capture des anguilles jaunes européennes

Les campagnes d'échantillonnage des anguilles européennes se sont réalisées au printemps 2011 et 2012. Les captures ont eu lieu à trois sites répartis de manière stratifiée, allant du moins contaminé vers le plus contaminé et de la zone fluviale vers l'estuaire : le fleuve Dordogne (en eau douce), le fleuve Garonne (en eau douce) et l'estuaire de la Gironde (en eau saumâtre) à laquelle est ajouté le domaine de Certes (en eau saumâtre à marine) pris comme référence en raison de son faible niveau de contamination localisé au niveau du bassin d'Arcachon. L'échantillonnage a été effectué par des pêcheurs commerciaux ou à l'aide de dispositifs expérimentaux appartenant à l'Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA). Le même nombre d'anguilles jaunes (15) par site ont été pêchées et disséquées sur place soit un total de 60 par an pour la France. Les zones d'étude et les sites d'échantillonnage des anguilles jaunes capturées en France sont présentés dans la figure 3.2 ci-dessous. La carte et les informations sur la localisation et les propriétés physicochimiques des sites ont été détaillées dans l'article 1 du chapitre 1 (Figure 1 b et tableau 1).

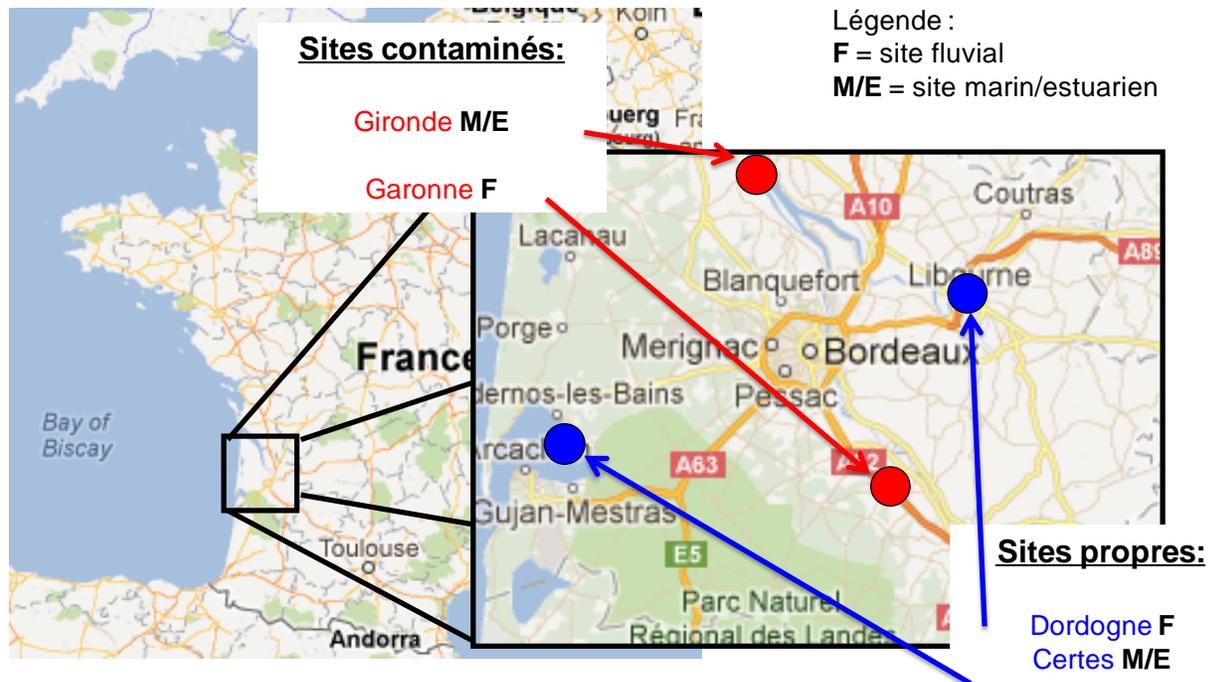


Figure 3.2 : Carte de localisation des sites de pêche des anguilles jaunes en France

3.1.3 Mesures morphométriques et prélèvement des tissus

Pour chaque pays et chaque site, les poissons ont été capturés à l'aide de verveux (mailles du filet 6,4 mm), de chaluts (mailles du filet de 31 mm) et de la pêche électrique. Ceux-ci ont été employés en fonction de la profondeur du système échantillonné : pêche électrique pour les rivières, verveux pour les axes fluviaux et chaluts pour l'estuaire. En 2011 et en 2012, toutes les anguilles provenaient d'une capture unique en une journée, à l'exception des sites RSO et RSJ au Québec où les anguilles ont été capturées en deux jours en raison d'un petit nombre d'anguilles échantillonnées le premier jour. Les anguilles américaines et européennes ont été analysées et échantillonnées selon les mêmes protocoles standardisés en accord avec ceux approuvés par les comités d'éthique des animaux dans les deux pays. Suite à leur capture, les poissons ont été conservés dans de grands bacs à l'abri de la chaleur et de la lumière avec de l'eau provenant de leur site de capture. Des bulleurs électriques assuraient un apport continu en oxygène aux anguilles. Après avoir été pesées (g) et mesurées (mm), les anguilles ont été tuées par décapitation (sans anesthésie). En effet, l'utilisation d'un anesthésiant (Eugénol) a montré un impact sur les niveaux de transcription de certains gènes ainsi que sur la production d'hormones du système endocrinien (Renault et al. 2011), ce qui pouvait induire un biais pour les études génétiques du premier volet du projet. Les otolithes ont été récupérés et analysés par

lecture de coupes transversales à postériori au laboratoire du biologiste Guy Verreault du MFFP à Rivière du Loup. Les données morphométriques des anguilles jaunes du terrain 2011 et 2012 du Québec et de la France sont présentées dans l'article 1 du chapitre 1 (Tableau 2 et 3). Le foie a été pesé puis découpé en plusieurs morceaux : Une tranche longitudinale au centre de 3 mm d'épaisseur a été placée dans une cassette histologique puis plongée dans une bouteille de 1 litre de polyéthylène à haute densité remplie de 750 ml de formaldéhyde tamponné pour les futures analyses histopathologiques. Deux morceaux de 150 mg et un morceau de 100 mg ont été placés dans deux tubes cryogéniques de 2 ml dans de l'azote liquide sur le terrain puis conservés au congélateur -80°C. Le premier tube a servi pour les analyses des enzymes antioxydantes (CAT et SOD), le deuxième tube pour les analyses des enzymes de biotransformation (EROD) et le troisième tube pour l'analyse des concentrations métalliques dans le foie. La rate a été pesée puis placée dans une cassette histologique. Dans une zone standardisée, située 2 cm en arrière de l'anus et au-dessus de la ligne latérale, deux échantillons de muscle sans peau de 100 mg chacun ont été placés dans un tube cryogénique de 2 ml puis conservé dans l'azote liquide avant d'être stocké au - 80°C. Un échantillon de 10 g sans peau a été emballé dans de l'aluminium, placé sur la glace puis à -20°C. Le tube a été utilisé pour les analyses de métaux et l'échantillon de 10 g est utilisé pour l'analyse des contaminants organiques (PCB, pesticides organochlorés et PBDE).

3.1.4 Détermination de l'âge

La détermination de l'âge chez l'anguille a été réalisée par l'équipe technique supervisée par le biologiste Guy Verreault au MFFP à Rivière du Loup (Québec). Les otolithes sagittaux ont été extraits, nettoyés à l'eau distillée, séchés et conservés dans des tubes Eppendorf en plastique à température ambiante jusqu'à leur traitement. Les otolithes ont été traités pour la détermination de l'âge selon Verreault et al. (2009) selon une procédure en cinq étapes : 1) nettoyage avec de l'hypochlorite de sodium (2,5%) ; 2) rinçage à l'eau déminéralisée ; 3) séchage et polissage avec poudre d'oxyde d'aluminium (1µm) ; 4) gravure avec une solution d'EDTA ; et enfin 5) coloration avec 0,01% de bleu de toluidine. Les otolithes ont été observés avec un microscope binoculaire (60X) sous lumière transmise pour le vieillissement. Le nombre de vrais anneaux annuels de croissance a été compté et utilisé comme indicateur d'âge. Cette méthode a été adaptée des travaux de Secor et al. (1992), Oliviera (1996) et Adam (1997).

3.1.5 Longueur estimée par rétro-calcul

Chez le poisson, il existe une bonne relation entre la taille de l'otolithe et la taille corporelle (Panfili et Ximénès, 1994). En utilisant cette relation, il est possible de déterminer la taille pour un âge antérieur à l'aide d'une méthode de rétro-calcul (Francis 1990). Cependant, des études ont montré que le ratio poisson-dimensions des otolithes varient systématiquement en fonction du taux de croissance somatique, ce qui correspond à des otolithes relativement gros chez les poissons à croissance lente. Campana (1990) a adapté la méthode de rétro-calcul de taille en supprimant ce biais par l'emploi d'un point d'interception déterminé biologiquement plutôt qu'évalué statistiquement dans l'équation de rétro-calcul en utilisant la taille moyenne du corps et l'otolithe au stade de civelle. L'équation de la taille rétro-calculée (L_t) à l'âge t est décrite comme suit :

$$L_t = L_c + (L_c - L_{bi}) \times (O_t - O_c) / (O_c - O_{bi})$$

Où O_t est le rayon mesuré des otolithes à l'âge t , L_c et O_c sont la longueur corporelle et le rayon otolithique à la capture, respectivement. L_{bi} et O_{bi} sont respectivement la longueur corporelle et le rayon otolithique du point d'interception biologique. Les mesures du rayon de l'otolithe (mm) au niveau du t^{th} anneau (R_t), correspondent à la distance entre la marque du stade civelle (une marque déposée à peu près au moment de leur arrivée continentale) et le t^{th} anneau (soit : $O_t - O_{bi}$) et les mesures du rayon de l'otolithe (mm) à la capture (c), correspondent à la distance entre la marque de l'otolithe au stade civelle jusqu'à l'anneau de l'âge de la capture ($O_c - O_{bi}$). Ces mesures ont toujours été faites le long de l'axe le plus long du côté ventral des sagittes de l'otolithe. Dans cette étude, la longueur moyenne des civelles mesurée lors de leur recrutement sur les côtes (L_{bi}) a été fixé à 67 mm (écart-type = 4.5mm) pour l'anguille européenne et 62 mm (écart-type = 3.2mm) pour l'anguille américaine ce qui correspond à l'âge 0Y ou à l'âge continental (ICES, 2009 ; Lambert et al., 2003).

3.2 Expérience de laboratoire

Afin de déterminer l'impact des contaminants de manière individuelle et de tester certaines conditions environnementales sur l'ensemble des biomarqueurs du chapitre 2, nous avons eu l'opportunité d'obtenir des échantillons de foie et de rate d'anguilles jaunes exposées à différentes facteurs anthropiques et environnementaux afin d'analyser les réponses de nos biomarqueurs. Une expérience en laboratoire sur des anguilles jaunes européennes a été réalisée et menée par la doctorante Lucie Baillon qui travaillait avec l'équipe française du

laboratoire d'écotoxicologie dirigée par M. Baudrimont. Cette expérience faisait partie du programme de recherche et intégrait la thèse de Lucie Baillon dont l'objectif principal était d'attribuer une signature transcriptomique pour chaque contaminant et facteur naturel chez les anguilles au stade jaune. Les expositions en laboratoire auxquelles je n'ai pas participé et dont les protocoles ont été décrits dans la thèse de Lucie Baillon (2015), dans Baillon et al. (2016a) et Baillon et al. (2016b) sont brièvement décrites ci-dessous.

Du fait de la contrainte du nombre de bacs disponibles, deux volets d'expositions ont été réalisés à la suite l'un de l'autre. Les résultats obtenus et présentés dans le chapitre 3 sont issue seulement du premier volet expérimental.

Les facteurs de ce premier volet expérimental sont :

- Effet de la salinité
- Effet de la sous-alimentation
- Effet des polychlorobiphényles (PCB)
- Effet du cadmium (Cd)

3.2.1 Capture des anguilles jaunes européennes

L'ensemble des poissons sauvages destinés aux expérimentations de laboratoire provenaient du marais salant du domaine de Certes. Ce site a été préférentiellement choisi puisqu'il s'agit d'un site considéré comme propre dans notre étude et dans le but d'obtenir des poissons en bonne santé et le plus faiblement contaminés.

3.2.2 Conditions générales des expositions

Après la capture, les anguilles ont été acclimatées durant une période de 30 jours dans des bacs alimentés directement par de l'eau provenant du bassin d'Arcachon afin d'éviter un choc osmotique trop important du fait qu'elles provenaient d'un milieu saumâtre (17 ‰). Par la suite, la salinité a été progressivement abaissée à 5 ‰ en moyenne tous les 3 jours pour les acclimater aux futures conditions expérimentales et les anguilles ont été nourries à satiété tous les deux jours avec des moules décortiquées et congelées. Un très faible taux de mortalité a été observé. Après 30 jours d'acclimatation, les poissons ont été transférés dans les bacs expérimentaux. Chaque bac destiné aux expositions contenait 8 anguilles jaunes (exposées et contrôles). Tous les bacs étaient soumis à une salinité de 5‰, établie par un apport contrôlé en eau saumâtre (provenant du bassin d'Arcachon) et en eau douce sauf pour la condition

expérimentale forte salinité où le bac était soumis à une salinité de 18‰. Le système d'alimentation en eau était ouvert et l'eau était renouvelée 1 fois par jour. La température a été fixée à 23°C pour tous les bacs. Cette température correspondait à celle retrouvée en moyenne dans les sites d'échantillonnage. L'exposition a été fixée à 45 jours pour mimer une exposition chronique en milieu naturel. La nourriture destinée aux anguilles était constituée de vive (*Trachinus sp.*), un poisson de mer afin d'éviter une contamination potentielle en polluant. Pour la préparation du poisson, les viscères étaient retirés car représentaient des accumulateurs de polluants, ainsi que la tête et la nageoire caudale. Le reste était broyé avec une préparation d'agar-agar et d'huile de colza pour former une gelée homogène. Cette pâtée, réservée à -20°C, était ensuite distribuée tous les deux jours au cours de l'expérimentation. Les anguilles étaient nourries le soir. Le lendemain, les restes de nourriture en excès étaient enlevés puis conservés et déshydratés pour contrôler l'alimentation des animaux. Tous les individus étaient soumis à un régime alimentaire correspondant à 7.5 % de leur masse totale sauf pour les poissons soumis au traitement « sous-alimentation ».

3.2.3 Expositions aux polluants

- Le Cd

Comme mentionné dans l'introduction, si dans l'hydro-système du Saint Laurent la contamination au Cd n'est pas marquée, à l'inverse la présence de Cd dans la Gironde est historique. La biodisponibilité du Cd sous la forme Cd^{2+} à une salinité fixée à 5‰ est de 26%, calculée à partir du modèle de l'ion libre. Dans le but de se rapprocher des conditions naturelles (soit 0,1 µg/L en Gironde, Baudrimont et al. 2006) et compte tenu de sa biodisponibilité pour les organismes, les concentrations appliquées étaient de $0,09 \pm 0,01$ µg/L et $4,00 \pm 0,18$ µg/L (Baillon et al., 2016a). Le facteur 10 entre ces deux concentrations a permis d'obtenir une valeur haute et basse de concentration en Cd dans le but de couvrir une gamme de concentrations qui pourraient être retrouvées sur l'ensemble du système fluvial de la Gironde.

- Les PCB (7 PCB prioritaires) : solution de Pyralène

Pour l'exposition en PCB, une solution de pyralène a été utilisée, une solution regroupant les PCB 28, 52, 101, 138, 153, 180 et 209, les 7 PCB prioritaires dans l'évaluation de la norme de la qualité environnementale en France. La forte présence de PCB dans le muscle des individus échantillonnés dans la Gironde et dans la Garonne, a conduit à exposer les anguilles à ces substances. Compte tenu du caractère fortement lipophile de ces composés et de la place de l'anguille dans la chaîne alimentaire, la voie trophique pour la contamination en PCB a été

choisie. La quantité de pyralène pour contaminer les boulettes de poissons a été calculée à partir de la concentration du PCB 153. Les concentrations appliquées se sont appuyées sur les concentrations en PCB retrouvées dans les proies présumées des anguilles au niveau de la Gironde (Tapie et al., 2011) soit une concentration fixée à 50 ng de PCB / g et 300 ng de PCB / g de nourriture sèche. Pour cette exposition, leur nourriture a été mixée avec les solutions de PCB contenues dans de l'huile alimentaire (huile de colza).

3.2.4 Expositions aux facteurs environnementaux

- La salinité

La salinité a été choisie car elle augmente dans les estuaires d'amont en aval dans les deux hydrosystèmes du Saint-Laurent et de la Gironde ainsi qu'à l'intérieur même des tributaires québécois (RSO et RSJ) et est également un facteur responsable de variation de croissance chez l'anguille (Jessop et al., 2007 ; Daverat et Tomas, 2006). La salinité a été fixée à 18 ‰ pour cette condition tandis qu'elle était à 5‰ dans tous les autres bacs. L'exposition à 0 ‰ n'a pas été retenue du fait de la difficulté à maintenir les anguilles en bonne santé en eau douce avec le risque de maladies infectieuses. De plus, des études de terrain et de laboratoire ont démontré que les niveaux d'infection du nématode *A. crassus* sont inversement liés à la salinité et à la longueur (Kirk et al., 2000 ; Morrison et al., 2003; Lefebvre et Crivelli, 2012; Lefebvre et al., 2013; Barry et al., 2017).

- La sous-alimentation

Les anguilles étant soumises aux variations de leur apport en nourriture en milieux naturels, il a été choisi de les soumettre à un régime restrictif pour tester son impact sur les réponses des biomarqueurs. L'apport alimentaire (en masse humide) est fixé à 2% de leur poids total contre 7.5% pour les autres conditions expérimentales. Les anguilles ont été nourries avec de la nourriture non contaminée.

Concernant le volet expérimental, le nombre total d'anguilles pour chaque traitement était de 8 individus et il y avait un réplica par traitement. Les mesures morphométriques (taille, poids et indice hépato-somatique) et les prélèvements des tissus pour les analyses d'enzymes de biotransformation et les mesures histologiques ont été réalisées de la même manière que sur le terrain (section 3.1.3). Les mesures de biomarqueurs qui ont été réalisées dans le cadre de cette expérience sont :

- L'activité d'EROD dans le foie

- La mesure de la densité et de la surface des centres mélano-macrophages (CMMs) dans la rate
- La mesure des dépôts pigmentaires de lipofuscine et d'hémosidérine dans les CMMs de la rate

3.3 Analyses des indicateurs d'exposition et contenu lipidique

L'ensemble des analyses des contaminants métalliques (Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Zn, Cr, As, Ag, Se) dans le foie et le muscle des anguilles de terrain et de laboratoire ont été réalisés à l'INRS-ETE par un étudiant à la maîtrise Antoine Caron et une stagiaire Pauline Pannetier dans le laboratoire de Peter Campbell à Québec (Canada). Les protocoles d'analyses ont été décrits dans les articles du chapitre 2 et 3, dans la maîtrise d'Antoine Caron, dans Caron et al. (2016) et Pannetier et al. (2016). Concernant les analyses des contaminants organiques (PCB, PBDE et pesticides organochlorés), ils ont été mesurés par l'équipe d'Hélène Budzinski au laboratoire de Toxicologie et Physico-Chimie de L'environnement (LPTC) à Talence (Gironde) et ont été décrits dans les articles des chapitres 2 et 3 de la thèse de Lucie Baillon, dans Baillon et al (2015) et Caron et al. (2016). N'ayant pas participé aux dosages de ces contaminants, les protocoles sont décrits brièvement ci-dessous.

3.3.1 Métaux

Les échantillons de foie et de muscle ont été lyophilisés à froid dans des vials de Teflon-PFA (Savillex) et conservés dans ces récipients jusqu'à la fin de la préparation des échantillons. Suite à la lyophilisation, un sous-échantillon de 50 mg a été prélevé pour faire le dosage du Hg. Ces dosages ont été faits dans un analyseur de Hg (Milestone DMA-80) et le MESS-3 (Conseil National de la Recherche du Canada) comme matériel de référence. Pour le reste de chaque échantillon, ils ont été digérés pendant deux jours dans du HNO₃ concentré et ensuite au peroxyde d'hydrogène concentré (40 µl par mg de poids sec). Le volume de digestion est complété à 1 ml par mg de poids sec avec de l'eau ultra pure. Les concentrations de Cd, Pb, Cu, Ni, Zn, Cr, As, Ag et Se ont été mesurées à l'aide d'un spectromètre à couplage inductif au plasma couplé à un spectromètre de masse (ICP-MS ; Thermo Scientific XSeries 2) (Pannetier et al., 2016 ; Caron et al., 2016).

3.3.2 Contaminants organiques

Les sept PCB indicateurs (CB 50+28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 153, CB 138, CB 180) , les OCP (Hexachlorobenzene ou (HCB), lindane, heptachlore, heptachlorepoxyde, cis-chlordane, trans- nona- chlore, 2,4 DDE, 4,4 DDE + dieldrin, 2,4 DDD + (CB154 + 77), 4,4 DDD, 2,4 DDT, 4,4 DDT, Mirex + (CB170)) et les PBDE (PBDE 28, 47, 49, 99, 100, 153, 154, 183, 209) sont mesurés dans le muscle par GC-ECD (chromatographie en phase gazeuse couplée à un ECD : détecteur à absorption électronique) et confirmés par GC/MS basse résolution (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse) et par GC/MS TOF haute résolution (Tapie et al., 2011).

3.3.3 Contenu lipidique

La teneur en lipides est mesurée pour chacun des échantillons de muscle séché pour chaque anguille. La technique utilisée est une extraction assistée par micro-ondes (MAE) (Bodin et al., 2009, Tapie et al., 2011). Quelques milligrammes d'échantillon séché sont pesés et ensuite extrait avec du dichlorométhane (20 ml, 30 W, 10 min). Un solvant extrait de l'ensemble des lipides est obtenu et ensuite un extrait organique est filtré et évaporé. Le résidu est pesé pour estimer la gravimétrie de la teneur en lipides de l'échantillon. La teneur en lipides est exprimée en pourcentage de la teneur en lipides musculaires secs (Contenu lipidique %) selon la formule suivante :

$$CI (\%) = m_1 / m_{dm} \times 100$$

m_1 est la masse de lipide extrait (g), m_{dm} est la masse de matière sèche (g)

4. ANALYSES DES BIOMARQUEURS

4.1 Activité d'EROD

La 7-éthoxyrésorufine O-dééthylase (EROD) est mesurée dans le foie de l'anguille. L'activité EROD a été mesurée en utilisant une méthode spectrofluorimétrique adaptée pour les microplaques par Fragoso et al. (1998). Le principe est basé sur l'augmentation de fluorescence du milieu réactionnel due à la transformation de la 7 éthoxyrésorufine en résorufine (cette dernière étant 100 fois plus fluorescente). L'activité d'EROD a été mesurée dans le surnageant post-mitochondrial (constitué des particules microsomiales, plus légères et solubles où se concentrent les enzymes dépendantes du complexe CYP450A1 dont EROD) préparé à partir d'un homogénat de 50 mg de foie broyé dans 1 ml de tampon de broyage d'acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) (0,1 M, pH = 7,8) et centrifugé à 10 000 g pendant 20 min à 4 ° C. Le milieu réactionnel contient 50 µl de surnageant post-mitochondrial dans une solution tampon HEPES, 10 µl de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH, 20 mg/ml) et 50 µl de 7-éthoxyrésorufine (0,024 mg/ml) dans du DMSO. L'activité a été quantifiée dans des microplaques à 96 puits en utilisant un lecteur de plaques Cytofluor II® (excitation à 530 nm, émission à 590 nm, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA). La fluorescence de la résorufine a été mesurée à des intervalles de 60 s pendant 13 min. Les lectures de fluorescence ont été comparées à une courbe standard de résorufine. La concentration totale en protéines du surnageant post-mitochondrial est mesurée avec le réactif de Bradford en utilisant de l'albumine de sérum bovin comme standard (BSA, Bio-Rad Laboratoires, Hercules, CA, USA). L'activité d'EROD est exprimée en pmoles de résorufine/min/mg de protéine. Tous les échantillons ont été systématiquement effectués en triplicata (le dosage enzymatique et le dosage des protéines) avec un blanc et un contrôle positif. Le contrôle positif a été utilisé pour valider les réponses d'EROD et correspondait à un homogénat de foie de 15 poulamons d'Atlantique (*Microgadus tomcod*) poolés qui ont reçu par voie intrapéritonéale 20 mg/kg de benzo [a] pyrène (HAP inducteur d'EROD) et qui ont été échantillonnés 48 heures après le traitement (Couillard et al., 2004). Les coefficients de variation entre les échantillons et les témoins positifs étaient < à 20% et le coefficient de variation moyen de l'échantillon était de < 25%.

4.2 Enzymes antioxydantes

Les enzymes CAT et SOD ont été mesurées dans le surnageant cytosolique préparé à partir d'homogénat de foie. 50 mg de foie a été décongelé sur glace, haché avec une lame de rasoir en acier chirurgical stérile, et homogénéisé dans du tampon glacé (pH 7,5 ; 20mM HEPES ; 1mM EDTA ; 0,1% de Triton X-100, 1:9, Poids/Volume) durant trois périodes de 10 secondes à l'aide d'un homogénéisateur Ultra Turrax T25 (Janke et Kunkel, IKA-Labortechnik, Staufen, Allemagne). L'homogénat est conservé sur la glace lors de l'homogénéisation complète et lors des dosages enzymatiques. A partir de l'homogénat, un aliquot destiné à la mesure enzymatique de SOD a été centrifugé à 1500g (5 min à 4 °C). Le surnageant a été récupéré et stocké dans un tube Eppendorf à -80°C pour les futures analyses de SOD. Un autre aliquot destiné à la mesure enzymatique de CAT a été centrifugé à 10 000g (15 min à 4°C) et le surnageant a été stocké à -80°C pour les analyses ultérieures de CAT. Les activités enzymatiques de SOD et de CAT ont été déterminées à l'aide de kits de dosage enzymatique Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, MI, USA ; n° 706002 et 707002 pour SOD et CAT, respectivement). Les essais enzymatiques ont été réalisés sur des microplaques de 96 puits avec un spectrophotomètre UV / visible (Cary 50, Varian inc.). Le dosage de l'enzyme SOD utilise un sel de tétrazolium pour détecter les radicaux anion superoxyde générés par la xanthine oxydase et l'hypoxanthine et est mesurée par spectrophotométrie à 450 nm. La mesure de l'enzyme CAT est basé sur la réaction de l'enzyme avec le méthanol en présence d'une concentration optimale de H₂O₂. Le formaldéhyde généré réagit avec le 4-amino-3-hydrazine-5-mercapto-1,2,4-triazole (Purpald). Les aldéhydes, lors de l'oxydation, passent d'une couleur incolore à une couleur pourpre et sont mesurée par spectrophotométrie à 540 nm. Une unité de SOD est définie comme la quantité nécessaire pour une inhibition de 50% du radical superoxyde dans les conditions standard de l'essai. Une unité (U) de CAT est définie comme la quantité d'enzymes qui provoque la formation de 1 nmol de formaldéhyde par minute à 25° C. Les facteurs de dilution des homogénats ont été déterminés à 10 et 5000 pour SOD et CAT, respectivement. Tous les échantillons ont été testés en triplicata et chaque lecture d'absorbance a été comparée à une courbe standard et à un témoin positif. Les concentrations totales en protéines de chaque homogénat ont été mesurées à l'aide de la méthode de Bradford (1976) comme pour les dosages d'EROD. Les résultats des activités de CAT et de SOD sont exprimés en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéines.

4.3 Biomarqueurs histopathologiques

4.3.1 Préparation des tissus

La rate a été choisie comme tissu de choix pour l'examen des impacts des contaminants sur des biomarqueurs histopathologiques chez les poissons (Wolke, 1992 ; Agius et Roberts, 2003 ; Au, 2004). Les agrégats de macrophages dans la rate chez le poisson sont des biomarqueurs sensibles et non-spécifiques d'exposition aux contaminants de l'environnement (Rice, 2001). Les prélèvements de rate ont été fixés dans du formol tamponné à 10% dans les minutes qui suivent la mort de l'individu. Les tissus sont inclus dans la paraffine et des coupes de 5 μm d'épaisseur ont été réalisées pour la confection des lames. Toutes les lames ont été colorées à l'hématoxyline et à l'éosine (HE) pour les analyses de CMM, au bleu de Prusse (coloration de Perls) pour les dépôts d'hémosidérine et en bleu-vert (coloration Schmorl) pour les dépôts de lipofuscine (Luna, 1968).

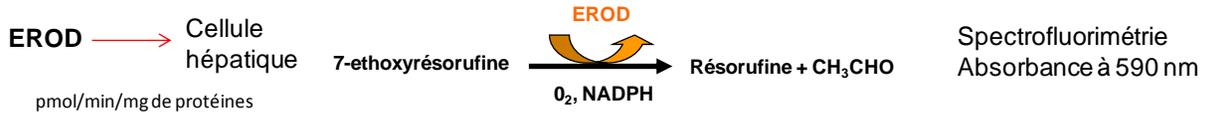
4.3.2 Mesure de la densité et de la surface des CMM

Pour être classé comme un CMM, un agrégat de macrophages devait être composé d'au moins 3 macrophages contenant des pigments jaunes à bruns dans leur cytoplasme (Couillard et Hodson, 1996). Dans les sections de la rate colorées avec HE, la densité de CMM a été évaluée au microscope optique en comptant le nombre de CMM au grossissement $\times 100$ dans trois champs microscopiques choisis au hasard et en divisant ce nombre par la surface des champs étudiés ($S=2,86 \text{ mm}^2$). Les superficies de 10 CMM choisis au hasard ont été mesurées avec un système d'analyse d'image relié à un ordinateur (logiciel Image-Pro Express, version 6.0) et la médiane de la surface des CMM a été calculée pour chaque poisson (Couillard et al., 1996). Le coefficient de variation correspondant du 75^{ème} percentile (Q3) de la densité et de la surface des MMC séparément chez douze anguilles était $< 25\%$ (répété trois fois par deux observateurs différents pour chaque anguille). Tous les tissus ont été examinés à l'aveugle et de façon aléatoire sans que l'observateur connaisse le site d'origine des anguilles. La densité est exprimée en nombre de CMM/ mm^2 et la surface est exprimée en mm^2/CMM .

4.3.3 Mesure des dépôts d'hémosidérine et de lipofuscine

Dans la rate, vingt-cinq CMM sélectionnés aléatoirement et colorés positivement en bleu de Prusse (Perls) pour l'hémosidérine et en bleu-vert (Schmorl) pour la lipofuscine ont été évalués au grossissement x 100. Pour chaque pigment, l'intensité de la coloration dans les CMM a été évaluée en fonction du % de recouvrement et classée de 1 à 5 : 1= pas de coloration de macrophage, 2= 0-25% coloré, 3= 25-50% coloré, 4= 50-75% coloré et => 75%. Le protocole a été validé par des mesures répétées par plusieurs observateurs et à l'aveugle d'un sous-échantillon ($\approx 10\%$) des lames évaluées. De la même manière que pour la densité et la surface des CMM, les lectures ont été réalisées aléatoirement et ont été répétées plusieurs fois.

1- Biomarqueur d'exposition (biotransformation)



2- Biomarqueurs d'effet (stress oxydant)

SOD → Cellule hépatique
 μmol/min/mg de protéines

Mesure des radicaux libres produit par la xanthine oxidase

Spectrophotométrie
 Absorbance à 460 nm

CAT → Cellule hépatique
 μmol/min/mg de protéines

Mesure du formaldéhyde produit par colorimétrie

Spectrophotométrie
 Absorbance à 540 nm

3- Biomarqueurs d'effet (dommages histologiques)

		Mesure par coloration spécifique :		
Densité des CMM CMM/mm ²	→	Rate	• Rose (hématoxyline et éosine)	Microscope optique Logiciel de traitement d'analyses et d'images
Surface des CMM mm ² /CMM	→	Rate	• Rose (hématoxyline et éosine)	
Dépôts d'hémosidérine	→	Rate	• Bleu de Prusse (Perls)	
Dépôts de lipofuscine	→	Rate	• Bleu-vert (Schmorl)	

Figure 4.1 : Synthèse des différentes méthodes utilisées pour quantifier les réponses des biomarqueurs

4.4 Les traitements statistiques

Les résultats et les statistiques des paramètres morphométriques, des biomarqueurs et des contaminants présentés dans ce rapport correspondent aux données des anguilles jaunes capturées sur le terrain au niveau des systèmes du Saint-Laurent et de la Gironde pendant les deux années d'échantillonnage (2011 et 2012) ainsi que les données des anguilles jaunes européennes exposées aux différentes conditions en laboratoire. Ces données ont été présentées systématiquement sous la forme de médiane et des 1^{er} et 3^{ème} quartiles (Q1 et Q3). Pour l'ensemble des chapitres de thèse, les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant les logiciels suivants, Prism v. 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), XLSTAT-ADA (Addinsoft, USA) et R (R. 2011).

Dans le chapitre 1, les tests de variance paramétrique à un facteur (ANOVA) et les tests de variance non paramétriques de Kruskal-Wallis (KW) ont permis tout d'abord de comparer les caractéristiques morphométriques, taille (mm), poids (g) et âge (an) des anguilles à la capture entre les sites d'une même espèce d'une même année et dans un deuxième temps entre les années d'échantillonnage au sein d'un même site à l'aide du test de Student ou test t. Les résultats issus de ces analyses ont montré des différences spatiales et interannuelles de taille, poids et âge entre les sites et les années, ce qui rend l'interprétation des réponses de biomarqueurs plus complexe car ces variables peuvent les influencer. Ceci est particulièrement vrai pour les anguilles américaines. En effet, il apparaît que les anguilles capturées dans la partie amont du Saint-Laurent (LSP et LSF) ont des gammes de taille et d'âge supérieures à celles qui ont été échantillonnées en aval (RSO et RSJ). Les relations entre la taille (mm) et l'âge (an), nous ont informé également sur les taux de croissance entre les individus entre les sites d'une même espèce à la capture et au sein d'un même site. Ces observations ont confirmé que pour un même âge, les anguilles originaires de LSP et LSF avaient des taux de croissance supérieurs aux anguilles échantillonnées aux RSJ et RSO. Ces résultats, nous ont orienté vers une exploration plus approfondie des tailles retro-calculées de 1 an jusqu'à l'âge de la capture pour chacune des anguilles afin d'avoir une représentation de l'évolution de la taille au cours des années de vie de l'anguille. Cette exploration a montré des variations de taille à l'âge entre les individus d'un même site, entre les sites et également dès un jeune âge. En ajoutant une collaboration avec Hilaire Drouineau (ingénieur de recherche à l'IRSTEA), spécialisé dans les modèles de dynamique de populations chez le poisson et en écologie quantitative, nous avons pu améliorer la qualité de nos résultats grâce à l'application de modèles d'effets mixtes linéaires sur nos données de tailles rétro-calculées. Tout d'abord, nous avons adapté un modèle d'effet mixte linéaire pour chaque site afin d'évaluer si la longueur à un an différait considérablement

entre les sites. Les variables qui ont intégré ce modèle étaient la taille rétro-calculée à 1 an, le site de capture et les effets aléatoires inter-cohortes. Une deuxième analyse a été effectuée pour vérifier si les taux de croissance étaient différents entre les sites. Nous avons d'abord calculé des incréments de croissance annuels pour chaque poisson, à savoir la différence entre les longueurs rétro-calculées entre deux âges successifs (de 1 à 5 ans). Nous avons également ajouté un effet aléatoire de cohorte pour tenir compte des différences entre cohortes et un effet aléatoire individuel puisque chaque anguille a été considérée quatre fois dans l'analyse.

Dans le chapitre 2, compte tenu des résultats obtenus dans le chapitre 1, les réponses des biomarqueurs (EROD, CAT, SOD et les réponses histopathologiques) chez les anguilles jaunes ont été comparées entre les sites d'une même espèce et entre les années par des tests d'analyse de la variance (ANOVA) et des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis (KW). Il a également été indispensable d'intégrer les variables biologiques (taille, poids, âge, lipides, nombre d'*Anguillicola crassus*) dans les relations entre les réponses des biomarqueurs et les concentrations en contaminants (PCB, DDT et les métabolites, HCB, lindane, PBDE, Ag, Cd, Pb, Hg et As dans le muscle et Ag, Cd, Pb et As dans le foie). Avec le grand nombre de variables à considérer simultanément dans cette étude, notre choix de test statistique s'est orienté sur l'analyse en composantes principales (ACP) qui permettait de mieux expliquer la variance observée des paramètres. L'ACP est un ensemble de méthodes qui permet d'obtenir un nombre relativement limité de composantes non corrélées. Cette approche facilite l'analyse en regroupant les données dans des ensembles plus petits et en permettant d'éliminer les problèmes de multi colinéarité entre les variables. Des analyses de corrélation non-paramétrique avec un coefficient de corrélation de Kendall ou de Spearman pour une distribution non-normale des données nous ont permis d'observer si les relations entre les réponses des biomarqueurs mesurées, les variables biologiques et les contaminants étaient significatives. Ainsi nous avons pu déterminer les variables explicatives les plus importantes et qui contribuent à différencier les anguilles des sites de capture et également de visualiser et interpréter les liens entre ces variables explicatives. Par la suite, une vérification systématique des corrélations significatives entre les réponses des biomarqueurs et les autres variables (pour un coefficient de corrélation \geq à 0,5) a été réalisée à l'aide de régression linéaire simple.

Dans le chapitre 3 soit l'expérience de laboratoire, dû à un taux de mortalité d'anguilles non-contrôlé dans certaines conditions, notre démarche d'analyse statistique s'est orientée dans un premier temps sur une analyse en composantes principales de l'ensemble des réponses des biomarqueurs et variables biologiques pour l'ensemble des anguilles exposées aux différentes

conditions. Ce type d'analyse a permis d'identifier des liens entre les biomarqueurs et la biologie des anguilles. Dans un deuxième temps, des matrices de corrélations de Kendall entre les réponses des biomarqueurs et les concentrations tissulaires des contaminants ont fait ressortir des relations dose-effet dans certaines conditions. Ces relations dose-effet ont été vérifiées à l'aide de régressions linéaires ou non linéaires simples.

Pour chaque test statistique, une probabilité de $p \leq 0,05$ est considérée comme significative et une probabilité $p < 0,001$ comme hautement significative. Les postulats de base sont systématiquement vérifiés.

Pour l'ANOVA à un facteur, trois conditions sont systématiquement vérifiées :

- La normalité sur les résidus par le test de Shapiro-Wilk (graphiquement, on regarde si les valeurs suivent une distribution normale).
- L'homogénéité des variances sur les résidus (ou homoscedasticité). Il s'agit de la condition la plus importante. Dans le cas d'une mauvaise homogénéité, une transformation des données peut être utile.
- Et enfin l'indépendance des échantillons

Pour les analyses en composantes principales (ACP), les conditions d'utilisation sont les suivantes :

- Nombre d'observations (minimum 5 observations par variable, l'idéal est de 10). Dans cette étude, nous avons un nombre d'observations de 15 anguilles/site/pays (jaune) pour l'étude de terrain et un nombre minimum de 5 anguilles jaunes par condition (avec un total 6 conditions différentes) pour l'étude de laboratoire.
- Des analyses statistiques (matrice de corrélation) ont été réalisées pour regrouper les variables fortement corrélées (par exemple, les contaminants organiques). Ce qui a permis d'éliminer de l'information redondante.

Pour les régressions simples, les conditions suivantes sont systématiquement vérifiées :

- La normalité sur les résidus par le test de Shapiro-Wilk.
- L'homogénéité des variances sur les résidus (ou homoscedasticité).
- L'indépendance des échantillons

5. CHAPITRES DE THÈSE

5.1 Chapitre 1 : variations de croissance chez les anguilles jaunes échantillonnées le long des systèmes hydrographiques de la Gironde et du Saint-Laurent.

Au cours des deux campagnes d'échantillonnage (2011 et 2012), des différences de taille chez les anguilles jaunes américaines et européennes ont été mis en évidence entre les sites des systèmes de la Gironde (SG) et du Saint-Laurent (SSL). Dans le cas du SG, les anguilles capturées dans le fleuve DOR en eau douce avaient des tailles inférieures aux anguilles capturées dans le fleuve GAR, l'estuaire GIR ainsi que le marais salant CER (Tableaux 2 et 3, article 1). Un gradient de croissance de l'amont vers l'aval a été observé. En effet, à la capture, nous avons observé que les anguilles jaunes des habitats d'eau saumâtre (GIR et CER) grandissaient significativement plus rapidement que celles des habitats d'eau douce (GAR et DOR, ANNEXE II-1 a)). Dans le cas du SSL, les anguilles capturées en amont dans les lacs LSP et LSF avaient des tailles et âges supérieures aux anguilles capturées en aval dans les rivières RSO et RSJ (Tableaux 2 et 3, article 1). La comparaison des taux de croissance à la capture entre les sites a confirmé la séparation en deux groupes (Annexe II-1 b). Les anguilles jaunes des habitats d'eau douce (LSP et LSF) grandissaient plus vite que celles originaires des tributaires de l'estuaire du Saint-Laurent (RSO et RSJ). Des différences de taille ont également été observées à l'intérieur des sites aussi bien dans le cas du SG que dans le SSL soulignant l'existence de variations interindividuelles (ANNEXES II-2 et II-3). Comme mentionné dans la section 1.3, les conditions environnementales (température, salinité, productivité, compétition...) des habitats de croissance semblent jouer un rôle sur la plasticité phénotypique des anguilles dont la croissance (Drouineau et al. 2008). Les études de Côté et al. (2009) et Côté et al. (2014) suggèrent également que ces différences de taille sont visibles dès leur jeune âge et pourraient être liées aux traits génétiques de l'individu.

À la lumière des premiers résultats et dans le but d'une meilleure interprétation des futures analyses sur les réponses des biomarqueurs en lien avec la contamination (chapitre 2), l'objectif de ce chapitre était d'examiner les variabilités de taille à l'âge chez les anguilles américaines et européennes à des âges comparables et en lien avec les études précédentes. Pour cela, j'ai choisi de comparer les tailles rétro-calculées des anguilles âgées de 1 à 5 ans.

Plus précisément, en tenant compte de la variabilité interindividuelle et de l'effet des cohortes, j'ai voulu répondre aux questions suivantes (section 1.4) :

- Les patrons de taille à l'âge (de 1 à 5 ans) des anguilles américaines ou européennes échantillonnées à différents habitats (salinité, latitude / distance de frayères, température) dans les deux hydro systèmes sont-ils identiques entre les sites d'un même pays ?
- Les patrons de taille à l'âge (de 1 à 5 ans) des anguilles américaines ou européennes échantillonnées dans différents habitats, sont-ils compatibles avec le paradigme actuel des jeunes anguilles à croissance rapide originaires des habitats d'eau saumâtre/marine et/ou moins éloignés de la zone de frai de la mer des Sargasses ?
- La taille à un jeune âge chez les anguilles américaines et européennes respecte-t-elle les données historiques publiées sur la croissance des jeunes anguilles originaires des habitats du SG et du SSL ?

Les patrons de taille de 1 à 5 ans des anguilles américaines ou européennes échantillonnées dans différents habitats ont été comparés entre les sites pour chaque espèce séparément. Dans le cas du SG, nous avons montré qu'à 1 an, les anguilles originaires du marais salant CER avaient des tailles supérieures à celles des anguilles des sites GIR, GAR et DOR et que de 2 à 5 ans, les mêmes anguilles de CER préservaient significativement des tailles élevées tandis que les anguilles du site estuarien GIR affichaient un taux de croissance de plus en plus rapide, avec des tailles plus élevées que celles des sites d'eau douce (Figure 2 a), article 1). L'incertitude de ces résultats a été validée à partir de modèles mixtes linéaires intégrant les variabilités interindividuelles de taille à l'âge et un éventuel effet cohorte (Tableaux 4 et 5, article 1). Nos résultats ont confirmé que le modèle spatial actuel des tailles à un jeune âge chez l'anguille européenne jaune du SG était cohérent avec le paradigme des taux de croissance plus élevés chez les anguilles grandissant dans des habitats d'eau saumâtre et / ou moins éloignés de la zone de frai de la mer des Sargasses décrit dans l'étude de Daverat et Tomas (2006). Les tailles rétro-calculées de 1 à 5 ans des anguilles collectées en 2011 et 2012 dans notre étude ont également été comparées avec les anguilles collectées dans l'étude de Daverat et Tomas (2006) 10 ans plutôt. Cette comparaison a mis en évidence une augmentation de la taille (le double) à 1 an et à 5 ans chez les anguilles jaunes échantillonnées aux mêmes sites le long du SG. Cette observation suggère une amélioration de la performance de la croissance, éventuellement liée aux facteurs abiotiques (modifications induites par les changements climatiques de la salinité, de la température, de la productivité et de la qualité de l'habitat) et / ou

des facteurs biotiques (faible densité d'anguilles, faible recrutement côtier des civelles) (Bonhommeau et al., 2008 ; Daverat et al., 2012 ; Knights 2003).

Les patrons de taille à l'âge observés dans le SSL différaient de ceux observés dans le SG. À 1 an, les anguilles qui migrent vers les LSF et LSP n'ont pas encore atteint leur site de croissance et transitent dans le SSL (Benchetrit et al. ; 2017), ce qui nous indique ici que l'habitat de croissance où elles ont été capturées n'a pas eu d'influence sur leur taille à ce jeune âge. Les résultats présentés ici contrastent avec certaines données récentes. En effet, sur la base des expériences en laboratoire de Côté et al. (2009) (détaillées dans la section 1.3), on s'attendait à ce que dès leur jeune âge, les anguilles des LSP et LSF aient une croissance lente, menant éventuellement à une maturité tardive. À la lumière de nos résultats et aux études antérieures (Jessop et al., 2004 ; Jessop, 2010), nous suggérons comme hypothèse que ce qui est prédéterminé chez les jeunes anguilles (civelles) qui vont s'établir dans le haut du Saint-Laurent, ce n'est pas un taux de croissance faible, mais cela pourrait plutôt être la taille à maturité qui par un mécanisme qu'on ignore encore serait liée à une caractéristique qui permet à certaines jeunes anguilles de faire une plus longue migration jusqu'à leur site de croissance. À la migration de reproduction, les anguilles du haut Saint-Laurent ont un taux de croissance beaucoup moins élevé que celui des anguilles originaires des rivières de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent, sans doute principalement parce qu'elles sont plus vieilles et qu'elles ont une maturation sexuelle tardive. Cependant, aucune information n'est disponible sur la taille à maturité des anguilles jaunes capturées en 2011 et 2012 et elle diffère peut-être de celle observée dans le passé chez les anguilles des mêmes bassins versants. Afin de valider cette hypothèse, une étude supplémentaire collectant des anguilles argentées originaires des sites LSP et LSF et des sites RSO et RSJ permettraient d'obtenir des informations sur la taille à maturité.

Malgré la grande diversité d'habitats utilisés dans cette étude (une échelle hydro-géographique plus importante dans le cas du SSL avec des sites (RSO et RSJ) fonctionnant comme des bassins hydrographiques à eux seuls, de plus longues distances séparant les sites et des températures plus froides comparé au SG) ainsi que les limitations liées à l'échantillonnage (différentes techniques de pêche utilisées, un nombre restreint d'anguilles capturées par site (30) et par année), notre étude a montré un modèle inverse de taux de croissance précoce de 1 à 5 ans entre les deux espèces. Les anguilles américaines originaires des sites en amont du Saint-Laurent avaient des croissances rapides et celles originaires des sites en aval avaient des

croissances lentes contrairement aux anguilles européennes originaires de l'amont du SG avec des croissances lentes et celles originaires de l'aval avec des croissances rapides. Ces observations soulèvent des questions notamment sur notre compréhension actuelle de l'adaptation des anguilles à l'hétérogénéité de l'environnement (Mateo et al., 2016). Compte tenu de l'échantillonnage restreint de l'étude, il est nécessaire de vérifier la nouvelle information rapportée chez l'anguille américaine en augmentant l'étendue et l'intensité de l'échantillonnage. Nous recommandons de poursuivre les études avec un plus grand échantillon d'anguilles, un plus petit âge à la capture et un plus grand choix de sites le long des hydrosystèmes. D'autres études seront nécessaires pour démontrer que les jeunes anguilles sauvages actuellement en croissance en amont du SSL montrent toujours une grande taille et un âge à la migration typique des anguilles de ce secteur (Jessop, 2010) et pour étudier les variations du taux de croissance précoce des anguilles jaunes dans la partie supérieure du SSL soit du lac Ontario au LSP. Nous avons également mis en évidence que la taille des anguilles européennes de 1 à 5 ans échantillonnées dans le SG avait doublé par rapport à celle rapportée il y a 10 ans (Daverat et Tomas, 2006). Afin de tester l'hypothèse d'une possible augmentation du taux de croissance précoce en relation avec les modifications des facteurs abiotiques et biotiques, des études approfondies et un suivi supplémentaire sont clairement nécessaires.



Hydrosystème du Saint- Laurent (SSL, Québec)
Anguilla rostrata

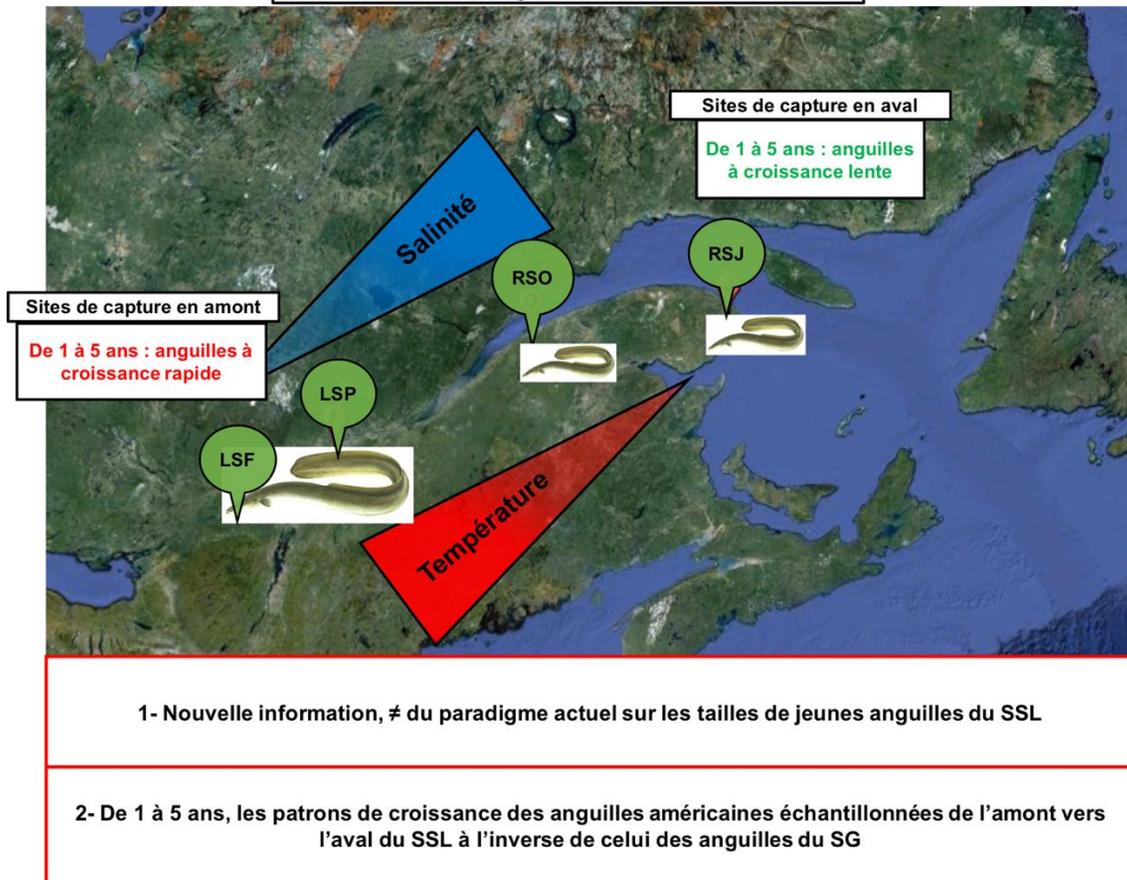


Figure 5.1 : Schéma de synthèse du chapitre 1 dans le cadre du système du Saint-Laurent

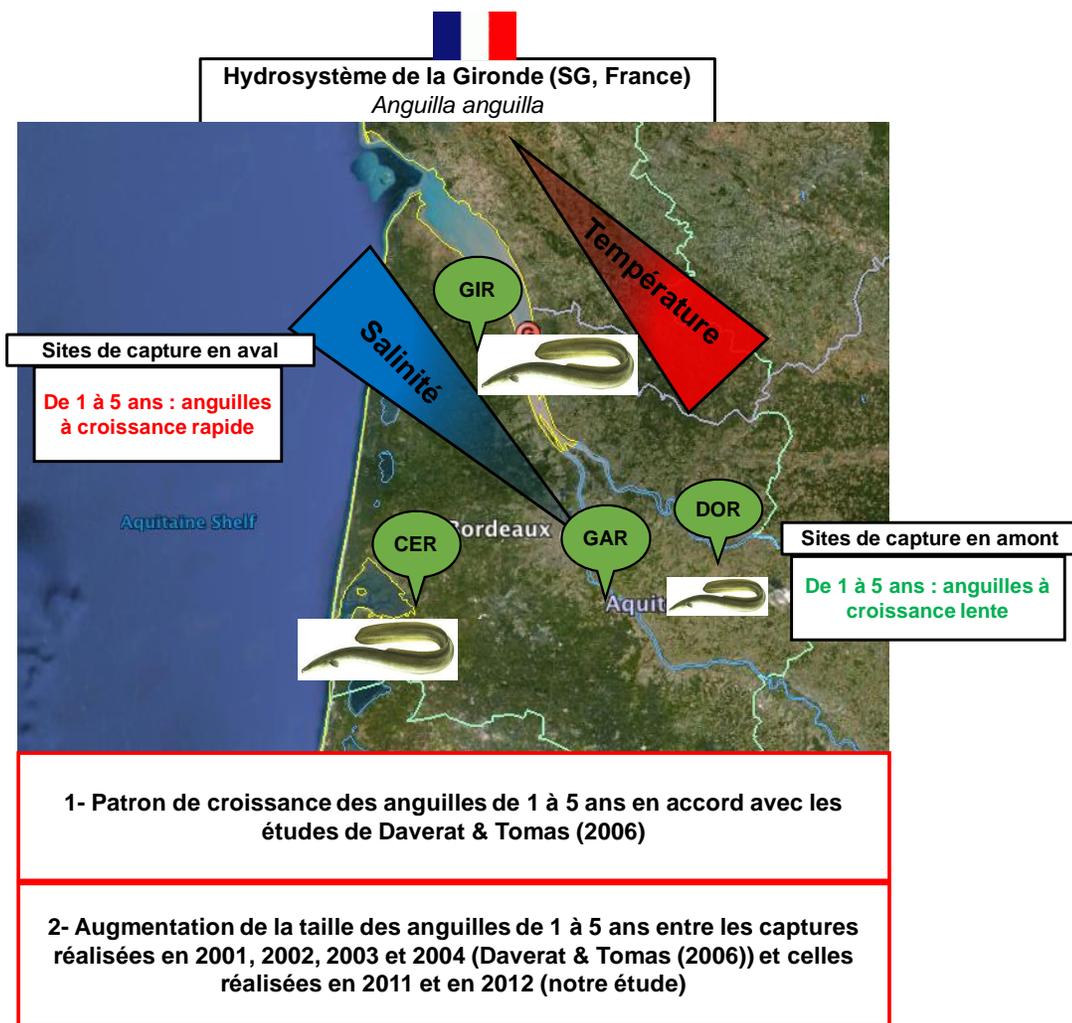


Figure 5.2 : Schéma de synthèse du chapitre 1 dans le cadre du système de la Gironde

5.2 Chapitre 2 : impact de la contamination sur les réponses de biomarqueurs chez l'anguille jaune américaine et européenne en milieu naturel

Les campagnes d'échantillonnage d'anguilles réalisées dans les SG et celles dans le SSL ont permis d'établir un état des lieux de la contamination et des caractéristiques morphométriques des anguilles qui y habitent. Dans le chapitre 1, nous avons tout d'abord mis en évidence des différences de taille à l'âge entre les sites situés en amont et ceux en aval dans le SG et le SSL à la capture mais également à un jeune âge (Figure 5.1). Ces différences morphométriques sont susceptibles d'avoir une influence sur l'accumulation des contaminants chez l'anguille. Chez l'anguille, l'un des facteurs qui détermine l'accumulation des contaminants est la quantité de lipides (Larsson et al. 1991). En effet, il existe une forte corrélation entre les contaminants organiques (lipophiles) et le contenu lipidique. De plus, la quantité de lipides varie en fonction de la croissance et de l'âge. Le taux de croissance de l'anguille diminue avec l'âge tandis que l'accumulation de contaminants augmente avec l'âge (Larsson et al., 1990). Cela s'explique par une dilution des contaminants dans la biomasse chez les anguilles qui grandissent rapidement et une faible et continue augmentation des contaminants chez les anguilles à croissance lente. À cela s'ajoutent d'autres facteurs environnementaux tel que l'habitat et la température qui peuvent avoir un effet sur l'accumulation des contaminants. La contamination affecte la santé de l'anguille durant la phase de croissance (Belpaire et al. 2009). Cependant, comme mentionné précédemment, il reste difficile d'attribuer à la contamination l'ensemble des réponses des biomarqueurs mesurés chez ces individus. En effet, si les milieux comparés ne présentent pas les mêmes conditions environnementales et que les anguilles n'ont pas les mêmes caractéristiques morphométriques, l'interprétation des réponses des biomarqueurs d'effets peut devenir erronée si certains paramètres comme les facteurs biologiques ne sont pas pris en compte.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier les interactions entre les concentrations tissulaires de contaminants organiques et inorganiques, les caractéristiques biologiques telles que la taille, l'âge et les lipides ainsi que les réponses des biomarqueurs (section 1.4) chez les anguilles européennes et américaines. En d'autres termes, il s'agit de répondre aux questions suivantes : (1) Quelles sont les variations spatiales et temporelles des réponses des biomarqueurs chez les anguilles européennes du SG et chez les anguilles américaines du SSL ? (2) En combinant les deux années d'échantillonnage et en séparant les espèces, existe-t-il des relations entre les contaminants (organiques et inorganiques), les caractéristiques biologiques (taille, âge, poids,

lipides) et les biomarqueurs et sont-elles cohérentes avec les variations spatiales et temporelles de biomarqueurs observées ? Enfin, y a-t-il une espèce plus affectée par la contamination que l'autre ?

Dans le SSL, les anguilles des rivières RSO et RSJ, qui étaient de petites tailles, avaient également des poids et des réserves lipidiques inférieurs aux anguilles des LSP et LSF. Les anguilles des LSP et LSF avaient des concentrations en polluants organiques et en mercure supérieures à celles des sites en aval. En plus des différences de croissance, les différences de concentrations tissulaires de contaminants (qui reflètent la contamination de l'habitat) sont les principaux facteurs qui distinguent les anguilles jaunes des sites amont et aval. Par ailleurs, des concentrations tissulaires élevées de Cd et de Pb ont été détectés chez les anguilles de RSO tandis que des concentrations élevées d'As ont été mesurées chez les anguilles de RSJ comparées aux anguilles de LSP et LSF.

Dans un premier temps, les résultats de l'analyse en composantes principales (ACP) chez l'anguille américaine ont permis de mettre en évidence que les contaminants et la morphométrie contribuaient majoritairement à séparer les anguilles en deux groupes : celles des sites en amont du SSL (LSP et LSF) versus celles des sites en aval (RSO et RSJ). Surprenamment, aucune variable « biomarqueurs » ne contribuait à cette séparation ce qui finalement était en accord avec l'absence de différence spatiale observée pour la plupart des biomarqueurs (l'activité d'EROD, la densité et la surface des CMM ainsi que l'accumulation des pigments d'hémosidérine et de lipofuscine dans les CMM de la rate). Seules les réponses des enzymes antioxydantes étaient généralement plus élevées chez les anguilles de RSO comparées aux autres sites. Toutefois, une variation interannuelle de la CAT et de la SOD a été observée chez les anguilles de ce site ainsi que chez celles du LSP.

L'ACP a illustré qu'il n'y avait aucun lien entre l'activité de la CAT, les contaminants et les variables biologiques. Cependant, une relation positive entre les concentrations hépatiques de Cd et l'activité hépatique de la SOD chez les anguilles de RSO a été mise en évidence. Les teneurs significativement plus élevées en Cd chez ces anguilles par rapport aux anguilles de RSJ et LSF pourraient expliquer l'activité élevée de la SOD observée chez ces individus. Cependant, d'autres études expérimentales sont requises pour confirmer la relation cause-effet potentielle de cette faible relation. Malgré l'absence de différence significative observée entre les sites, une accumulation d'hémosidérine dans les CMM de la rate des anguilles de RSO et RSJ a été observée comparativement aux anguilles des sites LSP et LSF. De plus, une corrélation positive et significative entre les dépôts d'hémosidérine et le Pb mesuré dans le muscle et dans

le foie des anguilles de RSO et RSJ a été observé en accord avec des concentrations élevées en Pb chez les anguilles de RSJ. Cependant, étant donné la faible corrélation et l'absence de différence significative entre les sites, il semble difficile de conclure à un possible effet du Pb sur les pigments d'hémosidérine. Toutefois, ces deux résultats suggèrent un possible lien entre une contamination métallique et l'accumulation de pigments d'hémosidérine dans les CMM des anguilles de RSO et RSJ et qu'il serait intéressant de confirmer postérieurement par une étude de laboratoire. De plus, les différences physico-chimiques dans les tributaires de l'estuaire par rapport aux sites fluviaux ainsi que les différences dans la diète et dans le taux d'infestation par divers pathogènes (dont certains pourraient être hémolytiques) pourraient également contribuer à augmenter les dépôts d'hémosidérine aux sites RSJ et RSO.

Dans le SG, les anguilles de DOR considérées comme petites étaient également les moins grasses comparées aux anguilles des autres sites. Les anguilles de GAR étaient significativement plus vieilles et celles de GIR étaient plus grandes et plus grasses que celles de DOR. Un gradient de concentration croissant des contaminants organiques mesurés dans le muscle a été observé le long des sites français dans l'ordre CER-DOR-(GAR et GIR). Des concentrations élevées en métaux non essentiels (Ag, Cd, Pb, Hg et As) dans les tissus ont été mesurées chez les anguilles des sites les plus contaminés GIR et GAR et, étonnamment, chez les anguilles de DOR, un site initialement considéré comme propre (Pannetier et al., 2016).

Comme pour l'anguille américaine, les résultats de l'ACP ont montré que les variables « contaminants » et « morphométrie » contribuaient principalement à séparer les anguilles des sites les plus contaminés GIR et GAR de celles du site de référence CER. Par contre, contrairement à ce qui a été observé chez l'anguille américaine, la plupart des biomarqueurs présentaient des variations spatiales et interannuelles. Les réponses hépatiques d'EROD étaient significativement plus élevées aux sites GAR et GIR comparé aux sites de référence en 2012 mais aucune relation significative avec les contaminants n'a été mise en évidence. Cette réponse n'était donc pas associée à l'exposition aux contaminants persistants présents dans le SG, cependant elle était compatible avec l'hypothèse selon laquelle d'autres facteurs chimiques non mesurés, tels que les HAP, peuvent avoir contribué à l'augmentation de l'activité d'EROD chez les anguilles de GAR et GIR. Les niveaux d'activité de la CAT étaient également généralement plus élevés chez les anguilles de GIR et GAR et reliés aux contaminants organiques de type PCB, PBDE et DDT et ses métabolites mesurés dans le muscle de ces anguilles. Aucune différence entre les sites n'a été observée pour les activités de la SOD. Des densités élevées des CMM dans la rate des anguilles de GAR étaient reliées à la contamination

musculaire en Hg et en Cd tandis que les surfaces élevées des CMM dans la rate des anguilles de GIR étaient reliées à l'âge, la taille et le poids. Les coefficients de corrélation des relations observées entre la densité des CMM, le Hg et le Cd étaient significatifs mais faibles. Une vérification postérieure par une étude de laboratoire par exemple permettrait de confirmer d'un possible effet des deux métaux sur la densité de CMM. Les teneurs élevées d'hémosidérine dans les CMM de la rate des anguilles de CER et GIR étaient reliées à des concentrations élevées d'As et correspondaient aux anguilles des sites d'eau saumâtre. On a pu remarquer que chez les anguilles européennes tout comme chez les anguilles américaines, les teneurs élevées d'hémosidérine dans les CMM étaient présentes chez les anguilles originaires des sites d'eau saumâtre. Pour les deux espèces, il semble nécessaire de confirmer s'il s'agit de l'effet d'un contaminant métallique ou d'autres facteurs en lien avec les conditions de l'habitat qui serait responsable d'une augmentation des dépôts d'hémosidérine dans la rate des anguilles des sites d'eau saumâtre. Finalement, dans notre étude, l'accumulation de lipofuscine dans les CMM observée dans les anguilles de GAR comparativement à celles des autres sites a été associée au vieillissement des anguilles.

À travers ces résultats, l'étude a suggéré que les anguilles européennes originaires du SG semblent plus affectées par les contaminants que leurs cousines américaines du SSL. En effet, les biomarqueurs mesurés dans les anguilles européennes ont montré des réponses élevées aux sites contaminés tandis qu'aucune différence n'a été observée dans le cas de l'anguille américaine. En association avec des concentrations plus élevées observées dans les tissus des anguilles de GAR et de GIR par rapport aux anguilles américaines de LSP et LSF, l'étude suggère un risque plus important d'impacts de contaminants chez l'anguille européenne par rapport aux anguilles américaines.

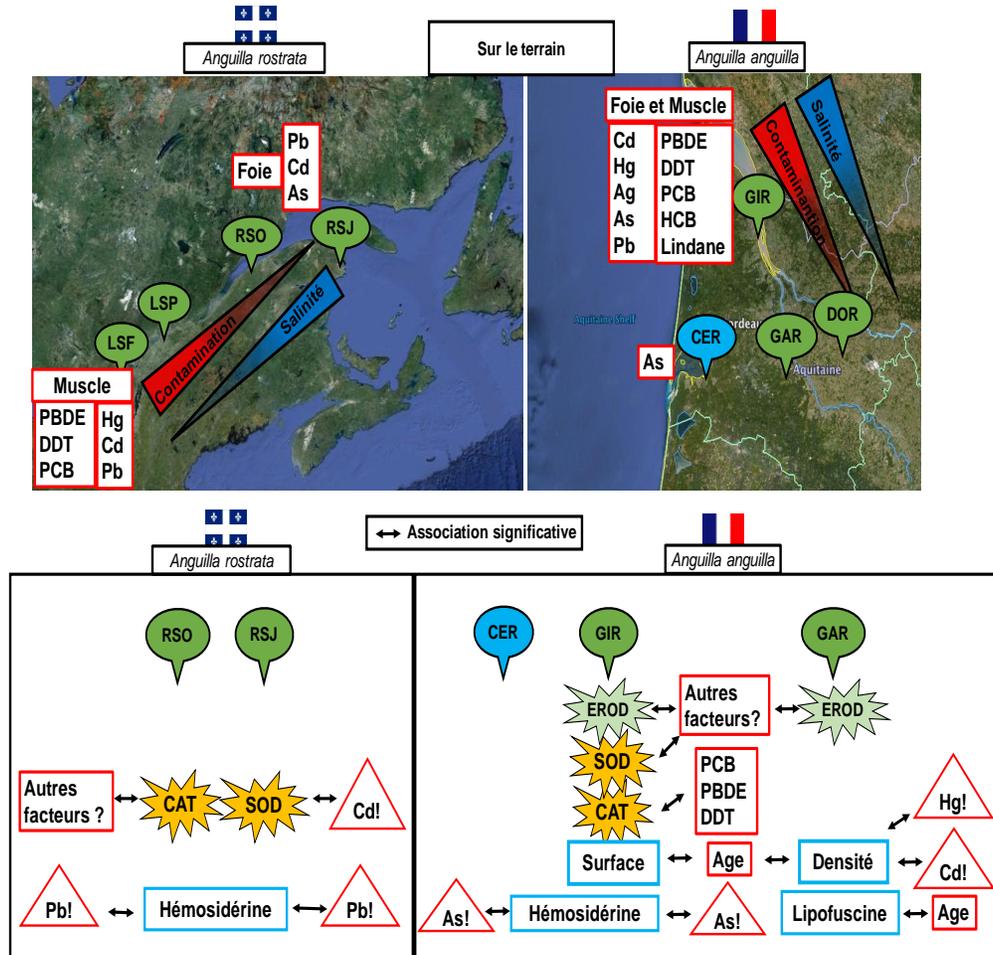


Figure 5.3: Schéma de synthèse du chapitre 2. La partie supérieure du schéma présente la contamination mesurée dans le muscle et le foie des anguilles échantillonnées dans les différents sites ainsi que le gradient de salinité. La partie inférieure résume les principales relations mises en évidence entre les contaminants mesurés dans les anguilles des sites et les réponses des biomarqueurs.

5.3 Chapitre 3 : Effets de l'exposition au cadmium et aux PCB à différentes concentrations, à la sous-alimentation et à la salinité sur l'activité d'EROD et les réponses histopathologiques de la rate chez l'anguille européenne

Au cours du chapitre 2, des différences intersites et interannuelles au niveau des biomarqueurs ont été observées en particulier chez l'anguille européenne dans des sites pollués comparativement aux sites propres. Nous avons également établi des liens entre certains biomarqueurs et contaminants organiques et inorganiques aux sites GIR et GAR et émis des hypothèses sur l'éventuelle influence de facteurs environnementaux comme la salinité et biologiques comme l'âge sur les réponses histologiques des anguilles de GIR, CER et GAR. Si cette étude a permis de créer une base de données pour mieux cibler et prioriser les futures études d'impacts des contaminants sur la santé de l'anguille, les réponses des biomarqueurs ne sont pas toutes explicables et connues chez l'anguille sauvage exposée à des mélanges de contaminants et autres stress environnementaux. En effet, des niveaux élevés d'EROD ont été observés chez les anguilles de GIR et GAR ayant des concentrations élevées en contaminants organiques et aucune relation entre le biomarqueur d'exposition et la contamination n'a été détectée. Avant d'établir des conclusions, il est utile d'évaluer les réponses des biomarqueurs étudiés chez des anguilles exposées à une variété de contaminants et autres stress environnementaux dans des conditions contrôlées.

Dans ce chapitre 3, nous avons donc mesuré l'activité hépatique d'EROD, la densité, la surface des CMM ainsi que les dépôts pigmentaires d'hémosidérine et de lipofuscine des anguilles jaunes européennes exposées à deux types de contaminants, le Cd et un mélange de PCB. Les mesures ont également été effectuées chez des anguilles exposées à des facteurs environnementaux tels que la salinité et la sous-alimentation. L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'impact des différentes conditions énumérées ci-dessus sur la réponse des biomarqueurs. En d'autres termes, il s'agit de répondre aux questions suivantes : (1) Les facteurs biologiques et environnementaux ont-ils une influence sur réponses des biomarqueurs ? (2) Existe-t-il des relations entre les concentrations tissulaires des contaminants (Cd et PCB) et les réponses des biomarqueurs ?

Du fait de la contrainte d'un taux de mortalité élevé, du taux d'ingestion variable et de l'absence de réplication au cours de l'expérience, pour répondre à ces questions, j'ai opté pour l'utilisation d'une ACP entre les facteurs biologiques et les biomarqueurs et de matrices de corrélations

entre les contaminants et les biomarqueurs. Les résultats de l'ACP ont tout d'abord mis en évidence que les activités hépatiques d'EROD étaient reliées au poids et au facteur de condition des anguilles exposées suggérant que les anguilles en bonne condition auraient un meilleur métabolisme et un meilleur fonctionnement des systèmes enzymatiques microsomaux (Whyte et al., 2000). À l'inverse, l'augmentation de la densité des CMM dans la rate a été observée chez les plus petites anguilles en moins bonne condition physiologique. Une relation dose-effet significative entre l'activité hépatique d'EROD et les concentrations musculaires en PCB a confirmé un effet des PCB sur EROD. Ce sont les anguilles exposées à la condition expérimentale « faibles concentrations en PCB » qui avaient les niveaux hépatiques d'EROD et les facteurs de conditions les plus élevées. En accord avec la littérature, une exposition à des concentrations en PCB induit la production des enzymes de biotransformation (Regoli et al. 2003 and Hewitt et al. 1998). Au cours de cette expérience, les effets de la solution de Pyralène utilisée comme mélange de PCB sont pour la première fois étudiés sur l'activité hépatique d'EROD chez *A. anguilla*. Nos résultats constituent donc une nouvelle information et démontrent qu'EROD est un bon indicateur d'exposition à ce mélange de PCB. Aucune relation entre les concentrations hépatiques de Cd et l'induction d'EROD a été observée. Ce résultat est en accord avec la section 1.5 et la littérature (Whyte 2000, Lemaire-gony et lemaire 1992, Lemaire-Gony et al., 1995). En effet comme mentionné dans l'ANNEXE I-1, Lemaire-Gony et Lemaire (1992) n'ont démontré aucune induction d'EROD chez les anguilles européennes exposées à des concentrations similaires de 5µg/l de Cd seul.

La densité de CMM mesurée dans la rate a été mise en relation avec une diminution du facteur de condition chez les anguilles exposées aux fortes concentrations de PCB suggérant une remobilisation des réserves lipidiques en réponse au manque de nourriture. Dans le cas présent, la perte d'appétit pourrait être directement liée au traitement de PCB. De plus, certaines de ces anguilles étaient infestées par le parasite *A. crassus*. Des études antérieures ont révélé que les anguilles infestées présentaient une perte d'appétit et un amaigrissement (Liewes et Schaminee-Main, 1987; Van Banning et Haenen, 1990). Les CMM jouent un rôle important dans les réponses inflammatoires ainsi que dans le stockage et la dégradation ultérieure d'un agent biologique comme par exemple des virus, des bactéries (Wolke 1992). Kirk (2003) a rapporté une augmentation des réponses inflammatoires chez l'anguille européenne infestée associée à une augmentation de la densité des CMM.

Une augmentation de la surface des CMM a été observée chez les anguilles exposées à des concentrations élevées en Cd suggérant un possible effet délétère du Cd. L'effet du Cd sur la surface des CMM de la rate n'a pas été clairement démontré chez le poisson et suggère des études supplémentaires pour vérifier la relation entre le Cd et la surface des CMM. Une corrélation significative a également été observée entre la surface des CMM et les dépôts d'hémosidérine mettant également en évidence d'une accumulation des pigments d'hémosidérine en présence de Cd. En effet, les pigments d'hémosidérine et de lipofuscine sont connus pour s'accumuler dans les CMM de la rate (Wolke, 1992 ; Agius et Roberts, 2003).

L'objectif de cette étude était de tester la possibilité d'identifier et de démêler les effets isolés des contaminants et des facteurs environnementaux lorsqu'ils sont en mélange dans l'environnement sur les réponses d'EROD et des biomarqueurs histopathologiques des anguilles jaunes européennes. L'objectif sous-jacent était d'étudier la possibilité que les facteurs biologiques liés à l'individu influencent également les réponses des biomarqueurs et de tenter de hiérarchiser les effets des contaminants et des facteurs biologiques sur les réponses. Nos résultats ont montré que les activités hépatiques d'EROD mesurées dans les anguilles exposées aux différentes concentrations de PCB étaient fortement induites par l'exposition à la condition « faible concentration en PCB » (de la solution de Pyralène). Bien que des relations positives entre l'activité d'EROD, le facteur de condition ainsi que le poids de l'individu ont été observées, les coefficients de corrélation de Kendall (Tau) étaient faibles et inférieurs à celui des contaminants. L'augmentation de l'activité d'EROD dans les anguilles contaminées a permis de mettre en lumière qu'il s'agit d'un biomarqueur sensible aux composés chimiques qui constituent la solution de Pyralène tels que les PCB coplanaires à de faibles doses. Bien qu'une réponse dose-effet a été obtenus à partir des individus en laboratoire, cette observation ne reflète pas les résultats observés chez les anguilles jaunes prélevées en milieu naturel dans les sites contaminés de la Gironde. En effet, outre les concentrations en PCB mesurées chez les anguilles de GIR et de GAR en 2012 de 2 à 5 fois plus élevées que celles mesurées en laboratoires tout comme les réponses d'EROD, aucune relation avec les concentrations musculaires en PCB n'a été démontré. Bien que les concentrations en PCB, PBDE et DDT mesurées chez les anguilles de GIR et GAR étaient élevées, il semblait que les activités élevées d'EROD répondaient à d'autres facteurs chimiques tel que les HAP connus pour être d'excellent inducteur d'EROD.

Finalement, concernant les biomarqueurs histopathologiques, l'exposition à la salinité dans cette étude n'a pas permis de mettre en évidence un possible effet de la salinité sur l'augmentation

des dépôts d'hémosidérine dans les CMM. Cependant, une augmentation de la surface des CMM chez les anguilles exposées aux plus fortes concentrations de Cd a été associée à une augmentation des dépôts d'hémosidérine. Enfin l'augmentation de la densité des CMM a été observée chez les anguilles exposées à la restriction alimentaire et celles qui ne mangeaient pas la nourriture fortement contaminée par les PCB dans le bac à concentration élevée en PCB. En accord avec l'observation de relations négatives avec le facteur de condition et l'infestation de certaines de ces anguilles par *A. crassus*, il semble y avoir eu une réponse immunitaire qui se traduit par une augmentation du nombre de CMM. En plus du catabolisme tissulaire lié à la restriction alimentaire, l'augmentation observée de la sévérité de l'infestation par *A. crassus* (possiblement liée à une perturbation de la réponse immunitaire) pourrait aussi avoir contribué à la réponse des CMM.

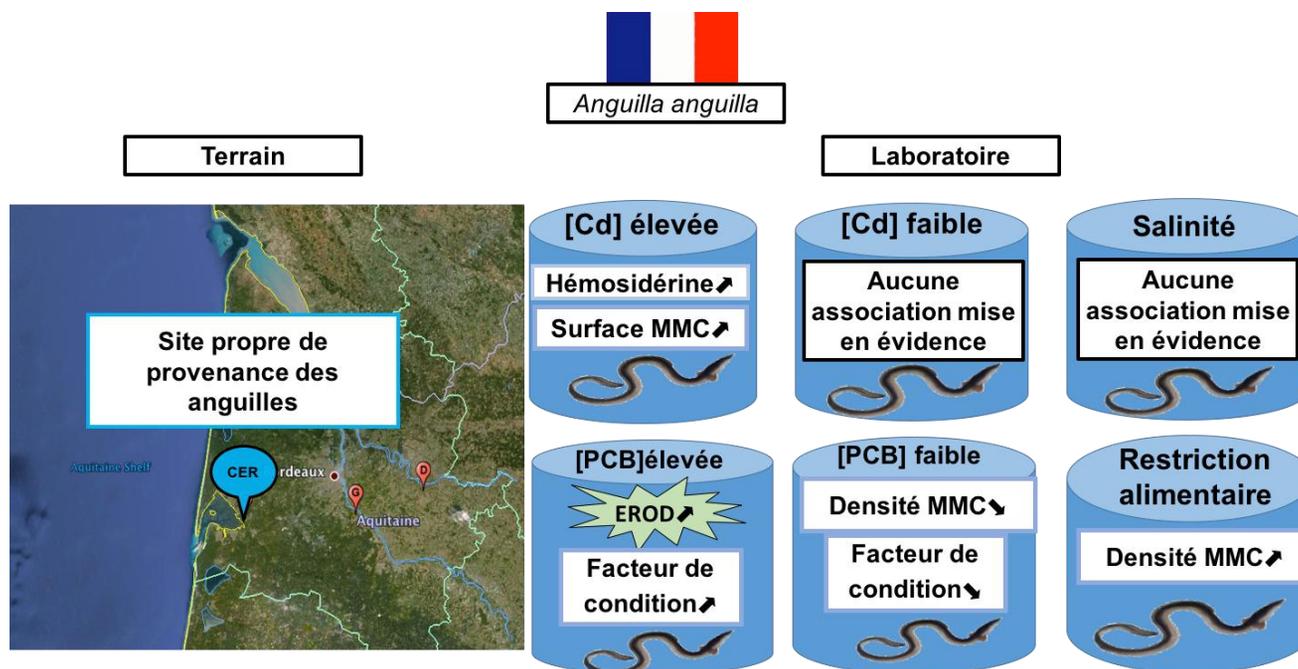


Figure 5.4 : Schéma de synthèse du chapitre 3 dans le cadre de l'expérience en laboratoire.

6. CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET PERSPECTIVES

6.1 Conclusions générales

Au regard de son titre d'espèce menacée et de sa capacité à accumuler de fortes concentrations en contaminants organiques et inorganiques au cours de sa phase de croissance, l'anguille a été retenue dans cette étude pour tenter d'avancer nos connaissances sur les relations entre les facteurs environnementaux, la contamination et sa santé ainsi que la compréhension de la variabilité biologique des deux espèces d'anguille Atlantique échantillonnées dans différents habitats de croissance le long de deux systèmes hydrographiques.

Le premier travail de cette thèse a été d'étudier les variabilités de croissance à un jeune âge chez les anguilles américaines et européennes entre les sites de capture. Le résultat le plus marquant a été l'observation d'une croissance rapide dès l'âge d'un an chez les anguilles qui vont s'établir aux sites LSF et LSP en amont du SSL comparativement à une croissance lente chez celles des sites RSO et RSJ situés en aval du SSL. Cette observation n'avait jamais encore été rapportée et contredit l'actuel paradigme du schéma spatial de la croissance chez les jeunes anguilles du SSL. Pour l'anguille européenne du SG, nos travaux ont démontré une augmentation de la taille à 1 an et à 5 ans des anguilles en comparaison avec l'étude de Daverat & Tomas (2006) menée 10 ans plus tôt. Cependant, les patrons de croissance sont restés identiques, indiquant que le schéma spatial de la croissance à un jeune âge chez les anguilles du SG est resté constant. Notre étude a montré un modèle inverse de taux de croissance précoce de 1 à 5 ans entre les deux espèces. Les anguilles américaines capturées aux sites en amont du SSL avaient des croissances rapides et celles capturées aux sites en aval avaient des croissances lentes contrairement aux anguilles européennes capturées en amont du SG avec des croissances lentes et celles en aval avec des croissances rapides. Ces informations sont utiles pour guider de futures études sur la compréhension des mécanismes menant aux différents écotypes des anguilles d'Atlantique originaires de différents habitats. Ce travail a également montré des similitudes entre les deux espèces. Les tailles rétro-calculées à 1 an des anguilles américaines des sites en amont du SSL (LSP et LSF) étaient similaires à celles des anguilles européennes des sites en aval du SG (CER et GIR) et celles des anguilles américaines des sites en aval du SSL (RSO et RSJ) étaient comparable à celles des anguilles

européennes des sites en amont du SG (DOR et GAR). Ces travaux ont montré l'importance de comprendre les différences écologiques entre les habitats de capture ainsi que les différences de croissance liées à un jeune âge chez les anguilles jaunes capturées dans ces habitats afin de mieux comprendre les variations intersites et interindividuelles des réponses des biomarqueurs.

Les différences de taille et d'âge observées chez les anguilles en milieu naturel auraient pu influencer l'accumulation de contaminants ainsi que les réponses des biomarqueurs. Ces observations ont posé la question sur l'effet de ces différences sur les aspects de contamination et de réponses des biomarqueurs (Vøllestad, 1992, Belpaire et al., 2009).

Chez l'anguille américaine, le premier résultat de l'analyse en composantes principales était le constat notable d'une séparation entre les anguilles des sites LSP et LSF et celles des sites RSO et RSJ majoritairement selon les variables morphométriques et les concentrations en contaminants. À la capture, les anguilles capturées en amont du SSL à croissance rapide à un jeune âge étaient grandes, vieilles et contaminées à la capture tandis que celles capturées en aval du SSL avaient une croissance lente à un jeune âge, étaient petites, jeunes et moins contaminées à la capture. Les sites LSP et LSF étant connus pour leur contamination historique en contaminants organiques et inorganiques via la ville de Montréal et les autres importantes agglomérations urbaines en amont, nous nous attendions donc à ces résultats. Les récentes études de Byer et al. (2013), (2015) ont démontré que les concentrations musculaires en POP ont significativement et considérablement diminué chez les anguilles originaires des sites en amont du SSL en partie suite aux réglementations sur l'interdiction de l'utilisation de certains contaminants et également à la décontamination des sites pollués mis en place depuis les années 1980. Dans notre étude, l'absence de différence significative entre les sites contaminés et propres et l'absence de relation avec la contamination pour la plupart des biomarqueurs mesurés, c'est à dire l'activité d'EROD, de la CAT, la densité et la surface des CMM ainsi que l'accumulation des pigments de lipofuscine dans la rate des anguilles des sites LSP et LSF sont en accord avec ces récentes études sur la contamination des anguilles américaines de la partie fluviale du SSL.

Des activités hépatiques des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) plus élevées ont généralement été observées chez les anguilles des sites de référence (RSO et RSJ) avec une importante variabilité interindividuelle. Une forte variabilité interindividuelle de l'activité hépatique

d'EROD a également été remarquée chez les anguilles du LSP en 2011. Toutefois, il semble difficile d'expliquer en milieu naturel si cette variabilité interindividuelle observée est due à la physiologie ou à la contamination de l'anguille. En particulier, d'autres facteurs non étudiés (concentrations des métabolites des HAP dans la bile, des dioxines et des furannes, de la température de l'eau et de la salinité) pourraient jouer un rôle sur les réponses d'EROD et celles des activités antioxydantes entre les individus. Afin de réduire cette variabilité interindividuelle, dans les futures études, il faudrait augmenter le nombre d'individus lors de l'échantillonnage et l'étendue de l'échantillonnage (par exemple, différents habitats avec différents degrés de contamination dans une même zone) pouvoir détecter un effet potentiel de la contamination. Concernant les réponses élevées des activités antioxydantes ainsi que des tendances élevées de dépôts d'hémosidérine observées chez les anguilles de RSO et RSJ, l'analyse statistique en composantes principales a révélé de faibles relations entre les réponses des capacités antioxydantes et le Cd en accord avec le mécanisme d'action décrit dans la partie 1.4.1 et entre les dépôts d'hémosidérine dans les CMM et le Pb chez ces poissons. Toutefois, ces relations apparaissaient insuffisantes pour conclure sur un lien de cause-effet. De façon générale, dans le cas de l'anguille américaine échantillonnée aux différents sites dans les deux années études, les analyses statistiques n'ont pas identifié d'influence majeure des contaminants organiques et inorganiques sur les réponses des biomarqueurs étudiées.

Chez l'anguille européenne, dans un premier temps, l'analyse en composantes principales a également séparé les anguilles en deux groupes selon les critères morphométriques et de contamination. À la capture, les anguilles du site GIR à croissance rapide à un jeune âge et celles du site GAR à croissance lente à un jeune âge étaient plus grandes, vieilles et contaminées à la capture par rapport aux anguilles à croissance rapide à un jeune âge du marais salant de CER. La contamination semble avoir une influence plus importante sur les réponses des biomarqueurs des anguilles européennes aux sites contaminés (GIR et GAR) que chez les anguilles américaines. En association avec ces observations, un niveau élevé d'activité de la CAT en lien avec les contaminants organiques tels que les DDT, les PCB et les PBDE, une augmentation du nombre de CMM dans la rate en lien avec les concentrations musculaires en Hg et en Cd et enfin une accumulation des dépôts d'hémosidérine dans les CMM en lien avec l'As ont été observés chez les anguilles des sites contaminés GAR et GIR. Cependant, il demeure donc qu'une grande proportion de la variabilité interindividuelle dans les réponses des biomarqueurs n'est pas expliquée par les concentrations tissulaires des contaminants que nous

avons mesurés dans cette étude et que l'implication d'autres facteurs (contaminants ou autres) est à considérer.

L'approche de terrain que nous avons développée au cours de cette thèse a soulevé la probable implication d'autres facteurs non considérés qui pourraient avoir une influence sur les réponses des biomarqueurs. Des études sur le terrain ont déjà indiqué que la sensibilité des biomarqueurs pourrait varier d'un habitat à l'autre en réponse à d'autres contaminants non mesurés dans notre étude tels que les HAP, les dioxines et les furanes (Van der Oost et al., 2003). Une expérience en milieu contrôlé a été menée pour examiner de plus près l'influence des contaminants et quelques facteurs naturels individuellement sur les réponses de biomarqueurs. L'étude réalisée en laboratoire sur les anguilles jaunes européennes a montré une induction de l'activité hépatique d'EROD en lien avec les concentrations en PCB, ce qui n'avait pas pu être observé chez les anguilles européennes de terrain. Cette induction a été observée pour une gamme de concentrations tissulaires de PCB (mélange contenu dans la solution de Pyralène) comprise entre 76 ± 7 et 114 ± 10 ng/g de poids sec ce qui est inférieure à celle mesurée chez les anguilles de terrain capturées aux sites contaminés GIR et GAR et comprise entre 475 ± 256 et 1609 ± 333 ng/g de poids sec (sans lien évident observée avec l'induction d'EROD observée). Dans le cadre de l'expérience de laboratoire, cette réponse semble être liée à la composition du mélange de PCB (solution de pyralène) et peut-être par la présence de composés fortement inducteurs d'EROD tel que certains PCB coplanaires, dioxines et furanes. Des études supplémentaires seraient requises pour déterminer les concentrations individuelles de ces composés accumulés chez les anguilles jaunes.

De même, à la suite des expositions, l'effet du Cd additionné à l'accumulation des dépôts d'hémosidérine dans les CMM semble avoir contribué à l'augmentation de la surface des CMM tandis que l'étude de terrain a plutôt mis en évidence une association entre le Cd avec l'augmentation de la densité des CMM chez les anguilles du site contaminé GAR. Bien que les concentrations hépatiques mesurées chez les anguilles de laboratoire (entre 0,07 et 0,5 $\mu\text{g/g}$ de poids sec) étaient différentes de celles mesurées chez les anguilles de GAR et GIR (entre 2 et 11 $\mu\text{g/g}$ de poids sec), une réponse histopathologique en lien avec le Cd a été observée. Bien qu'un dépôt élevé d'hémosidérine ait été observé chez les anguilles sauvages des sites d'eau saumâtre chez les deux espèces, l'exposition en laboratoire des anguilles à la salinité n'ont pas apporté de conclusions solides concernant les observations de terrain ce qui suggère l'influence d'éventuel autre facteur tel que les métaux, la nourriture ou encore les agents

infectieux présents sur le terrain dans les milieux d'eau saumâtre et absent dans les conditions de laboratoire. Cependant, la relation observée entre l'augmentation des surfaces de CMM et celle des pigments d'hémosidérine chez les anguilles en laboratoire pourraient possiblement expliquer l'observation sur le terrain des surfaces élevées et des hautes teneurs d'hémosidérine dans les CMM des anguilles européennes du site GIR. Cependant, des études supplémentaires seraient utiles pour valider ces relations mises en évidence en laboratoire et sur le terrain.

Pour conclure, du fait de la capacité exceptionnelle de l'anguille à s'adapter à son milieu et à bioaccumuler de multiples contaminants, l'ensemble de ces travaux a montré l'intérêt probant de connaître la biologie des individus échantillonnés en milieu naturel et de les catégoriser selon leur taille et leur âge avant d'interpréter les réponses des biomarqueurs. L'intégration des facteurs biologiques, environnementaux et de la contamination dans l'interprétation des réponses des biomarqueurs a permis d'éviter la surinterprétation des réponses des biomarqueurs avec la contamination. Notre étude a révélé des similitudes chez les deux espèces validant leur utilisation dans des études écotoxicologiques comparatives. En effet, le premier chapitre de la thèse a montré que les tailles à 1 an des anguilles américaines à croissance rapide étaient identiques à celles des anguilles européennes à croissance rapide et la même chose a été observée pour les anguilles à croissance lente des deux espèces. Au cours de chapitre 2, les niveaux de base de l'activité hépatique d'EROD entre les anguilles américaines et européennes des sites de références étaient similaires. Enfin, nous avons également mis en évidence une accumulation des dépôts d'hémosidérine dans les CMM aussi bien chez les anguilles américaines qu'europeennes des sites d'eau saumâtre. L'ensemble de ces observations encourage fortement de poursuivre l'étude comparée des deux espèces dans les futures investigations.

6.2 Perspectives de recherche

Bien que ce projet de recherche ait fourni des informations pertinentes sur les caractéristiques morphométriques des anguilles habitant le long des systèmes du Saint-Laurent et de la Gironde et sur les réponses des capacités antioxydantes et histopathologiques en lien avec la contamination organique et inorganique en particulier chez l'anguille européenne des sites pollués, certaines limites liées à l'échantillonnage des anguilles (30 anguilles capturées par site et par année, utilisation de différents engins de pêche), au large éventail d'âge estimé (2 à 18 ans), à la biologie unique des anguilles, la variabilité de leur croissance au cours de leur vie et

leur large répartition géographique ont pu constituer des biais à l'interprétation des données et ont rendu cette étude un défi en toute circonstance. Les sites d'échantillonnage dans cette étude ont été choisis pour représenter des gradients de pression anthropique et de caractéristiques écologiques. Néanmoins, les sites sélectionnés ne peuvent être considérés comme représentatifs de la vaste gamme d'habitats que ces espèces occupent. En milieu naturel, la réponse des biomarqueurs peut varier d'un habitat à l'autre en réponse à des facteurs confondants qui n'ont pas été mesurés tels que les HAP, les dioxines et les furanes et d'autres conditions environnementales. Ainsi, une première avenue à explorer suite à ce projet serait d'effectuer une campagne de terrain avec un plus grand nombre d'anguilles et une plus petite gamme d'âge lors de la capture et avec une meilleure représentativité de chaque zone d'échantillonnage (en augmentant l'étendue et le nombre d'anguilles par zone). Cela permettrait de diminuer les différences morphométriques entre les individus et d'appréhender une meilleure compréhension des réponses des biomarqueurs.

D'autre part, nos résultats suggèrent que, pour l'anguille américaine échantillonnée le long du système du Saint-Laurent, les individus âgés de 1 à 5 ans à croissance rapide semblent plus susceptibles de coloniser la tête du Saint-Laurent que les individus à croissance lente et conséquemment. Pour rappel, ces différences de croissance ont été observées dès l'âge de 1 an alors qu'elles n'étaient pas encore arrivées dans leur habitat de croissance et qu'elles étaient toutes au même endroit. Ceci suggère que l'habitat de croissance n'a pas eu d'influence sur le taux de croissance. Ces résultats supportent davantage les hypothèses liées à la littérature que la sélection génétique variable selon les habitats et/ou que le génotype des jeunes anguilles (premiers stades de vie, avant 1 an) dépendant du choix de l'habitat pourraient contribuer à la variation spatiale observée des taux de croissance des jeunes anguilles. Des études complémentaires de laboratoire et de génétique approfondies (par exemple, sur l'expression différentielle des gènes entre les anguilles d'origines géographiques différentes) associées à un échantillonnage intensif d'anguilles au stade civelle de l'estuaire du Saint-Laurent au lac Ontario sont nécessaires pour tester ces hypothèses. De plus, des études de terrain sont également nécessaires pour démontrer que les anguilles sauvages plus jeunes qui croissent actuellement dans la partie amont du Saint-Laurent affichent toujours une grande taille et un âge à la migration typique des anguilles de ce secteur. Il s'avère important d'étudier les variations du taux de croissance à un jeune âge des anguilles jaunes sur une plus grande gamme de sites allant de la partie supérieure du fleuve du Saint-Laurent jusqu'au LSP. Des études comparatives des deux espèces d'anguilles aideraient à mieux comprendre les relations entre les différences

de taux de croissance, la taille, la métamorphose, l'accumulation de lipides, la différenciation sexuelle et leurs bases génétiques et environnementales dans ces deux espèces.

D'autres avenues de recherche secondaires sont aussi à considérer pour vérifier les relations observées entre la contamination et les réponses de biomarqueurs sur le terrain qui n'ont pas été vérifiées dans les conditions expérimentales. Par exemple, la cause des teneurs élevées d'hémosidérine observées dans les CMM des anguilles des sites d'eaux saumâtres chez les deux espèces semble incertaine. Chez l'anguille européenne, l'accumulation d'hémosidérine est fortement associée à l'As, alors que chez l'anguille américaine, elle est faiblement associée au Pb. Il serait intéressant de vérifier en laboratoire si ces relations sont présentes et significatives et s'il ne s'agit pas d'autres facteurs comme les changements environnementaux, l'accumulation d'agents potentiellement hémolytiques dans les anguilles Atlantiques des eaux saumâtres. De plus, de telles observations ouvrent la porte sur l'impact potentiel de l'accumulation de dépôts d'hémosidérine dans les CMM sur l'intégrité des cellules sanguines et sur la fonction immunitaire des anguilles.

Comme abordé brièvement dans la section 2.1, le projet IMMORTEEL a permis de mettre en lumière un certain nombre de résultats sur d'autres aspects de l'anguille tel que les capacités métaboliques et l'expression génique liée à la contamination. Tout d'abord, les travaux de Caron et al. (2016) ont mis en évidence une diminution de l'activité de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) intervenant dans le métabolisme des lipides du foie en lien avec des concentrations élevées d'Ag, de Pb et d'As. Cette observation suggère un effet de la contamination métallique sur la synthèse lipidique. Il a également montré des relations positives entre le Cd et l'âge et entre le Cd et le facteur de condition. Baillon et al. (2015) ont observé que le Cd et l'As étaient reliés au taux de transcription d'un grand nombre de gènes. Parmi l'ensemble des contaminants, les résultats suggéraient que l'As, même à faibles concentrations, représentait un fort potentiel toxique pour les anguilles. Parmi les gènes identifiés, aucun ne codait pour les enzymes du stress oxydatif et du stress général tels que les métallothionéines suggérant l'intervention possible de facteurs naturels comme facteurs confondants. Dans notre étude, nous avons également démontré des liens entre l'As et le Pb et les hautes teneurs en hémosidérine ainsi qu'une augmentation de l'activité antioxydante de la SOD en lien avec le Cd. De plus, l'ensemble de ces études a rapporté les mêmes conclusions, soit un risque plus important d'impacts de contaminants chez l'anguille européenne par rapport aux anguilles américaines. Comme prévu initialement dans le projet IMMORTEEL, il serait donc souhaitable et

indispensable de comparer l'ensemble de ces résultats afin d'avoir une approche globale de l'impact de la contamination sur la santé des anguilles jaunes originaires du SSL et du SG.

Enfin, l'ensemble des connaissances apportées par notre étude ne peut qu'aider à raffiner les stratégies de conservation de ces deux espèces en danger. Dans le cas de la situation de l'anguille américaine, les différences de croissance dès un jeune âge chez les anguilles originaires de l'amont du SSL versus celles originaires de l'aval du SSL en association avec les travaux de Côté et al. (2009), (2014) et (2015) qui ont démontré que les anguilles colonisant différents plans d'eau ne sont pas génétiquement homogènes implique de limiter lesensemencements de jeunes anguilles provenant de différents habitats afin de restaurer la population locale d'anguilles. Notre étude a également suggéré un risque plus important d'impacts des contaminants chez les anguilles européennes des sites contaminés GAR et GIR par rapport aux anguilles américaines des sites contaminés LSP et LSF ce qui permet de constater l'efficacité de la politique mise en œuvre au Canada pour réhabilitation des sites contaminés à partir des années 1990 et le besoin de continuer les efforts dans l'amélioration de la qualité des eaux du SG. Pour l'anguille américaine, ni l'analyse en composantes principales, ni les approches de statistiques conventionnelles n'ont identifié d'influence majeure des contaminants organiques ou inorganiques sur les réponses d'EROD, de la CAT et des biomarqueurs histopathologiques. Cependant, les contaminants tels que les HAP, les dioxines et les furanes mais également les pesticides, les détergents et les effluents municipaux non mesurés dans notre étude, sont connus pour induire les enzymes de biotransformation, antioxydantes et les biomarqueurs histopathologiques à court et à long terme (Van der Oost et al., 2003). Dans des futures études, les mesures des concentrations musculaires des dioxines et des furannes ainsi que les concentrations biliaires des métabolites des HAP permettraient d'améliorer la compréhension de la variabilité des réponses des biomarqueurs et également de raffiner nos connaissances sur l'état de contamination des eaux du SSL par ces produits chimiques. Concernant l'anguille européenne, l'augmentation de la taille des civelles à 1 an par rapport à 10 ans plus tôt chez des individus d'âge comparable (Daverat et Tomas, 2006) suggère dans de futures études d'intégrer l'impact des changements climatiques, plus en particulier l'augmentation de la température sur le développement des jeunes anguilles. En effet, dans la récente étude de Yokouchi et Daverat (2013), les trajectoires de croissance individuelle des anguilles européennes femelles capturées dans le bassin de la Gironde, en France, ont été modélisées en fonction de leur histoire de vie, de l'utilisation de l'habitat et des variations thermiques par rapport aux événements climatiques régionaux. Cette étude a mis en évidence

qu'une augmentation des températures (un été modéré et un hiver chaud) avait un effet positif sur la croissance des anguilles, alors qu'un pic de chaleur (augmentation rapide et élevée des températures) pourrait avoir un effet négatif sur la croissance. L'ensemble de ces résultats combinés à ceux de notre étude sont intéressants et utiles pour estimer l'effet du changement climatique mondial sur la croissance et la distribution des anguilles aux niveaux local et régional.

7. BIBLIOGRAPHIE

- Adam, G., 1997. L'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L. 1758) : dynamique de la sous-population du lac de Grand-Lieu en relation avec les facteurs environnementaux et anthropiques. Thèse de doctorat en hydrobiologie. Toulouse III : Université Paul Sabatier, 353 p.
- Agius, C., 1979. The role of melano-macrophage centres in iron storage in normal and diseased fish. *Journal of Fish Diseases* 2, 337-343.
- Agius, C., 1985. The melano-macrophage centres in fish: a review. In: *Fish Immunology* (ed. By Manning, M.J. et Tatner, M.F.), pp. 85-105. Academic Press, London.
- Agius, C., Roberts, R., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26, 499-509.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2004. Enzymatic and nonenzymatic antioxidants as an adaptation to phagocyte-induced damage in *Anguilla anguilla* L. following in situ harbor water exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 290-302.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere* 65, 952-962.
- Alberto, W.D., Pilar, D.M.D., Valeria, A.M., Fabiana, P.S., Cecilia, H.A., Maria, B., 2001. Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality – A case study: Suquia River basin (Cordoba, Argentina), *Water Research* 35(12), 2881–2894.
- Amilhat, E., 2007. Etat sanitaire de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* dans le bassin Rhône Méditerranée et Corse : synthèse bibliographique. Rapport Pôle lagunes et Cépralmar. CBETM, Université de Perpignan. 88p.
- Antunes, C., Tesch, F.W., 1997. A critical consideration of the metamorphosis zone when identifying daily rings in otoliths of European eel, *Anguilla anguilla* (L.). *Ecology of Freshwater Fish* 6(2), 102-107.
- Arai, T, Chino, N., 2012. Diverse migration strategy between freshwater and seawater habitats in the freshwater eel genus *Anguilla*. *Journal of Fish Biology* 81, 442-455.
- Au, D.W.T., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48(9-10), 817-834.
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Jouanneau, J.M., 2004. Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environmental Pollution* 132, 413-426.
- Avise, J.C., 2003. Catadromous eels of the North Atlantic: a review of molecular genetic findings relevant to natural history, population structure, speciation, and phylogeny. *Eel Biology*. Springer, pp. 31-48.

- Baillon, L., 2015. Etude de l'impact des contaminants métalliques et organiques chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) et américaine (*Anguilla rostrata*) au moyen d'approches transcriptomiques. Géochimie. Université de Bordeaux, 2015. Thèse de doctorat, pp. 261.
- Baillon, L., Pierron, F., Coudret, R., Normandeau, E., Caron, A., Peluhet, L., Labadie, P., Budzinski, H., Durrieu, G., Sarraco, J., 2015. Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology* 24, 71-84.
- Baillon, L., Pierron, F., Oses, J., Pannetier, P., Normandeau, E., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., Lambert, P., Bernatchez, L., 2016a. Detecting the exposure to Cd and PCBs by means of a non-invasive transcriptomic approach in laboratory and wild contaminated European eels (*Anguilla anguilla*). *Environmental Science and Pollution Research* 23, 5431-5441.
- Baillon, L., Pierron, F., Pannetier, P., Normandeau, E., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., Lambert, P., Bernatchez, L., Baudrimont, M., 2016b. Gene transcription profiling in wild and laboratory-exposed eels : Effect of captivity and in situ chronic exposure to pollution. *Science of The Total Environment* 571, 92-102.
- Barry, J., Newton, M., Dodd, J., Evans, D., Newton, J., Adams, C.E., 2017. The effect of foraging and ontogeny on the prevalence and intensity of the invasive parasite *Anguillicola crassus* in the European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of fish diseases*. doi:10.1111/jfd.12596
- Baudrimont, M., De Montaudouin, X., Palvadeau, A., 2006. Impact of digenean parasite infection on metallothionein synthesis by the cockle (*Cerastoderma edule*): a multivariate field monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 52, 494-502.
- Belpaire, C.G.J., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., Hagel, P., De Boer, J., 2009. Decreasing eel stocks: survival of the fattest? *Ecology of Freshwater Fish* 18, 197-214.
- Benchetrit, J., Béguer-Pon, M., Sirois, P., Castonguay, M., Fitzsimons, J., Dodson, J.J., 2017. Using otolith microchemistry to reconstruct habitat use of American eels *Anguilla rostrata* in the St. Lawrence River-Lake Ontario system. *Ecology of Freshwater Fish* 26, 19-33.
- Blazer, V.S., 1992. Nutrition and disease resistance in fish. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 309-323.
- Bodin, N., Budzinski, H., Le Ménach, K., Tapie, N., 2009. ASE extraction method for simultaneous carbon and nitrogen stable isotope analysis in soft tissues of aquatic organisms. *Analytica Chimica Acta* 643, 54-60.
- Boehlert, G.W., Mundy, B.C., 1988. Roles of behavioral and physical factors in larval and juvenile fish recruitment to estuarine nursery areas. *American Fisheries Society Symposium*, pp. 1-67.
- Boivin, B., Castonguay, M., Audet, C., Pavey, S., Dionne, M., Bernatchez, L., 2015. How does salinity influence habitat selection and growth in juvenile American eels *Anguilla rostrata*? *Journal of fish biology* 86, 765-784.

- Bonhommeau, S., Chassot, E., Planque, B., Rivot, E., Knap, A.H., Le Pape, O., 2008. Impact of climate on eel populations of the Northern Hemisphere. *Marine Ecology Progress Series* 373, 71-80.
- Bonhommeau, S., Le Pape, O., Gascuel, D., Blanke, B., Tréguier, A.M., Grima, N., Vermard, Y., Castonguay, M., Rivot, E., 2009. Estimates of the mortality and the duration of the trans-Atlantic migration of European eel *Anguilla anguilla* leptocephali using a particle tracking model. *Journal of Fish Biology* 74, 1891-1914.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- Braunbeck, T., 1998. Cytological alterations in fish hepatocytes following in vivo and in vitro sublethal exposure to xenobiotics—structural biomarkers of environmental contamination. In: Braunbeck, T., Streit, B., Hinton, D.E. (Eds.), *Fish Ecotoxicology*. Birkhauser Verlag, Switzerland pp. 61–140.
- Brothers, E.B., Mathews, C.P., Lasker, R., 1976. Daily growth increments in otoliths from larval and adult fishes. *Fishery Bulletin* 74, 1-8.
- Bruslé, J., 1990. Effects of heavy metals on eels, *Anguilla* sp. *Aquatic living resources* 3, 131-141.
- Bryan, G., Langston, W., 1992. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environmental pollution* 76, 89-131.
- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Pierard, C., Garrigues, P., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58, 85-97.
- Buet, A., Banas, D., Voltaire, Y., Coulet, E., Roche, H., 2006. Biomarker responses in European eel (*Anguilla anguilla*) exposed to persistent organic pollutants. A field study in the Vaccarès lagoon (Camargue, France). *Chemosphere* 65, 1846-1858.
- Burton, J., 1998. Le Saint-Laurent et les grands fleuves du monde. Sur *Plan Saint-Laurent*, le 16 juin 2011.
- Byer, J.D., 2013. Organohalogenated persistent organic pollutants in American eel (*Anguilla rostrata*) captured in eastern Canada. Department of chemistry, Queen's University Kingston, Ontario, Canada. Ph.D Thesis, pp. 259.
- Byer, J.D., Lebeuf, M., Trottier, S., Raach, M., Alae, M., Brown, R.S., Backus, S., Casselman, J., Hodson, P.V., 2015. Trends of POPs in American eel (*Anguilla rostrata*) from Eastern Lake Ontario. Canada. *Science of the Total Environment* 529, 231-242.
- Cairns, D.K., Secor, D.A., Morrison, W.E., Hallett, J.A., 2009. Salinity-linked growth in anguillid eels and the paradox of temperate-zone catadromy. *Journal of Fish Biology* 74, 2094-2114.
- Campana, S.E., 1990. How reliable are growth back-calculations based on otoliths? *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 47, 2219-2227.

- Caron, A., Pannetier, P., Rosabal-Rodriguez, M., Budzinski, H., Lauzent, M., Labadie, P., Nasri, B., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. Organic and inorganic contamination impacts on metabolic capacities in American and European yellow eels. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2015-0473>.
- Castelle, S., Schäfer, J., Blanc, G., Audry, S., Etcheber, H., Lissalde, J.P., 2007. 50-year record and solid state speciation of mercury in natural and contaminated reservoir sediment. *Applied Geochemistry* 22, 1359-1370.
- Chapman, P.M., Wang, F., 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 3-22.
- Chiffolleau, J.F., 2005. Distribution of silver in mussel and oysters along the French coasts: Data from the national monitoring program. *Marine Pollution Bulletin* 50, 1713-1744.
- Church, J.A., Gregory, J.M., White, N.J., Platten, S.M., Mitrovica, J.X., 2011. Understanding and projecting sea level change. *Oceanography* 24, 130-143.
- Claisse, D., 1989. Chemical contamination of french coasts: The results of a ten years mussel watch. *Marine Pollution Bulletin*, 20, 523-528.
- Corsi, I., Mariottini, M., Badesso, A., Caruso, T., Borghesi, N., Bonacci, S., Iacocca, A., Focardi, S., 2005. Contamination and sub-lethal toxicological effects of persistent organic pollutants in the European eel (*Anguilla anguilla*) in the Orbetello lagoon (Tuscany, Italy). *Hydrobiologia* 550, 237-249.
- COSEWIC, 2006. COSEWIC assessment and status report on the american eel *Anguilla rostrata* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. X + 71 pp.
- COSEWIC, 2012. Assessment and status report on the American Eel *Anguilla rostrata* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. xii + 109 pp.
- Côté, C.L., Castonguay, M., Verreault, G., Bernatchez, L., 2009. Differential effects of origin and salinity rearing conditions on growth of glass eels of the American eel *Anguilla rostrata*: implications for stocking programmes. *Journal of Fish Biology* 74, 1934-1948.
- Côté, C.L., Castonguay, M., Kalujnaia, M.S., Cramb, G., Bernatchez, L., 2014. In absence of local adaptation, plasticity and spatially varying selection rule: a view from genomic reaction norms in a panmictic species (*Anguilla rostrata*). *BMC Genomics* 15, 403.
- Couillard, C.M., Hodson, P.V., 1996. Pigmented macrophage aggregates: A toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1844-1854.
- Couillard, C.M., Hodson, P.V., Castonguay, M., 1997. Correlation between pathological changes and chemical contamination in American eels, *Anguilla rostrata*, from the St Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 1916-1927.

- Couillard, C.M., Williams, P.J., Courtenay, S.C., Rawn, G.P., 1999. Histopathological evaluation of Atlantic tomcod (*Microgadus tomcod*) collected at estuarine sites receiving pulp and paper mill effluent. *Aquatic Toxicology* 44, 263–278.
- Couillard, C.M., Wirgin, I., Lebeuf, M., Legare, B., 2004. Reduction of cytochrome P4501A with age in Atlantic tomcod from the St. Lawrence Estuary, Canada: relationship with emaciation and possible effect of contamination. *Aquatic toxicology* 68, 233-247.
- Couillard, C.M., Courtenay, S.C., Macdonald, R.W., 2008. Chemical–environment interactions affecting the risk of impacts on aquatic organisms: A review with a Canadian perspective—interactions affecting vulnerability. *Environmental Reviews* 16, 19-44.
- Cruz, J.M., 2015. Étude de la contamination par les pesticides des milieux eau, air et sols : développement de nouveaux outils et application à l'estuaire de la Gironde. Thèse de doctorat, université de Bordeaux.
- Daverat, F., Beaulaton, L., Poole, R., Lambert, P., Wickström, H., Andersson, J., Aprahamian, M., Hizem, B., Elie, P., Yalçın-Özdilek, S., 2012. One century of eel growth: changes and implications. *Ecology of Freshwater Fish* 21, 325-336.
- Daverat, F., Tomás, J., 2006. Tactics and demographic attributes in the European eel *Anguilla anguilla* in the Gironde watershed, SW France. *Marine Ecology-Progress Series* 307, 247-257.
- Daverat, F., Tomas, J., Lahaye, M., Palmer, M., Elie, P., 2005. Tracking continental habitat shifts of eels using otolith Sr/Ca ratios: validation and application to the coastal, estuarine and riverine eels of the Gironde–Garonne–Dordogne watershed. *Marine and Freshwater Research* 56, 619-627.
- Depledge, M., Fossi, M., 1994. The role of biomarkers in environmental assessment (2). *Ecotoxicology* 3, 161-172.
- Drouineau, H., Mahevas, S., Bertignac, M., Fertin, A., 2008. Assessing the impact of discretisation assumptions in a length-structured population growth model. *Fisheries Research* 91, 160-167.
- Ducharne, A., Habets, F., Déqué, M., Evaux, L., Hachour, A., Lepaillier, A., Lepelletier, T., Martin, E., Oudin, L., Pagé, C., Ribstein, P., Sauquet, E., Thiéry, D., Terray, L., Viennot, P., Boe, J., Bourqui, M., Crespi, O., Gascoïn, S., Rieu, J., 2009. In: *Projet RExHySS: Impact du changement climatique sur les Ressources en eau et les Extrêmes Hydrologiques dans les bassins de la Seine et la Somme*. Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement durable et de la Mer, Paris, France.
- Durrieu, G., Maury-Brachet, R., Girardin, M., Rochard, E., Boudou, A., 2005. Contamination by heavy metals (Cd, Zn, Cu, and Hg) of eight fish species in the Gironde estuary (France). *Estuaries* 28, 581-591.
- Edeline, E., Dufour S., Elie, P., 2005. Role of glass eel salinity preference in the control of habitat selection and growth plasticity in *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology Progress Series* 304, 191-199.

- Edeline, E., Beaulaton, L., Le Barh, R., Elie, P., 2007. Dispersal in metamorphosing juvenile eel *Anguilla anguilla*. *Marine Ecology Progress Series* 344, 213-218.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N., 2001. Toxic metals and oxidative stress. Part 1. Mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current Topic in Medicinal Chemistry* 1, 529–539.
- Fenet, H., Casellas, C., Bontoux, J., 1996. Hepatic enzymatic activities of the European eel *Anguilla anguilla* as a tool for biomonitoring freshwater streams: laboratory and field caging studies. *Water Science and Technology* 33, 321-329.
- Feunteun, E., Marion, L., 1994. Assessment of Grey Heron predation on fish communities: the case of the largest European colony. *Hydrobiologia* 279/280, 327-344
- Feunteun, E., 2002. Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): an impossible bargain. *Ecological Engineering* 18, 575-591.
- Feunteun, E., Acou, A., Laffaille, P., Legault, A., 2000. European eel (*Anguilla anguilla*): prediction of spawner escapement from continental population parameters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 57, 1627-1635.
- Ficke, A.D., Myrick, C.A., Hansen, L.J., 2007. Potential impacts of global climate change on freshwater fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 17, 581-613.
- Fonseca, V., Franca, S., Vasconcelos, R., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M., Cabral, H., 2011. Short-term variability of multiple biomarker response in fish from estuaries: Influence of environmental dynamics. *Marine Environmental Research* 72, 172-178.
- Fontenelle, G., Feunteun, E., Briand, C., 1997. French report. *In* Management of European eel fisheries. *Edited by* C. Moriarty and W. Dekker. *Irish Fisheries Bulletin*, No.15, 75-81 pp.
- Förster, H., Lilliestam, J., 2010. Modeling thermoelectric power generation in view of climate change. *Regional Environmental Change* 10, 327-338.
- Fragoso, N.M., Parrott, J.L., Hahn, M.E., Hodson, P.V., 1998. Chronic retene exposure causes sustained induction of CYP1A activity and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 2347-2353.
- Francis, R., 1990. Back-calculation of fish length: a critical review. *Journal of Fish Biology* 36, 883-902.
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19, 239-266.
- Gobeil, C., Rondeau, B., Beaudin, L., 2005. Contribution of municipal effluents to metal fluxes in the St. Lawrence River. *Environmental Science & Technology* 39, 456-464.
- Gorbi, S., Baldini, C., Regoli, F., 2005. Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L.(*Anguillidae*) and striped mullet *Mugil cephalus* L.(*Mugilidae*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49, 62-70.

- Gravato, C., Guimarães, L., Santos, J., Faria, M., Alves, A., Guilhermino, L., 2010. Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*Anguilla anguilla*) from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 524-533.
- Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M., Santos, M., 2006. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L.–the influence of pre-exposure to β -naphthoflavone. *Chemosphere* 65, 1821-1830.
- Guimarães, D.O., Pereira, L.C.C., Monteiro, M.C., Gorayeb, A., Costa, R.M., 2009. Effects of the urban influence on the Cereja River and Caeté Estuary (Amazon littoral, Brazil). *Proceedings of the 10th International Coastal Symposium, Journal of Coastal Research, Special Issue* 156,1219-1223 pp.
- Hamilton, S.J., Mehrle, P.M., 1986. Metallothionein in fish: review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Transaction of the American Fisheries Society* 115, 596-609.
- Hewitt, S., Fenet, H., Casellas, C., 1998. Induction of EROD activity in European eel (*Anguilla anguilla*) by different polychlorobiphenyls (PCBs). *Water Science and Technology* 38, 245-252.
- Hinton, D.E., Baumann, P.C., Gardner, G.R., Hawkins, W.E., Hendricks, J.D., Murchelano, R.A., Okihiro, M.S., 1992. Histopathologic biomarkers. In: Huggett, R.J., Kimerle, R.A., Mehrle, P.M., Bergman, H.L.(Eds.), *Biomarkers. Biochemical, Physiological, and histological markers of anthropogenic stress*. Lewis, Chelsea, MI, pp.155-209.
- Hodson, P.V., Efler, S., Wilson, J.Y., El-Shaarawi, A., Maj, M., Williams, T.G., 1996. Measuring the potency of pulp mill effluents for induction of hepatic mixed-function oxygenase activity in fish. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 49, 83-110.
- Hylland, K., Nissen-Lie, T., Christensen, P., Sandvik, M., 1998. Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L. *Marine Environmental Research* 46, 51-55.
- IUCN, 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/>.
- Iwanowicz, L.R., Blazer, V.S., McCormick, S.D., VanVeld, P.A., Ottinger, C.A., 2009. Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Aquatic toxicology* 93, 70-82.
- Jessop, B.M., Shiao, J.C., Iizuka, Y., Tzeng, W.N., 2002. Migratory behaviour and habitat use by American eels *Anguilla rostrata* as revealed by otolith microchemistry. *Marine Ecology Progress Series* 233, 217-229.
- Jessop, B.M., Shiao, J.C., Iizuka, Y., Tzeng, C.S., 2004. Variation in the annual growth, by sex and migration history, of silver American eels, *Anguilla rostrata*. *Marine Ecology Progress Series* 272, 231-244.
- Jessop, B.M., Shiao, J.C., Iizuka, Y., Tzeng, W.N., 2007. Effects of inter-habitat migration on the evaluation of growth rate and habitat residence of American eels *Anguilla rostrata*. *Marine Ecology Progress Series* 342, 255-263.

- Jessop, B.M., 2010. Geographic effects on American eel (*Anguilla rostrata*) life history characteristics and strategies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 67, 326-346.
- Kammann, U., Askem, C., Dabrowska, H., Grung, M., Kirby, M.F., Koivisto, P., Lucas, C., McKenzie, M., Meier, S., Robinson, C., 2013. Interlaboratory proficiency testing for measurement of the polycyclic aromatic hydrocarbon metabolite 1-hydroxypyrene in fish bile for marine environmental monitoring. *Journal of AOAC International* 96, 635-641.
- Kammann, U., Brinkmann, M., Freese, M., Pohlmann, J.-D., Stoffels, S., Hollert, H., Hanel, R., 2014. PAH metabolites, GST and EROD in European eel (*Anguilla anguilla*) as possible indicators for eel habitat quality in German rivers. *Environmental Science and Pollution Research* 21, 2519-2530.
- Kelly, J.M., Janz, D.M., 2009. Assessment of oxidative stress and histopathology in juvenile northern pike (*Esox lucius*) inhabiting lakes downstream of a uranium mill. *Aquatic Toxicology* 92, 240-249.
- Kerambrun, E., Henry, F., Marechal, A., Sanchez, W., Minier, C., Filipuci, I., Amara, R., 2012. A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 45-53.
- Kleckner, R.C., McCleave, J.D., 1988. The northern limit of spawning by Atlantic eels (*Anguilla* spp.) in the Sargasso Sea in relation to thermal fronts and surface water masses. *Journal of Marine Research* 46, 647-667.
- Knights, B., 2003. A review of the possible impacts of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. *Science of the Total Environment* 310, 237-244.
- Kirk, R.S., Kennedy, C., Lewis, J., 2000. Effect of salinity on hatching, survival and infectivity of *Anguillicola crassus* (*Nematoda: Dracunculoidea*) larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 211-218.
- Kirk, R.S., 2003. The impact of *Anguillicola crassus* on European eels. *Fisheries Management and Ecology* 10, 385-394.
- Kwan, K.H.M., Chan, H.M., de Lafontaine, Y., 2003. Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring Assessment* 88, 193-219.
- Lafaille, P., Feunteun, E., Acou A., Lefeuvre J. C., 2000. Role of European eel (*Anguilla anguilla* L.) in the transfer of organic matter between marine and freshwater systems. *Verhandlungen Internationale Vereinigung für Limnologie* 27, 616-619.
- Lafaille P., Baisez, A., Rigaud, C. et Feunteun, E., 2004. Habitat preferences of different European eel size classes in a reclaimed marsh: a contribution to species and ecosystem conservation. *Wetlands* 24, 642-651.

- Lamson, H.M., Shiao, J.C., Iizuka, Y., Tzeng, W.N., Cairns, D.K., 2006. Movement patterns of American eels (*Anguilla rostrata*) between salt and freshwater in a coastal watershed, based on otolith microchemistry. *Marine Biology* 149, 1567-1576.
- Lebeuf, M., Noël, M., Trottier, S., Measures, L., 2007. Temporal trends (1987–2002) of persistent, bioaccumulative and toxic (PBT) chemicals in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Canada. *Science of The Total Environment* 383, 216-231.
- Lebeuf, M., Nunes, T., 2005. PCBs and OCPs in sediment cores from the lower St. Lawrence Estuary, Canada: Evidence of fluvial inputs and time lag in delivery to coring sites. *Environmental Science & Technology* 39, 1470-1478.
- Lecomte-Finiger, R., 1985. L'âge de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L., 1758) : état actuel des connaissances et recherches nouvelles en Méditerranée. *Zeitschrift für Angewandte Ichthyologie* 1, 178-192.
- Lefebvre, F., Crivelli, A.J., 2012. Salinity effects on *anguillicolosis* in Atlantic eels: a natural tool for disease control. *Marine Ecology Progress Series* 471, 193-202.
- Lefebvre, F., Fazio, G., Mounaix, B., Crivelli, A.J., 2013. Is the continental life of the European eel *Anguilla anguilla* affected by the parasitic invader *Anguillicoloides crassus*? *Proceedings of the Royal Society of London* 280, 20122916. Doi: 10.1098/rspb.2012.2916
- Lemaire-Gony, S., Lemaire, P., 1992. Interactive effects of cadmium and benzo(a)pyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquatic Toxicology* 22, 145-160.
- Lemaire-Gony, S., Lemaire, P., Pulsford, A.L., 1995. Effects of cadmium and benzo (a) pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 31, 297-313.
- Li, W., Arnott, S.A., Martha, K., Jones, M., Braicovich, P., de Buron, I., Wang, G.T., Marcogliese, D.J., 2015. First record of paratenic hosts of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in North America. *Journal of Parasitology* 101, 529-35.
- Liermann, C.R., Nilsson, C., Robertson, J., Ng, R.Y., 2012. Implications of dam obstruction for global freshwater fish diversity. *BioScience* 62, 539-548.
- Liewes, E., Schaminee-Main, S., 1987. Onderzoek naar de effecten van de parasiet *Anguillicola crassus* op de ontwikkeling van de paling (*Anguilla anguilla*) in een zout water palingmesterij. Report from 'TEXVIS BV', Den Burg, Texel, Netherlands.
- Limburg, K.E., Wickstrom, H., Svedang, H., Elfman, M., Kristiansson, P., 2003. Do Stocked Freshwater Eels Migrate? Evidence from the Baltic Suggests "Yes". *American Fisheries Society Symposium*. Citeseer, 275-284 pp.
- Lipp, E.K., Kurz, R., Vincent, R., Rodriguez-Palacios, C., Farrah, S.R., Rose, J.B., 2001. The effects of seasonal variability and weather on microbial fecal pollution and enteric pathogens in a subtropical estuary. *Estuaries* 24, 266-276.

- Lobry, J., Mourand, L., Rochard, E., Elie, P., 2003. Structure of the Gironde estuarine fish assemblages: a comparison of European estuaries perspective. *Aquatic living resources* 16, 47-58.
- Luna, L.G., 1968. *Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. New York, NY: McGraw-Hill Book Co.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 1, 13-30.
- Maria, V., Correia, A., Santos, M., 2003. Genotoxic and hepatic biotransformation responses induced by the overflow of pulp mill and secondary-treated effluents on *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 126-137.
- Martínez-Álvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and fisheries* 15, 75-88.
- Mateo, M., Lambert, P., Tétard, S., Castonguay, M., Ernande, B., Drouineau, H., 2016. Cause or consequence? Exploring the role of phenotypic plasticity and genetic polymorphism in the emergence of phenotypic spatial patterns of the European eel. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. *Canadian Journal Of Fisheries And Aquatic Sciences* 74(7), 987-999.
- McLusky, D.S., Elliott, M., 2004. *The estuarine ecosystem: ecology, threats and management*. Oxford University Press on Demand.
- Mohseni, O., Stefan, H.G., Eaton, J.G., 2003. Global warming and potential changes in fish habitat in US streams. *Climatic Change* 59, 389-409.
- Monod, G., 1997, L'induction du cytochrome P4501A. In: Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., Ramade, F., editors. *Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux*. Paris: Masson. p. 33-51.
- Moravec, F., 1992. Spreading of the nematode *Anguillicola crassus* (*Dracunculoidea*) among eel populations in Europe. *Folia Parasitologica* 39, 247-248.
- Moriarty, C., 1983. Age determination and growth rate of eels, *Anguilla anguilla* (L). *Journal of Fish Biology* 23, 257-264.
- Moriarty C., Dekker W., 1997. Management of the European Eel. *Irish Fisheries Bulletin* (Dublin) 15, 110 pp.
- Morrison, W.E., Secor, D.H., 2004. Abundance of yellow-phase American eels in the Hudson River estuary. *Transactions of the American Fisheries Society* 133, 896-910.
- Morrison, W.E., Secor, D.H., Piccoli, P.M., 2003. Estuarine habitat use by Hudson River American eels as determined by otolith strontium: calcium ratios. *American Fisheries Society Symposium*, Bethesda, 87-99 pp.
- Mounaix, B., 1992. Intercalibration et validation des méthodes d'estimation de l'âge de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*, L.) : application au bassin versant de la Vilaine, Bretagne. Thèse Doctorat, ENSA, Rennes, France, 146pp.

- Murchelano, R.A., Wolke, R.E., 1991. Neoplasms and non-neoplastic liver lesions in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. *Environmental Health Perspective* 90, 17-26.
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, DW., 1996. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6, 1-42.
- Nilo, P., Fortin, R., 2001. Synthèse des connaissances et établissement d'une programmation de recherche sur l'anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*). Université du Québec à Montréal, Département des Sciences biologiques pour la Société de la faune et des parcs du Québec, Direction de la Recherche sur la Faune, Québec.
- Oliveira, K., 1996. Field validation of annular growth rings in the American eel, *Anguilla rostrata* using tetracycline-marked otoliths. *Fishery Bulletin* 94(2), 186-189.
- Oliveira, K., 1997. Movements and growth rates of yellow-phase American eels in the Annaquatucket River, Rhode Island. *Transactions of the American Fisheries Society* 126, 638-646.
- Oliveira, K., 1999. Life history characteristics and strategies of the American eel, *Anguilla rostrata*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56, 795-802.
- Pacheco, M., Santos, M., 1999. Biochemical and genotoxic responses of adult eel (*Anguilla anguilla* L.) to resin acids and pulp mill effluent: laboratory and field experiments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 42, 81-93.
- Pacheco, M., Santos, M., Teles, M., Oliveira, M., Rebelo, J., Pombo, L., 2005. Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullet species (*Liza sp.*) from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Environmental Monitoring and Assessment* 107, 133-153.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2001. Biotransformation, endocrine, and genetic responses of *Anguilla anguilla* L. to petroleum distillate products and environmentally contaminated waters. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 49, 64-75.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 331-347.
- Palstra, A.P., van Ginneken, V.J., Murk, A.J., van den Thillart, G.E., 2006. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 93, 145-148.
- Panfili, J., Tomás, J., 2001. Validation of age estimation and back-calculation of fish length based on otolith microstructures in tilapias (*Pisces, Cichlidae*). *Fishery Bulletin* 99, 139-150.
- Panfili, J., Troadec, H., 1993. What's new in otolithometry? *Cybiurn* 17, 171-173.

- Panfili, J., Ximénès, M.C., 1994. Évaluation de l'âge et de la croissance de l'anguille européenne (*Anguilla anguilla* L.) en milieu continental : méthodologies, validation, application en Méditerranée et comparaisons en Europe. Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture, 43-66pp.
- Pannetier, P., Caron, A., Campbell, P.G., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. A comparison of metal concentrations in the tissues of yellow American eel (*Anguilla rostrata*) and European eel (*Anguilla anguilla*). Science of The Total Environment 569, 1435-1445.
- Pavey, S.A., Gaudin, J., Normandeau, E., Dionne, M., Castonguay, M., Audet, C., Bernatchez, L., 2015. RAD Sequencing Highlights Polygenic Discrimination of Habitat Ecotypes in the Panmictic American Eel. Current Biology 25, 1666-1671.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.P., Brèthes, D., Elie, P., Massabuau, J.C., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). Aquatic Toxicology 81, 304-311.
- Rahman, M.S., Thomas, P., 2012. Effects of hypoxia exposure on hepatic cytochrome P450 1A (CYP1A) expression in Atlantic croaker: Molecular mechanisms of CYP1A down-regulation. PLOS ONE 7, e40825.
- Ramaker, T., Meuleman, A.F., Bernhardt, L., Cirkel, G., 2005. Climate change and drinking water production in The Netherlands: a flexible approach. Water Science and Technology 51, 37-44.
- Rasmussen, R.S., Morrissey, M.T., 2008. DNA-based methods for the identification of commercial fish and seafood species. Comprehensive Reviews in Food science and Food Safety 7, 280-295.
- Regoli, F., Winston, G.W., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., 2003. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*: toward development of a more holistic biomarker assessment. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2120-2129.
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. Marine Environmental Research 93, 106-117.
- Reist, J.D., Wrona, F.J., Prowse, T.D., Power, M., Dempson, J.B., Beamish, R.J., King, J.R., Carmichael, T.J., Sawatzky, C.D., 2006. General Effects of Climate Change on Arctic Fishes and Fish Populations. AMBIO: A Journal of the Human Environment 35, 370-380.
- Renault, S., Daverat, F., and Pierron, F. 2011. The use of Eugenol and electro-narcosis as anaesthetics: transcriptional impacts on the European eel (*Anguilla anguilla* L.). Ecotoxicology Environmental Safety 74, 1573-1577.
- Ribeiro, C.O., Voltaire, Y., Sanchez-Chardi, A., Roche, H., 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. Aquatic Toxicology 74, 53-69.

- Rice, C.D., 2001. Fish immunotoxicology: understanding mechanisms of action. In: Schlenk, D., Bensen, W.H. (Eds.), System. In: Target Organ Toxicity in Marine and Freshwater Teleosts, vol. 2. Taylor and Francis, London, 96-138 pp.
- Rigaud, C., Couillard, C.M., Pellerin, J., Légaré, B., Byer, J.D., Alaei, M., Leboeuf, M., Casselman, J.M., Hodson, P.V., 2016. Temporal variations in embryotoxicity of Lake Ontario American eel (*Anguilla rostrata*) extracts to developing *Fundulus heteroclitus*. *Science of The Total Environment*, 541, 765-775.
- Robinet, T.T., Feunteun, E.E., 2002. Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels? *Ecotoxicology* 11, 265-277.
- Roche, H., Buet, A., Ramade, F., 2002. Relationships between persistent organic chemicals residues and biochemical constituents in fish from a protected area: the French National Nature Reserve of Camargue. *Comparative Biochemistry Physiology* 133, 393-410.
- Roche, H., Buet, A., Jonot, O., Ramade, F., 2000. Organochlorine residues in european eel (*Anguilla anguilla*), crucian carp (*Carassius carassius*) and catfish (*Ictalurus nebulosus*) from Vaccares lagoon (French National Nature Reserve of Camargue)—effects on some physiological parameters. *Aquatic toxicology* 48, 443-459.
- Rotchell, J., Bird, D., Newton, L., 1999. Seasonal variation in ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity in European eels *Anguilla anguilla* and flounders *Pleuronectes flesus* from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Marine Ecology Progress Series* 190, 263-270.
- Sáiz-Salinas, J. I., 1997. Evaluation of adverse biological effects induced by pollution in the Bilbao estuary (Spain). *Environmental Pollution* 96, 351-359.
- Santos, H., Pompeu, P., Vicentini, G., Martinez, C., 2008. Swimming performance of the freshwater neotropical fish: *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803. *Brazilian Journal of Biology* 68, 433-439.
- Santos, M.A., Hall, A., 1990. Influence of inorganic lead on the biochemical blood composition of the eel, *Anguilla anguilla* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 20, 7-9.
- Secor, D.H., Dean J.M., Laban, E.H., 1992. Otolith removal and preparation for microstructural examination. *Canadian special publication of Fisheries and Aquatic Sciences*. 117, 19-57.
- Schlezinger, J.J., Stegeman, J.J., 2000. Induction of cytochrome P450 1A in the American eel by model halogenated and non-halogenated aryl hydrocarbon receptor agonists. *Aquatic Toxicology* 50, 375-386.
- Scott, W.B., Crossman, E.J., 1974. Poissons d'eau douce du Canada. *Bulletin de l'Office des Recherches sur les Pêcheries du Canada* 184, 1-1026.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A., Svobodova, Z., 2011. Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet Med* 56, 537-546.
- Stacey, J.A., Pratt, T.C., Verreault, G., Fox, M.G., 2014. A caution for conservation stocking as an approach for recovering Atlantic eels. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*. <https://doi.org/10.1002/aqc.2498>

- Stone, R., 2003. Freshwater eels are slip-sliding away. *Science* 302, 221-222.
- Sures, B., Knopf, K., 2004. Individual and combined effects of cadmium and 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl (PCB 126) on the humoral immune response in European eel (*Anguilla anguilla*) experimentally infected with larvae of *Anguillicola crassus* (Nematoda). *Parasitology* 128, 445-454.
- Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., Budzinski, H., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83, 175-185.
- Teles, M., Pacheco, M., Santos, M., 2003. *Anguilla anguilla* L. liver ethoxyresorufin O-deethylation, glutathione S-transferase, erythrocytic nuclear abnormalities, and endocrine responses to naphthalene and β -naphthoflavone. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55, 98-107.
- Tesch, F., Rohlf, N., 2003. Migration from continental waters to the spawning grounds. *Eel Biology*. Springer, pp. 223-234.
- Thibault, I., Dodson, J.J., Caron, F., Tzeng, W., Iizuka, Y., Shiao, J., 2007. Facultative catadromy in American eels: testing the conditional strategy hypothesis. *Marine Ecology Progress Series* 344, 219-229.
- Tzeng, W., Wang, C., Wickström, H., Reizenstein, M., 2000. Occurrence of the semi-catadromous European eel *Anguilla anguilla* in the Baltic Sea. *Marine Biology* 137, 93-98.
- Van Banning P., Haenen O.L.M., 1990. Effects of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in wild and farmed eel, *Anguilla anguilla*. In: Perkins, F.O., Cheng, T.C., (eds) *Pathology in Marine Science*. New York: Academic Press, pp. 317-330.
- Van Banning, P., Haenen, O., Perkins, F., Cheng, T., 1990. Effects of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in wild and farmed eel, *Anguilla anguilla*. In: Perkins, F.O., Cheng, T.C. (Eds.), *Pathology in Marine Science*. Academic Press, New York, 317-330 pp.
- Van de Graaff, S., 1985. Ökologie organischer Schadstoffe aus der Liste 1 der EG im aquatischen System. *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fisherei- und Flußbiologie* 39, 35-46.
- Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P.E., 1996. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology* 36, 189-222.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57-149.
- Verreault, G., Dargere, W., Tardif, R., 2009. American eel movements, growth, and sex ratio following translocation. *Eels at the edges: Science, status and conservation concerns*. American Fisheries Society, Symposium, pp. 129-136.

- Viglino, L., Pelletier, É., 2006. Butylétains dans les eaux du fjord du Saguenay (Canada) : menace pour l'écosystème d'un milieu semi-fermé ? *Revue des Sciences de l'Eau*, 19, 11-22.
- Vøllestad, L.A., Jonsson, B., 1988. A 13-year study of the population dynamics and growth of the European eel *Anguilla anguilla* in a Norwegian river: evidence for density-dependent mortality, and development of a model for predicting yield. *The Journal of Animal Ecology* 57, 983-997.
- Vøllestad, L.A., 1992. Geographic variation in age and length at metamorphosis of maturing European eel: environmental effects and phenotypic plasticity. *Journal of Animal Ecology* 61, 41-48.
- Wirth, T., Bernatchez L., 2003. Decline of North Atlantic eels: a fatal synergy. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 270, 681-688.
- Whyte, J.J., Jung, R., Schmitt, C., Tillitt, D., 2000. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 30, 347-570.
- Wolke, R., 1992. Piscine macrophage aggregates: a review. *Annual Review of Fish Diseases* 2, 91-108.
- Woodworth, J.G., Munday, B.L., Campin, D., 1998. Evaluation of biomarkers for exposure of fish to eucalypt-based pulp mill effluent for determination of routes of exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 285–296.
- Yokouchi, K., Daverat, F., 2013. Modeling individual growth trajectories of the female European eel in relation to temperature and habitat-use history in the Gironde River, France. *Aquatic Biology* 19, 185-193.

PARTIE II : ARTICLES SCIENTIFIQUES

8. ARTICLE 1

Patey G., Couillard C.M., Drouineau H., Verreault G., Pierron F., Lambert P., Baudrimont M. and Couture. L'étude de la taille rétrocalculée à un jeune âge des anguilles jaunes d'Atlantique échantillonnées le long des gradients écologiques des hydrosystèmes de la Gironde et du St. Laurent

Sous presse dans Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. DOI: 10.1139/cjfas-2017-0025

Géraldine Patey : Échantillonnage sur le terrain, mesure des données morphométriques, traitement et interprétation des données et rédaction de l'article.

Catherine M. Couillard : Contribution à l'interprétation des données et rédaction de l'article.

Guy Verreault : Analyses des otolithes et traitement des données.

Hilaire Drouineau et Patrick Lambert : Conception d'un modèle mixte linéaire pour valider et améliorer les résultats et révision de l'article.

Fabien Pierron, Magalie Baudrimont et Patrice Couture : Révision de l'article.

Early back-calculated size-at-age of Atlantic yellow eels sampled along ecological gradients in the Gironde and St. Lawrence hydrographical systems

Géraldine Patey^{1,2}, Catherine M. Couillard², Hilaire Drouineau³, Guy Verreault⁴, Fabien Pierron^{5,6}, Patrick Lambert³, Magalie Baudrimont^{5,6} and Patrice Couture¹

¹Institut National de la Recherche Scientifique (INRS), Centre Eau Terre Environnement, 490 De La Couronne, Québec, QC G1K 9A9, Canada. Tel: +1 418 654 3825; e-mail: patrice.couture@ete.inrs.ca

² Fisheries and Oceans Canada, Maurice Lamontagne Institute, 850 Route de la Mer, Mont-Joli, G5H 3Z4, Québec, Canada, Tel: +1 418 775 0681; Fax: 418 775 0718; e-mail: catherine.Couillard@dfo-mpo.gc.ca

³Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour l'Environnement et l'Agriculture (IRSTEA), équipe Poissons Migrateurs Amphihalins (PMA), 50 avenue de Verdun Gazinet, 33612 CESTAS, France. Tel: +33 5 57 89 08 09; e-mail: *patrick.lambert@irstea.fr*

⁴Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs, 186 rue Fraser, Rivière-du-Loup, G5R1C8, Québec, Canada. Tel: +1 418 862 8213 poste 306; email: guy.verreault@mffp.gouv.qc.ca

⁵Univ. Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, F-33400 Talence, France

⁶CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France. Tel: +33 5 56 22 39 27; Fax: +33 5 40 70 85 04; e-mails: f.pierron@epoc.u-bordeaux1.fr; magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr

* Corresponding author: Tel: +1 418 261 8906; email: geraldine.patey@gmail.com

Abstract

An international sampling program investigating the causes of the decline of American eels (*Anguilla rostrata*) and European eels (*Anguilla anguilla*) in the St. Lawrence (Canada) and Gironde (France) rivers systems provided the opportunity to compare early growth of eels of each species among habitats using back-calculated size-at-age from 1 to 5 years old. Our study supports previous studies showing that the early back-calculated lengths of *A. anguilla* were higher in downstream and more saline Gironde system habitats than in the upstream fluvial section, and provides a new indication that length at 1-year-old is twice higher than that reported 10 years earlier. However, our data contradict the current paradigm for *A. rostrata* by providing evidence that early size-at-age of eels from the upstream St. Lawrence system, most distant from the spawning area, exceeds those of eels sampled downstream, at less distant sites in the estuarine section. Overall these observations are consistent with the hypothesis that the observed spatial variations in early growth rate of yellow eels sampled in the St. Lawrence and Gironde systems are the consequence of processes occurring in the first year of age such as genetic selection and/or genetically-dependent habitat choice.

Keywords: *Anguilla rostrata*; *Anguilla anguilla*; back-calculated length; growth; habitat; St. Lawrence River system; Gironde River system

List of abbreviations

Abbreviation	Signification
CER	Certes
DOR	Dordogne river
GAR	Garonne river
GIR	Gironde river
SFL	Saint François Lake
SJR	Saint Jean River
SOR	Sud-Ouest River
SPL	Saint Pierre Lake
Y	Year

Introduction

A decline of North European and American eel populations (here called “Atlantic” eels) has been observed over the last 30 years (Castonguay et al. 1994; Cosewic 2012; Dekker 2003; FAO/ICES 2009). Multiple factors have been evoked, including barriers to migration, overfishing, parasites, pollutants and oceanographic and climate changes (Castonguay et al. 1994; Couillard et al. 2014; Geeraerts and Belpaire 2010), but it remains difficult to disentangle their relative contributions and they have probably acted in synergy (Jacoby et al. 2015; Miller et al. 2016).

Atlantic eels are two panmictic and catadromous species with very similar life cycles (Avisé 2003). After a long trans-oceanic larval drift from their spawning grounds in the Sargasso Sea to the continental shelf, glass eels penetrate into coastal areas, then they grow into elvers and later into yellow eels (Tesch and Rohlf 2003). Yellow eels complete their somatic growth phase in a large range of habitats (estuaries, rivers and lakes) (Daverat and Tomás 2006; Jessop 2010). At the end of the yellow phase, they undergo a last metamorphosis, turn into silver eels and begin their long migration to the Sargasso Sea where they reproduce and die (Tesch and Rohlf 2003). The growth phase associated with lipid accumulation is a key determinant of trans-oceanic migration, fecundity, and consequently of reproductive success (Belpaire et al. 2009; Svedäng and Wickström 1997). Since the metamorphosis into silver eels and the success of their reproductive migration are heavily dependent on body length and fat content at migration, growth rate of the yellow phase directly affects reproductive success (Belpaire et al. 2009; Couillard et al. 2014; Van Ginneken and Van den Thillart 2000).

Female American and European eels exhibit a latitudinal cline in growth rate, partly explained by temperature, with lower growth rate (at the silver stage) and higher size-at-metamorphosis at higher latitudes and/or longer distances from the spawning site (Jessop 2010; Vélez-Espino and Koops 2009). Our current understanding is that within the St. Lawrence system (Canada), the growth rate of female eels decreases and size-at-metamorphosis increases from the Gulf of St. Lawrence (downstream section) to Lake Ontario (upstream section)(Jessop 2010). While eel's growth rate is known to be largely plastic (Côté et al. 2014; Drouineau et al. 2008), genetic/epigenetic differences linked to differential migratory patterns or to selection are increasingly supported as contributing factors for the early differential growth rates observed in elvers at different latitudes (Côté et al. 2009; Côté et al. 2014).

At the river basin scale, eels can use a wide range of habitats as demonstrated by studies using otolith microchemistry (Daverat and Tomás 2006; Thibault et al. 2007). This also results in variability in growth rates at this basin scale. Yellow eels with different migratory tactics have different growth rates, as shown in the Gironde System (France) for *A. anguilla* (Daverat et al. 2012; Daverat and Tomás 2006; Edeline et al. 2007; Edeline et al. 2005a) and in various sites in the St. Lawrence system for *A. rostrata* (Boivin et al. 2015; Cairns et al. 2009; Jessop et al. 2007; Thibault et al. 2007). Resident freshwater eels display lower growth rates than resident brackish water eels, and the growth rates of nomadic migrants vary according to habitat salinity (Daverat and Tomás 2006; Thibault et al. 2007). As observed for the latitudinal variations of growth rate, differential growth patterns between salinity ecotypes are detected at an early age (glass eels and elvers) and appear to be related to genetic/epigenetic differences (Côté et al. 2009; Edeline et al. 2007; Pavey et al. 2015).

The present study is part of an international project examining the influence of anthropogenic and environmental factors on the decline of Atlantic eels. This large-scale sampling program provided a unique opportunity to investigate early size-at-age of yellow Atlantic eels captured at the same time with similar protocols in different habitats of the Gironde and St. Lawrence systems. Previous studies demonstrated that both species exhibited, at an early age, extreme inter-individual phenotypic variance in terms of size-at-age related to genetic/epigenetic differences and to the use of highly heterogeneous environments (Côté et al. 2009; Côté et al. 2014; Daverat and Tomás 2006; Gagnaire et al. 2012). The objective of our study was to test if the current spatial patterns of early size-at-age of yellow *Anguilla* sp. in these two systems are consistent with the current paradigm of higher early growth rates of eels growing in habitats more saline and/or less distant from the Sargasso Sea spawning area. Early growth rates of yellow eels were compared within species among habitats more or less saline and/or distant from the Sargasso Sea, using back-calculated length from 1 to 5 years old. Then, we carried out linear mixed effect models for each site including random effects to account for possible inter-cohort's variation in lengths and individual random effects. Finally, the early size-at-age of American and European eels were compared with historical data to examine the temporal evolution of eel early growth in recent years.

Materials and methods

The St. Lawrence Estuary is one of the largest and most productive ecosystems in Canada (Dufour and Ouellet 2007). It is 5 times longer and 9.5 times wider than the Gironde Estuary (GE) (Fig. 1 and Table S1). The GE is one of the largest estuaries in

Western Europe and it originates from the confluence of two freshwater rivers, the Garonne and the Dordogne rivers, at the Bec d'Ambès. Both systems are composed of marine, brackish and freshwater sections (Fig. 1).

For each hydrographical system during early summer in 2011 and 2012, a total of 120 yellow eels were collected at 4 sites along brackish and freshwater sections (Table 1). Our scientific collector permits restricted the number of fish to 30 eels per site because of their threatened status, a major constraint of this study. As further constraint, fish were captured in two different years (15 eels per site per year) due to the low abundance of eels in several sites and the requirement of our sampling design for selecting specific size ranges (see below). In Quebec, eels were captured in two fluvial lakes, St. François Lake (SFL) and St. Pierre Lake (SPL) located in the freshwater section and in the mouth of two freshwater tributaries of the Estuary and the Gulf of St. Lawrence respectively, the Sud-Ouest River (SOR) and St. Jean River (SJR), (Fig. 1a and Table 1). SFL and SPL are shallow freshwater fluvial lakes near Montréal in an urbanized and industrialized region (Béguet-Pon et al. 2015; Hodson et al. 2014). Previous studies have shown that the estimated average transit times of the upstream migration of early life stages of eels between the Gulf and these lakes are 3 years and 5-6 years for SPL and SFL respectively (G. Verreault, unpublished data; Benchetrit et al. 2017). Yellow eels from SOR and SJR typically arrive at about 1 to 2 Years old (Y) and grow in running freshwater habitats, which are tributaries opening into a brackish estuary (G. Verreault, unpublished data).

In France, eels were captured in two freshwater rivers, the Dordogne (DOR) and Garonne (GAR) Rivers, one brackish site, the Gironde estuary (GIR) with a salinity gradient moving up and downstream as a function of both tide and freshwater discharge

(Larrose et al. 2010) and one salt marsh site, Certes (CER). This site is located in the Certes marsh connected to the Arcachon basin, a nearby coastal environment not influenced by water from the Gironde watershed (Fig. 1b and Table 1). The GIR site is known to be contaminated by anthropic and agricultural activities (Delpech et al. 2010; Tableau et al. 2013). The DOR site is considered as the least contaminated site in the watershed and the GAR site is located near the city of Bordeaux in a contaminated region (Tapie et al. 2011). The DOR and GAR sites are located in the tidally influenced part of the rivers. In contrast to *A. rostrata* from the St. Lawrence system, the estimated transit time of *A. anguilla* elvers from the coast to their growth habitat is very short, an average of 2-3 weeks to reach the GAR and DOR sites (Beaulaton and Castelnaud 2005).

European and American yellow eels were captured using trap nets (mesh size of 6.4 mm), trawl (mesh size of 31 mm) and electro-fishing by professional fishers or technical staff (Table 1). In 2011 and 2012, all eels were from a single capture in one day, except for SOR and SJR sites in Quebec where eels were captured in two days due to a small sample the first day. Based on existing information according to Nilo and Fortin (2001), yellow eels from a pre-defined size were targeted, in order to have the same range of ages (5-10 years old) for all sites. In Quebec, the selected fish ranged between 495 to 655 mm in length and in France, the selected fish ranged between 433 to 578 mm. After each capture, eels were kept in tanks with aerated water from the site for few hours until processing.

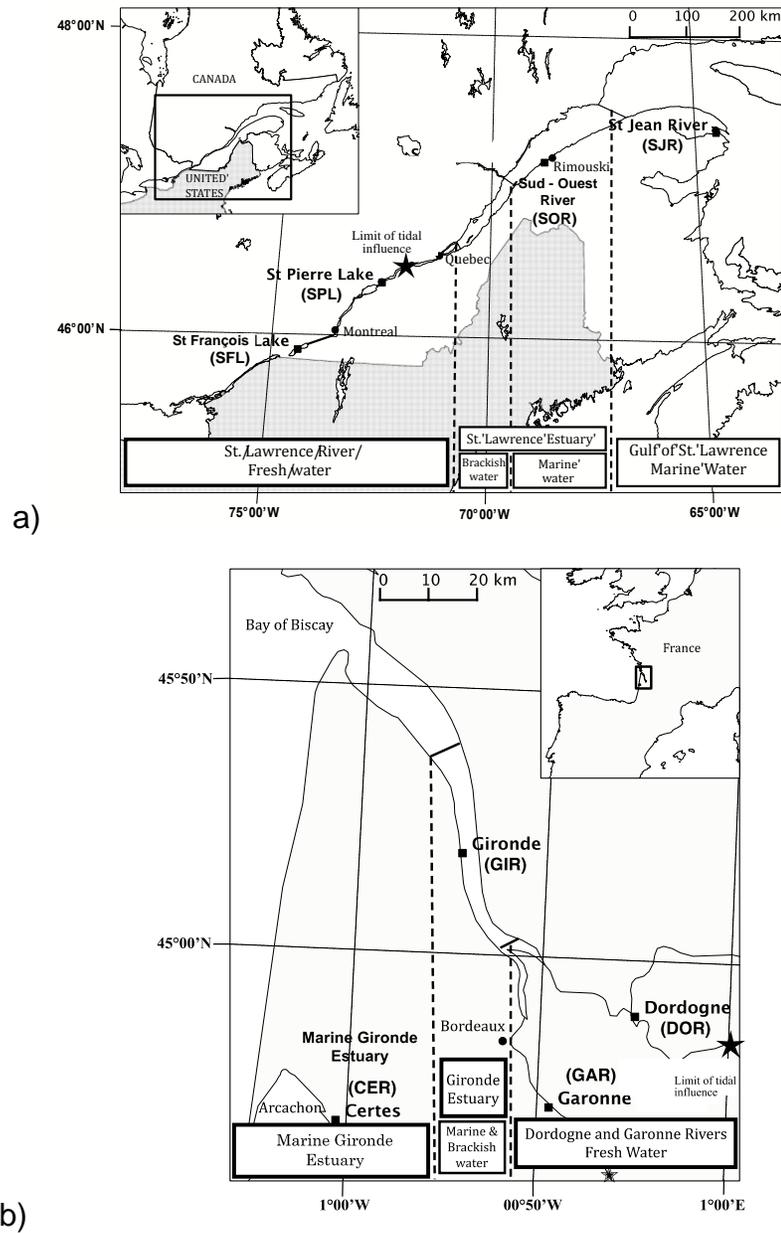


Figure 1. Study areas and sampling sites for (a) yellow eels captured in Quebec (North Eastern Canada) and (b) yellow eels captured in the Gironde region (South West France) showing the separation into 3 salinity sectors (freshwater, brackish and marine sectors). Black squares refer to sampling sites and black circles refer to the closest cities. The symbols (★) indicate the limits of tidal influence. The map was made using QGIS project, a free and open source geographic information system (www.qgis.org).

Table 1. Characteristics of sampling sites in France and in Quebec.

Site	FRANCE (<i>A. anguilla</i>)				QUEBEC (<i>A. rostrata</i>)			
	DOR	GAR	GIR	CER	SFL	SPL	SOR	SJR
Latitude (°N)	44°54'30"	44°43'51"	45°12'23"	44°41'18"	48°51'40"	48° 21' 17"	46°19'50"	45°09'18"
Longitude (°W)	0°15'01"	0°28'05"	0°43'13"	1°1'39"	64°28'47"	68°45'28"	72°32'06"	74°23'04"
Sampling period (month and years)	June 2011 May 2012	June 2011 May 2012	June 2011 May 2012	May 2011 May 2012	June 2011 May 2012	June 2011 June 2012	July 2011 June 2012	June 2011 June 2012
Fishing gear	Trap nets	Trap nets	Trawl	Trap nets	Trap nets	Electro-fishing	Trap nets	Trap nets
Habitat (Salinity) ¹	FW	FW	BW	BW	FW	FW	BW	FW
Mean length at silvering (mm)	752 ^a	698 ^a	660 ^a	660 ^a	958 ^b	958 ^b	1043 ^b	520 ^b
Mean age at silvering (years)	>10 ^a	>10 ^a	>10 ^a	>10 ^a	20 ^b	20 ^b	21 ^b	11 ^b
Distance from the Sargasso Sea (km) ²	5612	5616	5539	5500	5467	5245	4840	4480

¹FW = Freshwater; BW = Brackish water. Salinity values of each sampling site are detailed in Baillon et al. (2015).

²Distance to sampling sites from the Sargasso Sea spawning ground were estimated via the Google Earth web tool.

^a Reference: Tapie et al. (2011); ^b Reference: Jessop (2010).

Morphometric measurements and tissue sampling

American and European eels were processed using the same standardized protocols in France and in Quebec. Total body length (± 1 mm) and total body mass (± 0.1 g) were measured and then eels were killed by decapitation. Eel manipulations were made in agreement with approved protocols from animal ethics committees in both countries. Sex (undifferentiated: U; Male: M; Female: F) was determined by macroscopic observation of the gonads using previously described criteria (Jones and Sinha 1966). Based on calculated gonadal and pectoral fin indices (Durif et al. 2000; Durif et al. 2009), all eels retained were immature yellow eels.

Otolith processing

Sagittal otoliths were extracted, cleaned with distilled water, dried and stored in plastic Eppendorf tubes at ambient room temperature until processing. Otoliths were processed for age determination according to Verreault et al. (2009) using a five-stage procedure: 1) cleaning with sodium hypochlorite (2.5%) and rinsing with demineralized water and drying with ethanol (70%); 2) embedding in epoxy resin (24h); 3) sanding on 800-grit paper and polishing with aluminium oxide powder (1 μ m); 4) etching with EDTA solution, and finally; 5) staining with 0.01% toluidine blue. Otoliths were observed with a binocular microscope (60X) under transmitted light for aging.

Back-calculation of length

Back calculation was undertaken using a relationship between body size and otolith radius (Francis 1990). The biological intercept procedure proposed by Campana (1990) uses a biologically-determined intercept in the back-calculation equation using

the mean size of the body and the otolith at the elver stage. This method is robust to any variations in the fish-otolith relationship and provided from Tremblay (2009). Back-calculated body length (L_t) at age t are calculated as follows:

$$L_t = L_c + (L_c - L_{bi}) \times (O_t - O_c) / (O_c - O_{bi})$$

where O_t is the measured otolith radius at age t , L_c and O_c are the body length and otolith radius at capture, respectively, and L_{bi} and O_{bi} are the body length and otolith radius at the biological intercept, respectively. Measurements of the radius (mm) of the t^{th} annuli (R_t), which is the distance from the elver mark (the first growth check outside the nucleus from where continental age determination commences) of the otolith to the t^{th} annuli (meaning: $O_t - O_{bi}$) and of the radius (mm) of the otolith at capture (R), which is the distance from the elver mark of the otolith to the edge ($O_c - O_{bi}$). These measurements were always made along the longest axis on the ventral side of the sagittae of the otolith. In this study, the mean total body length of elvers when they recruit to coasts (L_{bi}) was set to 67 mm (SD=4.5), for *A. anguilla* and 62 mm (SD=3.2) for *A. rostrata*, which corresponds to the age 0 year old or continental age (ICES 2009; Lambert et al. 2003).

Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using Prism v. 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and R (R. 2011). Mixed models were fitted using the package lme4 (Horton et al. 2011) and Tukey tests were carried out using package multcomp (Bates et al. 2014). For all statistical tests, a probability of $p \leq 0.05$ was considered significant. It was not possible to collect same-sized eels at each sampling site. To increase the comparability of eels among sampling sites, only eels between 2 and 20

years old were considered in this analysis. The total number of eels retained for statistical analyses were 102 in 2011 and 112 in 2012 (Tables 2 and 3).

Most analyses were conducted for each country/species separately. Firstly, biological characteristics of eels at capture were statistically compared among sites within a species and year. For each year, data normally distributed (using the Shapiro-Wilk test) were compared with one-way ANOVA followed by a Tukey's multiple comparison test. Data not normally distributed was compared among sites using non-parametric Kruskal-Wallis test (KW) followed by the Dunn's multiple comparison test. The relative proportions of female and undifferentiated eels were compared among sites or between sampling years in each country using a Chi-square test.

To compare size among sites within systems for eels of the same age, back-calculated lengths from 1 to 5 Years old (Y) were compared among sites within a species using the KW test as described above. Then, we carried out linear mixed effect models for each site including random effects to account for possible inter-cohort variations in length and individual random effects. First, we fitted a linear mixed effect model for each site to assess whether length at 1Y significantly differed among sites:

$$(1) L_1 \sim \text{Site} + (1|\text{cohort})$$

with L_1 , the length-at-age at 1Y, Site, the site of capture and (1|cohort), a random effect to account for possible inter-cohort variations in length. Tukey multiple comparison tests were then carried out to detect significant differences among sites.

A second analysis was performed to check whether growth rates were different among sites. We first computed yearly growth increments for each fish, i.e. the difference in back-calculated lengths between two successive ages. Growth increments are a linear function of initial length when fish follow a Von Bertalanffy growth curve (i.e.

$I_t = L_t - L_{t-1} = (L_\infty - L_{t-1}) \cdot (1 - \exp(-K))$ with I_t , the growth increment between year $t-1$ and year t , L_t the size-at-age at age t , K the Brody coefficient and L_∞ the asymptotic length). In view of this, we fitted a generalized linear mixed model on growth increments for each species separately:

$$(2) I_t \sim \text{Site} + L_{t-1} + (1|\text{eel}) + (1|\text{cohort})$$

with I_t , the vector of yearly growth increments (we used the 4 increments for each from 1Y to 5Y) and L_{t-1} , the vector containing the corresponding initial length. We added a cohort random effect to account for inter-cohort differences and an individual random effect since each eel was considered 4 times in the analysis. We used a gamma family distribution to account for dissymmetry in growth increment distributions (DeLong et al. 2001; Drouineau et al. 2008), with an identity link to preserve the linear relationship. Similarly, to the first model, we carried out Tukey multiple tests to compare yearly growth increments among sites.

Results

Eel biological characteristics in the St. Lawrence and Gironde systems

For *A. anguilla* sampling, male eels were removed due to small sample size ($n=3$ in the Gironde system) and for *A. rostrata* sampling, no males have been detected ($n=0$ in the St. Lawrence system). In 2011 and 2012, body length and age of *A. anguilla* from the Gironde system ranged from 278 to 825 mm and from 3 to 18 years old respectively, and differed among sites ($H=38.5$, $p<0.0001$ in 2011 and $H=12.8$, $p=0.005$ in 2012 for body length; $H=33.8$, $p<0.0001$ in 2011 and $H=25.3$, $p<0.0001$ in 2012 for age, Tables 2 and 3). Eels from DOR were smaller and lighter than eels captured in GAR, GIR and

CER with median body length and body mass 1.3 and 2.8 times lower, respectively ($H=37.7$, $p<0.0001$ in 2011 and $H=21.8$, $p<0.0001$ in 2012 for body mass, Tables 2 and 3). In both sampling years, the proportions of undifferentiated eels increased from the salt marsh habitat (CER) to freshwater habitats and the highest proportions of undifferentiated eels were observed in DOR and GAR (Tables 2 and 3). No significant difference was observed in biological characteristics between female and undifferentiated European eels in GAR and DOR (Student t-test, Tables S2).

In the St. Lawrence system, the body length and age of *A. rostrata* captured in 2011 and 2012 ranged from 265 to 963 mm and from 5 to 19 years old respectively and both parameters differed among sites ($F=174.0$, $p<0.0001$ in 2011 and $H=41.5$, $p<0.0001$ in 2012, for body length and $F=13.1$, $p<0.0001$ in 2011 and $H=6.1$, $p<0.0001$ in 2012 for age, Tables 2 and 3). Eels from SOR were consistently smaller and lighter than eels from SPL and SFL ($H=44.4$, $p<0.0001$ in 2011 and $H=40.7$, $p<0.0001$ in 2012, for body mass, Tables 2 and 3). In 2011, body length and age were higher in eels from SPL and SFL compared to SJR (Table 2). In 2011 and 2012, body mass was higher in SPL and SFL than in SJR (Tables 2 and 3).

In 2011, yellow eels captured in the Quebec sites were older than those sampled in France ($U=357.5$, $p<0.0001$, Mann Whitney test).

Table 2. Biological characteristics for *Anguilla anguilla* and *Anguilla rostrata* for each sampling site in 2011. Values represent the median (Q1, Q3) of each biological variable (BL: Body Length; BW: Body Weight. Sex ratios are presented in % of the total number of eels within a site (Chi-square test, $p \leq 0.05$). Different superscript lower case letters indicate statistically significant differences among sites within species (ANOVA or Kruskal Wallis, $p \leq 0.05$).

Site	2011							
	<i>A. anguilla</i>				<i>A. rostrata</i>			
	DOR	GAR	GIR	CER	SFL	SPL	SOR	SJR
N total (Females and undifferentiated)	13	14	15	11	15	7	15	15
Sex ratio (%):								
Female	62	86	100	100	100	100	100	100
Undifferentiated	38 ^a	14 ^{ab}	0 ^b	0 ^b	0	0	0	0
BL (mm)	325 ^c (302, 354)	434 ^b (393, 503)	565 ^a (530, 614)	440 ^b (395, 478)	832 ^a (801, 856)	894 ^a (876, 929)	323 ^c (290, 382)	535 ^b (465, 606)
BW (g)	51 ^c (39, 69)	127 ^b (103, 202)	300 ^a (249, 424)	128 ^b (102, 167)	1254 ^a (1147, 1298)	1565 ^a (1435, 1642)	50 ^c (32, 92)	275 ^b (172, 440)
Age (year)	5 ^b (4, 5)	6 ^b (5, 7)	8 ^a (8, 12)	5 ^b (4, 5)	12 ^a (12, 13)	13 ^a (11, 16)	8 ^b (7, 10)	10 ^a (8, 12)

Table 3. Biological characteristics for *Anguilla anguilla* and *Anguilla rostrata* for each sampling site in 2012. Values represent the median (Q1, Q3) of each biological variable (BL: Body Length; BW: Body Weight. Sex ratios are presented in % of the total number of eels within a site (Chi-square test, $p \leq 0.05$). Different superscript lower case letters indicate statistically significant differences among sites within species (ANOVA or Kruskal Wallis, $p \leq 0.05$).

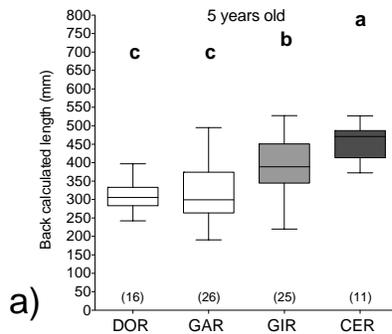
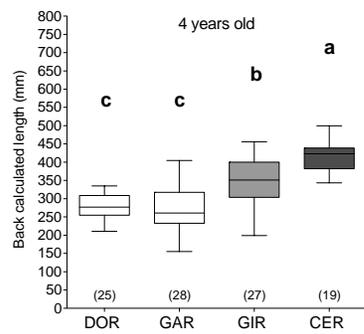
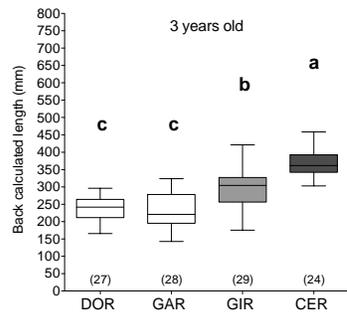
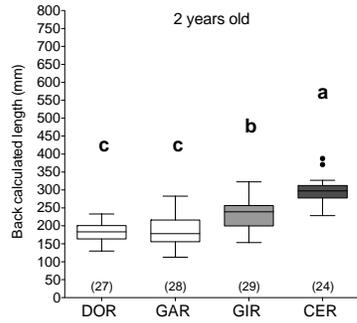
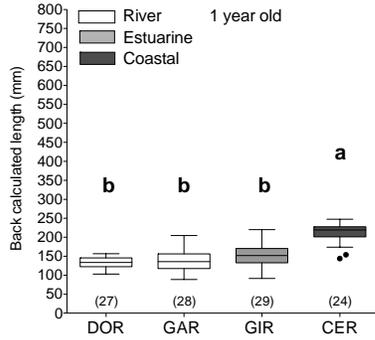
Site	2012							
	<i>A. anguilla</i>				<i>A. rostrata</i>			
	DOR	GAR	GIR	CER	SFL	SPL	SOR	SJR
N total (Females and undifferentiated)	14	14	14	14	12	14	15	15
Sex ratio (%):								
Female	25	71	71	93	100	100	0	0
Undifferentiated	75 ^a	29 ^{ab}	29 ^{ab}	7 ^b	0	0	0	0
BL (mm)	386 ^b (360, 402)	506 ^a (378, 597)	452 ^a (392, 480)	464 ^a (405, 522)	802 ^a (769, 825)	667 ^b (593, 771)	375 ^c (340, 435)	517 ^{bc} (373, 595)
BW (g)	78 ^b (69, 96)	262 ^a (94, 328)	148 ^a (116, 182)	156 ^a (111, 266)	983 ^a (895, 1076)	553 ^{ab} (386, 823)	63 ^c (50, 109)	245 ^{bc} (71, 441)
Age (year)	6 ^b (4, 8)	10 ^a (8, 14)	8 ^{ab} (4, 10)	4 ^b (4, 5)	10 (9, 14)	7 (7, 11)	9 (7, 10)	11 (7, 11)

Comparison of back-calculated length at age 1Y to 5Y of eels from different habitats in each species

In the Gironde system, at 1Y, back-calculated lengths of eels sampled in the salt marsh CER site (median of 219 mm) were higher than those of eels sampled in the estuarine GIR site and in the fluvial GAR and DOR sites (medians were respectively 152, 136 and 134 mm, $H=51.4$, $p<0.0001$, Fig. 2a and Table S3). At 2Y, back-calculated lengths of eels from the estuarine GIR site became higher than those of eels from fluvial GAR and DOR sites and the difference was maintained until 5Y ($F=51.2$, $p<0.0001$ for 2Y; $F=48.7$, $p<0.0001$ for 3Y; $F=30.6$, $p<0.0001$ for 4Y and $F=16.7$, $p<0.0001$ for 5Y, Fig. 2a). From 2Y to 5Y, eels from the marine CER site had the higher median of back-calculated length compared to the other sites and eels from GAR and DOR sites remained with the lowest median of back-calculated length (Fig. 2a).

In the St. Lawrence system, at 1Y, back-calculated lengths of eels captured in fluvial SPL and SFL sites (with a median length of 184 and 171 mm respectively) were higher than those of eels from the estuarine SOR and SJR sites (with a median length of 134 and 142 mm respectively, ($F=31$, $p<0.0001$, Fig. 2b and Table S3). The significant difference between higher back-calculated length of eels from SPL and SFL and lower back-calculated length of eels from SOR and SJR was maintained until 5Y ($H=46.4$, $p<0.0001$ for 2Y; $H=50.2$, $p<0.0001$ for 3Y; $F=31.2$, $p<0.0001$ for 4Y and $F=40.6$, $p<0.0001$ for 5Y, Fig. 2b and Table S3).

Anguilla anguilla



Anguilla rostrata

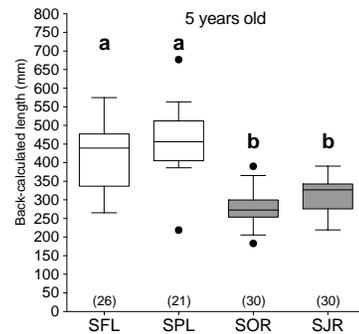
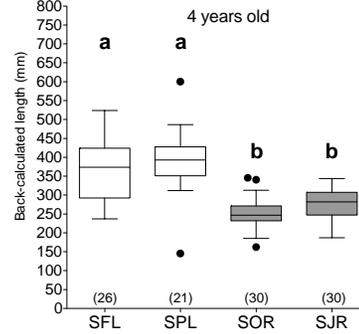
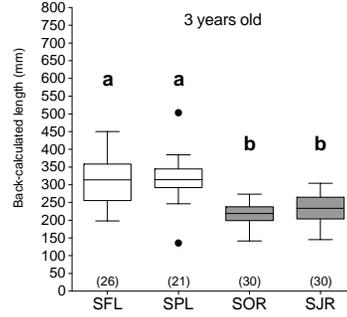
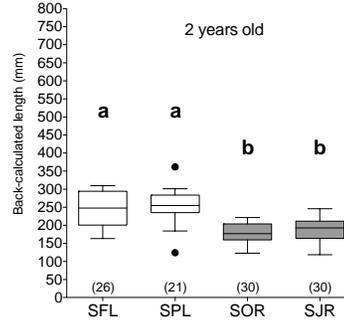
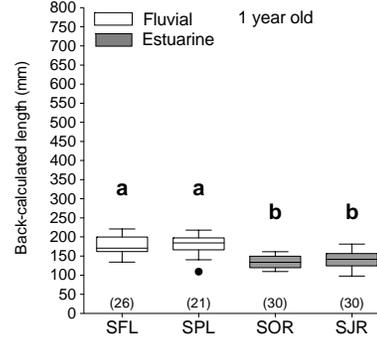


Figure 2. Back-calculated length in relation to age from 1Y to 5Y for a) *Anguilla anguilla* captured in fluvial (DOR, Dordogne and GAR, Garonne), estuarine (GIR, Gironde) and coastal (CER, Certes) habitats and for b) *Anguilla rostrata* captured in fluvial (SPL, Lake St. Pierre and SFL, Lake St. François) and estuarine habitats (SJR, St. Jean River and SOR, Sud-Ouest River). Rectangle boxes encompass the medians (horizontal line through the box), the 25th percentiles (Q1) and the 75th percentiles (Q3). Above and below the boxes are whiskers representing the $Q1 - 1.5 \times \text{IQR}$ and $Q3 + 1.5 \times \text{IQR}$, which is the difference with the first and the third quartiles) and Q3+1.5 x IQR. Filled circles are outliers. N in parentheses are the numbers of fish per site. In each species, different uppercase letters indicate differences among sites (Anova or Kruskal Wallis, $p \leq 0.05$).

Linear mixed effect models

In both years, for *A. anguilla*, this analysis confirmed that the length at age 1Y was higher in CER than in any other site. Length at age 1Y in GIR was slightly higher than in DOR, and no difference was observed between GAR and DOR. This confirmed the decreasing gradient in length at age 1Y from downstream to upstream habitats (Table 4). For *A. rostrata*, length at age 1Y was higher in the two upstream lakes than in downstream rivers but no differences were detected between the two lakes or between the two rivers (Table 4).

Results were rather similar regarding subsequent growth-increments (Table 5): increments were higher in downstream sites than in upstream sites for *A. anguilla*, although CER and GIR did not differ. Yearly growth increments from 1Y to 5Y were consistently higher in the two upstream lakes than in downstream rivers for *A. rostrata*.

Table 4: Tukey multiple comparisons tests on the site effects in the linear mixed models on length-at-age 1. Statistical significance codes: ≤ 0.00001 '****'; ≤ 0.001 '***'; ≤ 0.01 '**'; ≤ 0.05 '.'; ≤ 0.1 'ns'

Species	Site 1	comparison	Site 2	significance level
<i>A. anguilla</i>				
	CER	>	GIR	***
	CER	>	DOR	***
	CER	>	GAR	***
	GIR	>	GAR	.
	GIR	>	DOR	*
	GAR	>	DOR	ns
<i>A. rostrata</i>				
	SFL	>	SPL	ns
	SFL	>	SJR	***
	SFL	>	SOR	***
	SPL	>	SJR	***
	SPL	>	SOR	***
	SJR	>	SOR	

Table 5: Tukey multiple comparisons tests on the site effects in the linear mixed models on growth increments. Statistical significance codes: ≤ 0.00001 '****'; ≤ 0.001 '***'; ≤ 0.01 '**'; ≤ 0.05 '.'; ≤ 0.1 'ns'

Species	Site 1	compariso n	Site 2	significance level
<i>A. anguilla</i>				
	CER	>	GIR	ns
	CER	>	DOR	***
	CER	>	GAR	.
	GIR	>	GAR	*
	GIR	>	DOR	**
	GAR	>	DOR	
<i>A. rostrata</i>				
	SFL	<	SPL	ns
	SFL	>	SJR	***
	SFL	>	SOR	***
	SPL	>	SJR	***
	SPL	>	SOR	***
	SJR	>	SOR	.

Discussion

This study confirms that the current spatial pattern of early growth rates of yellow *A. anguilla* in the Gironde system is consistent with the paradigm of higher early growth rates of eels growing in habitats more saline and/or less distant from the Sargasso Sea spawning area. Moreover, comparisons with historical data in the Gironde system indicate that this spatial pattern remains stable despite temporal variation in the overall growth rates. In contrast, our study reveals that early growth rates of yellow *A. rostrata* in the St. Lawrence system are highest in eels captured in the less saline habitats, more distant from the Sargasso Sea, in contradiction with the current paradigm. This new information is useful to guide further studies on the mechanisms leading to the different ecotypes of Atlantic eels in different rearing habitats.

Spatial variations in early back-calculated length in *Anguilla anguilla*

At 1Y, eels from the salt marsh site CER had higher back-calculated length than eels from the estuarine site GIR and from the fluvial sites GAR and DOR. From 2Y to 5Y, while eels from CER maintained their higher back-calculated length, eels from the estuarine site GIR displayed an increasingly faster growth rate with higher back-calculated length than those of eels from freshwater sites. These results are consistent with previous studies, which demonstrated that eels sampled in brackish habitats grew faster than those from riverine freshwater habitats. Specifically, Daverat and Tomás (2006) have reached similar conclusions on the spatial variations of early growth rates of eels sampled in 2001-2004 in the Gironde system. Since the transit time of *A. anguilla* glass eels from the coast to their growth habitat was estimated to last 2-3 weeks

according to Beaulaton and Castelnaud (2005), it is likely that their growth was already influenced by the characteristics (biological, chemical and/or physical) of the selected habitat at the age of 1Y. However, laboratory (Edeline et al. 2007) and genetic studies (Pujolar et al. 2005) in *A. anguilla* suggest that the ecotypic differences among eels occupying different habitats are not only the effect of phenotypic plasticity. They may also be caused by functional genetic differences resulting from intra-generational spatially varying selection and/or genotype-dependent habitat choice (or both) of ecologically divergent habitats (Pavey et al. 2015).

At 1Y, no significant difference in length was detected between eels from the estuarine site GIR and eels from the freshwater sites GAR and DOR. This observation could be related to a high within-site inter-individual variability in back-calculated length. One factor of variability is the older age of some of the eels sampled in GIR and GAR. However, results of analyses using a linear mixed model integrating individual variability and cohort effect were consistent with the results of the KW test indicating these sources of variability had no significant impact on the results. Overall these data and the similarity with the pattern described a decade earlier by Daverat and Tomás (2006) indicate a very consistent spatial pattern of higher growth at an early age (from 1Y to 5Y) in yellow eels sampled in the more saline site (CER) compared to eels sampled in the upstream fluvial section of the Gironde system.

Spatial variations in early back-calculated length in *Anguilla rostrata*

Anguilla rostrata sampled in the fluvial freshwater sites (SPL and SFL) in the Upper St. Lawrence River had a higher back-calculated length from 1Y to 5Y compared to same-aged *A. rostrata* sampled downstream in tributaries opening into a brackish

estuary (SJR and SOR). In our study, the difference in back-calculated length in *A. rostrata* sampled in the upstream St. Lawrence system and those sampled in downstream tributaries was present as early as 1Y. At this early age, *A. rostrata* of the fast-growing group (LSP, LSF) have not yet reached their growing habitat. It is likely that they were still migrating in the St. Lawrence system and therefore their growth rate could not yet be influenced by the local conditions in the fluvial lakes (Benchetrit et al. 2017).

The higher back-calculated length at 1Y of eels from the upstream portion of the St. Lawrence system compared to more downstream populations that we report here contrasts with recent literature. Based on previous studies on *A. rostrata* captured in the Gulf of St. Lawrence and in tributaries of the marine portion of the St. Lawrence system, a slower growth at 1Y was expected with increasing distance of the capture sites from the Sargasso Sea (Boivin et al. 2015). A common garden experiment by Côté et al. (2009) suggested a genetic basis for growth differences among *A. rostrata* early life stages from different geographical locations. They found that *A. rostrata* elvers from the Mira River (Nova Scotia; shortest distance to the Sargasso Sea) grew faster than those from Grande-Rivière-Blanche (Québec, longest distance to the Sargasso Sea), a result confirmed by the study of Boivin et al. (2015). Molecular tools were used to support the hypothesis that life-history traits of *A. rostrata* were influenced by spatially variable genetic selection along latitudinal gradients of temperature and/or increasing distance from the Sargasso Sea and by genotype-dependent habitat choice (Boivin et al. 2015; Côté et al. 2009; Gagnaire et al. 2012; Pavey et al. 2015). Moreover, glass eels of *A. rostrata* from New Brunswick and Nova Scotia sites (which are closer to the Sargasso Sea) translocated to Lake Ontario exhibited faster annual growth and matured at smaller sizes and ages at reproductive migration than wild migrating silver eels from Lake

Ontario (Couillard et al. 2014; Stacey et al. 2014; Verreault et al. 2010). Despite some limitations in fish samplings, our study clearly demonstrates an inverse pattern of early growth rate from 1Y to 5Y for *A. rostrata* with fast growing eels reaching the upstream St. Lawrence system and slow growing eels remaining in the downstream section. These observations question our current understanding of eels adaptation to environmental heterogeneity (Mateo et al. 2016).

Similarities between *A. anguilla* and *A. rostrata* and comparisons with previous studies

This study is the first to use a common methodology to compare the back-calculated length of the yellow stage of the two species of Atlantic eels. Given the wide range of habitats covered in this study (a larger hydro-geographical scale associated with longer upstream migration of early life stages, longer distance to the Sargasso Sea for Gironde system eels and different temperature regimes for the two river systems), we found that from 1Y to 5Y, the back-calculated length of *A. rostrata* collected in the St. Lawrence system in the northern part of their distribution range presented some similarities with values from *A. anguilla* collected in the Gironde system. The back-calculated length of *A. rostrata* from the upper St. Lawrence system (SPL and SFL) was similar to that of eels from the downstream sites GIR (at 2Y and 3Y) and CER (at 4Y and 5Y). From 1Y to 5Y, the back-calculated length of eels from the downstream St. Lawrence system sites, SJR and SOR, were comparable to those of slow-growing eels from the upstream sites GAR and DOR. Our study highlighted an inverse pattern of early growth rate according to the upstream-downstream gradient of the location of habitats between *A. rostrata* with faster growers from the upstream section of the St. Lawrence

system and *A. anguilla* with faster growers from the downstream section of the Gironde system.

In our study, median of back-calculated length at 1Y and 5Y of *A. anguilla* collected in the Gironde in 2011-2012 (Table S3) were approximately twice those observed in eels captured 10 years earlier in the same sites in the Gironde system by Daverat and Tomás (2006). This suggests an improvement in growth performance possibly related to abiotic factors (salinity, temperature, productivity and habitat quality) and/or biotic factors (low density of eels, weak coastal recruitment of glass eels) (Bonhommeau et al. 2008; Daverat et al. 2012; Knights 2003). Despite the observed changes in growth performance in *A. anguilla*, the spatial pattern of early growth rate did not change with time. However, the back-calculated length at 5Y of slow growing *A. rostrata* collected in SJR in 2011-2012 are similar to those calculated for yellow eels captured at the same site in 2004 by Thibault et al. (2007). These data suggest that, at least for the SJR site, no significant change in growth rate up to 5Y has occurred in the last 7-8 years. Unfortunately, to our knowledge, no historic data for early GR of yellow eels collected in the upper part of the St. Lawrence system is available for comparison.

Limitations and future directions

The unique biology of eels, and especially their panmictic nature, the variability in their migratory patterns during their growth phase and their large distribution ranges from tropical to subarctic climates, makes their study a challenge in any circumstance. Population declines and severe restrictions on commercial and scientific collection impose further difficulties. Sampling sites in this international study were selected according to salinity, metal and organic contamination gradients found in sediments and

biota along the Saint Lawrence and the Gironde systems (Laporte et al. 2016). Nevertheless, these sites cannot be considered to represent fairly the wide range of habitats that the species occupy. Some limitations related to the sampling of eels (30 eels captured in each site and in two years and the use of different fishing gear adapted to each habitat) and the wide range of estimated age (2 to 18 years) may constitute biases.

In addition to spatially variable selection and/or genotype-dependant habitat choice, several other processes could contribute to the observed growth variability in 1Y-old eels, including epigenetic changes, early environment influences with carry-over effects on growth and interactions between genotype and environment through phenotypic plasticity. A reduction in the abundance of glass eels arriving in continental habitats associated with the low density of eels in their growth habitats could have contributed to increase their length at early age (Castonguay et al. 1994; Moriarty and Dekker 1997). Temporal variations in hatching times (Kuroki et al. 2017) and in environmental conditions during development (Jonsson and Jonsson 2014) could also affect early growth rates and behaviour. The season in which glass eels arrived on the continental coasts may also affect their size (Desaunay and Guerault 1997). Local environmental factors such as tidal height, water temperature, water discharges and the difference in temperatures between estuarine and river habitats are known to have effects on glass eel's abundance and upstream migratory behavior of migrants (Jessop 2003; Edeline et al. 2006). In addition, physiological traits of eels such as body condition, endocrine system (thyroid hormones) and health status may affect the locomotor activity, the migratory behavior and growth performance (Edeline et al. 2005b; Lefebvre et al. 2013). Further studies are needed on the interactions between genetic

variation and phenotypic plasticity in response to environmental variation during early development of Atlantic eels and their impact on migration patterns and later-life history performance. For that purpose, longer term studies focussing on variations of growth and behaviour of 0-1 Y eels in relation to genotypes and/or environmental factors are recommended, with larger sample sizes and greater number of sites.

In spite of these limitations, our study provides a new indication that for *A. rostrata* sampled along the St. Lawrence system, faster growing individuals appear more likely to colonize the head of the system than slower growing individuals. We have also highlighted that the median of back-calculated length of *A. anguilla* at 1Y and 5Y is twice higher than that reported 10 years earlier. Further studies and monitoring are clearly needed to test the hypothesis of a possible increase of early growth rate in relation to the modifications of abiotic and biotic factors and its consequences for age, length and lipid reserves at migration in *A. anguilla* and *A. rostrata*.

Finally, whereas several studies have investigated the relationships between genetic selection and growth rate characteristics of glass eels in *A. rostrata*, these studies are limited to eels from tributaries of the lower St. Lawrence Estuary and Gulf and there is a need to confirm these relationships in *A. anguilla*. Comparative studies of these two related Atlantic eel species would help to better understand the relationship between differential growth rate, size-at-metamorphosis, lipid accumulation, sexual differentiation and their genetic and environmental bases in these two species. This information would facilitate prediction of the effects of global environmental changes on the recruitment of these two declining species.

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge all the personnel of the INRS-ETE, UMR EPOC (university of Bordeaux) and IRSTEA (Bordeaux-Cestas) who participated in the field sampling. We would like to thank the technical staff from the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs for otolith expertise and for providing us with back-calculated length data. This work was supported by the joint ANR Blanc (ANR-10-INTB-1704)-NSERC SGP grant IMMORTEEL and by the Aquitaine region (GAGILAU and MICANG projects). The laboratory work of Géraldine Patey was in part supported by Fisheries and Oceans Canada.

References

- Avise, J.C. 2003. Catadromous eels of the North Atlantic: a review of molecular genetic findings relevant to natural history, population structure, speciation, and phylogeny. *In* Eel biology. Springer. pp. 31-48.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B., and Walker, S. 2014. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* **67**(1): 1-48. doi:10.18637/jss.v067.i01.
- Beaulaton, L., and Castelnaud, G. 2005. The efficiency of selective tidal stream transport in glass eel entering the Gironde (France). *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*(378-379): 5-21.
- Béguer-Pon, M., Castonguay, M., Benchetrit, J., Hatin, D., Legault, M., Verreault, G., Mailhot, Y., Tremblay, V., and Dodson, J.J. 2015. Large-scale, seasonal habitat use and movements of yellow American eels in the St. Lawrence River revealed by acoustic telemetry. *Ecology of Freshwater Fish* **24**(1): 99-111.

- Belpaire, C., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., Hagel, P., and De Boer, J. 2009. Decreasing eel stocks: survival of the fittest? Ecology of freshwater fish **18**(2): 197-214.
- Benchetrit, J., Béguer-Pon, M., Sirois, P., Castonguay, M., Fitzsimons, J., Dodson, J.J. 2017. Using otolith microchemistry to reconstruct habitat use of American eels *Anguilla rostrata* in the St. Lawrence River-Lake Ontario system. Ecology of Freshwater Fish. **26**: 19-33.
- Boivin, B., Castonguay, M., Audet, C., Pavey, S., Dionne, M., and Bernatchez, L. 2015. How does salinity influence habitat selection and growth in juvenile American eels *Anguilla rostrata*? Journal of fish biology **86**(2): 765-784.
- Bonhommeau, S., Chassot, E., Planque, B., Rivot, E., Knap, A.H., and Le Pape, O. 2008. Impact of climate on eel populations of the Northern Hemisphere. Marine Ecology Progress Series **373**: 71-80.
- Cairns, D.K., Secor, D.A., Morrison, W.E., and Hallett, J.A. 2009. Salinity-linked growth in *anguillid* eels and the paradox of temperate-zone catadromy. J Fish Biol **74**(9): 2094-2114.
- Campana, S.E. 1990. How reliable are growth back-calculations based on otoliths? Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences **47**(11): 2219-2227.
- Castonguay, M., Hodson, P., Couillard, C., Eckersley, M., Dutil, J.-D., and Verreault, G. 1994. Why is recruitment of the American eel, *Anguilla rostrata*, declining in the St. Lawrence River and Gulf? Canadian journal of fisheries and aquatic sciences **51**(2): 479-488.

- Cosewic. 2012. Assessment and status report on the American eel *Anguilla rostrata* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. p. **xii + 109**.
- Côté, C., Castonguay, M., Verreault, G., and Bernatchez, L. 2009. Differential effects of origin and salinity rearing conditions on growth of glass eels of the American eel *Anguilla rostrata*: implications for stocking programmes. *Journal of Fish Biology* **74**(9): 1934-1948.
- Côté, C.L., Castonguay, M., Kalujnaia, M.S., Cramb, G., and Bernatchez, L. 2014. In absence of local adaptation, plasticity and spatially varying selection rule: a view from genomic reaction norms in a panmictic species (*Anguilla rostrata*). *BMC Genomics* **15**: 403.
- Couillard, C.M., Verreault, G., Dumont, P., Stanley, D., and Threader, R.W. 2014. Assessment of Fat Reserves Adequacy in the First Migrant Silver American Eels of a Large-Scale Stocking Experiment. *North American Journal of Fisheries Management* **34**(4): 802-813.
- Daverat, F., Beaulaton, L., Poole, R., Lambert, P., Wickström, H., Andersson, J., Aprahamian, M., Hizem, B., Elie, P., and Yalçın-Özdilek, S. 2012. One century of eel growth: changes and implications. *Ecology of Freshwater Fish* **21**(3): 325-336.
- Daverat, F., and Tomás, J. 2006. Tactics and demographic attributes in the European eel *Anguilla anguilla* in the Gironde watershed, SW France. *Marine Ecology Progress Series* **307**: 247- 257.
- Dekker, W. 2003. Status of the European eel stock and fisheries. *In Eel Biology*. Springer. pp. 237-254.

- DeLong, A.K., Collie, J.S., Meise, C.J., and Powell, J.C. 2001. Estimating growth and mortality of juvenile winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, with a length-based model. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**(11): 2233-2246.
- Delpech, C., Courrat, A., Pasquaud, S., Lobry, J., Le Pape, O., Nicolas, D., Boët, P., Girardin, M., and Lepage, M. 2010. Development of a fish-based index to assess the ecological quality of transitional waters: the case of French estuaries. *Marine Pollution Bulletin* **60**(6): 908-918.
- Desaunay, Y., and Guerault, D. 1997. Seasonal and long-term changes in biometrics of eel larvae: a possible relationship between recruitment variation and North Atlantic ecosystem productivity. *Journal of fish biology* **51**(sA): 317-339.
- Drouineau, H., Mahevas, S., Bertignac, M., and Fertin, A. 2008. Assessing the impact of discretisation assumptions in a length-structured population growth model. *Fisheries Research* **91**(2): 160-167.
- Dufour, R., and Ouellet, P. 2007. Estuary and Gulf of St. Lawrence marine ecosystem overview and assessment report. *Canadian Technical Report Fishery Aquatic Sciences* 2744E **vii + 112 p.**
- Durif, C., Élie, P., Dufour, S., Marchelidon, J., and Vidal, B. 2000. Analyse des paramètres morphologiques et physiologiques lors de la préparation à la migration de dévalaison chez l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) du lac de Grand-Lieu (Loire-Atlantique). *Cybium* **24**(3): 63-74.
- Durif, C.M., van Ginneken, V., Dufour, S., Müller, T., and Elie, P. 2009. Seasonal evolution and individual differences in silvering eels from different locations. *In* *Spawning migration of the European eel*. Springer. pp. 13-38.

- Edeline, E., Dufour, S., and Elie, P. 2005a. Role of glass eel salinity preference in the control of habitat selection and growth plasticity in *Anguilla anguilla*. Marine Ecology Progress Series **304**: 191-199.
- Edeline, E., Bardonnnet, A., Bolliet, V., Dufour, S., and Elie, P. 2005b. Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behavior. Hormones and Behavior. **48**: 53-63.
- Edeline E., Lambert P., Rigaud C., and Elie P. 2006. Effects of body condition and water temperature on *Anguilla anguilla* glass eels migratory behavior. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **331**: 217-225.
- Edeline, E., Beaulaton, L., Le Barh, R., and Elie, P. 2007. Dispersal in metamorphosing juvenile eel *Anguilla anguilla*. Marine Ecology Progress Series **344**: 213-218.
- FAO/ICES. 2009. FAO European Inland Fisheries Advisory Commission; International Council for the Exploration of the Sea. Report of the 2008 session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels. EIFAC Occasional paper(No. 43): 192pp
- Francis, R.I.C.C. 1990. Back-calculation of fish length: a critical review. Journal of Fish Biology **36**(6): 883-902.
- Gagnaire, P.-A., Normandeau, E., Côté, C., Hansen, M.M., and Bernatchez, L. 2012. The genetic consequences of spatially varying selection in the panmictic American eel (*Anguilla rostrata*). Genetics **190**(2): 725-736.
- Geeraerts, C., and Belpaire, C. 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. Ecotoxicology **19**(2): 239-266.
- Hodson, P.V., Norris, K., Berquist, M., Campbell, L.M., and Ridal, J.J. 2014. Mercury concentrations in amphipods and fish of the Saint Lawrence River (Canada) are

unrelated to concentrations of legacy mercury in sediments. *Science of the Total Environment* **494**: 218-228.

Horton, G.E., Letcher, B.H., and Kendall, W.L. 2011. A multistate capture-recapture modeling strategy to separate true survival from permanent emigration for a passive integrated transponder tagged population of stream fish. *Transactions of the American Fisheries Society* **140**(2): 320-333.

ICES. 2009. Workshop on Age Reading of European and American Eel (WKAREA) 20-24 April 2009, Bordeaux, France. ICES CM 2009\ ACOM: 2048. 2066 pp.

Jacoby, D.M., Casselman, J.M., Crook, V., DeLucia, M.-B., Ahn, H., Kaifu, K., Kurwie, T., Sasal, P., Silfvergrip, A.M., and Smith, K.G. 2015. Synergistic patterns of threat and the challenges facing global anguillid eel conservation. *Global Ecology and Conservation* **4**: 321-333.

Jessop B.M. 2003. Annual variability in the effects of water temperature, discharge, and tidal stage on the migration of American eel elvers from estuary to river. In: Dixon DA (ed) *Biology, management, and protection of catadromous eels*. American Fisheries Society Symposium **33**: 3-16

Jessop, B., Shiao, J., Iizuka, Y., and Tzeng, W. 2007. Effects of inter-habitat migration on the evaluation of growth rate and habitat residence of American eels *Anguilla rostrata*. *Marine Ecology Progress Series* **342**: 255-263.

Jessop, B.M. 2010. Geographic effects on American eel (*Anguilla rostrata*) life history characteristics and strategies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **67**(2): 326-346.

Jones, V.R.P., and Sinha, J.W. 1966. On the sex and distribution of the freshwater eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Zoology* **150**(3): 371-385.

- Jonsson, B., and Jonsson, N. 2014. Early environment influences later performance in fishes. *Journal of Fish Biology* **85**: 151–188.
- Knights, B. 2003. A review of the possible impacts of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. *Science of the total Environment* **310**(1): 237-244.
- Kuroki, M., Marohn, L., Wysujack, K., Miller M., J., Tsukamoto, K., Hanel, R. 2017. Hatching time and larval growth of Atlantic eels in the Sargasso Sea. *Marine Biology* **164**(5): 1-7.
- Lambert, P., Sbaihi, M., Rochard, E., Marchelidon, J., Dufour, S. and Elie, P. 2003. Variabilités morphologique et du taux d'hormone de croissance des civelles d'anguilles européennes dans l'estuaire de la Gironde au cours de la saison 1997-1998. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture* **368**: 69–84.
- Laporte, M., Pavey, S.A., Rougeux, C., Pierron, F., Lauzent, M., Budzinski, H., Labadie, P., Geneste, E., Couture, P., Baudrimont, M. 2016. RAD sequencing reveals within generation polygenic selection in response to anthropogenic organic and metal contamination in North Atlantic Eels. *Molecular Ecology*. **25**: 219-237.
- Larrose, A., Coynel, A., Schäfer, J., Blanc, G., Massé, L., and Maneux, E. 2010. Assessing the current state of the Gironde Estuary by mapping priority contaminant distribution and risk potential in surface sediment. *Applied Geochemistry* **25**(12): 1912-1923.
- Lefebvre F, Fazio G, Mounaix B, Crivelli AJ. 2013 Is the continental life of the European eel *Anguilla anguilla* affected by the parasitic invader *Anguillicoloides crassus*? *Proceeding of the Royal Society B* **280**: 2012-2916.

- Mateo, M., Lambert, P., Tétard, S., Castonguay, M., Ernande, B., and Drouineau, H. 2016. Cause or consequence? Exploring the role of phenotypic plasticity and genetic polymorphism in the emergence of phenotypic spatial patterns of the European eel. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*(in press).
- Miller, M.J., Feunteun, E., and Tsukamoto, K. 2016. Did a “perfect storm” of oceanic changes and continental anthropogenic impacts cause northern hemisphere anguillid recruitment reductions? *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* **73**(1): 43-56.
- Moriarty, C., and Dekker, W. 1997. Management of the European eel. *Fisheries Bulletin*, Vol. 15, The Marine Institute. Dublin, Ireland, pp.110
- Nilo, P., and Fortin, R. 2001. Synthèse des connaissances et établissement d'une programmation de recherche sur l'anguille d'Amérique (*Anguilla rostrata*). Université du Québec à Montréal, département des sciences biologiques pour la Société de la faune et des parc du Québec, direction de la recherche sur la faune, la Société. Québec. 298 p.
- Pavey, S.A., Gaudin, J., Normandeau, E., Dionne, M., Castonguay, M., Audet, C., and Bernatchez, L. 2015. RAD Sequencing Highlights Polygenic Discrimination of Habitat Ecotypes in the Panmictic American Eel. *Current Biology* **25**(12): 1666-1671.
- Pujolar, J., Maes, G., Vancoillie, C., and Volckaert, F. 2005. Growth rate correlates to individual heterozygosity in the European eel, *Anguilla anguilla* L. *Evolution* **59**(1): 189-199.
- R Development Core Team. 2011. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Available online at: <http://www.R-project.org/>.

- Stacey, J.A., Pratt, T.C., Verreault, G., and Fox, M.G. 2014. A caution for conservation stocking as an approach for recovering Atlantic eels. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* **25**: 569-580.
- Svedäng, H., and Wickström, H. 1997. Low fat contents in female silver eels: indications of insufficient energetic stores for migration and gonadal development. *Journal of Fish Biology* **50**(3): 475-486.
- Tableau, A., Drouineau, H., Delpech, C., Pierre, M., Lobry, J., Le Pape, O., Breine, J., and Lepage, M. 2013. A fish-based index of estuarine ecological quality incorporating information from both scientific fish survey and experts knowledge. *Ecological indicators* **32**: 147-156.
- Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., and Budzinski, H. 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. *Chemosphere* **83**(2): 175-185.
- Tesch, F., and Rohlf, N. 2003. Migration from continental waters to the spawning grounds. *In Eel Biology*. Springer. pp. 223-234.
- Thibault, I., Dodson, J.J., Caron, F., Tzeng, W., Iizuka, Y., and Shiao, J. 2007. Facultative catadromy in American eels: testing the conditional strategy hypothesis. *Marine Ecology Progress Series* **344**: 219-229.
- Tremblay, V. 2009. Reproductive strategy of female American Eels among five subpopulations in the St. Lawrence River watershed. *In eels at the edge: science, status, and conservation concerns*. American Fisheries Society, Symposium, pp. 85-102.
- Van Ginneken, V.J., and Van den Thillart, G.E. 2000. Physiology: Eel fat stores are enough to reach the Sargasso. *Nature* **403**(6766): 156-157.

- Vélez-Espino, L.A., and Koops, M.A. 2009. A synthesis of the ecological processes influencing variation in life history and movement patterns of American eel: towards a global assessment. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* **20**(2): 163-186.
- Verreault, G., Dargere, W., and Tardif, R. 2009. American eel movements, growth, and sex ratio following translocation. In *eels at the edge: science, status, and conservation concerns*. American Fisheries Society, Symposium, pp. 129-136.
- Verreault, G., Dumont, P., Dussureault, J., and Tardif, R. 2010. First record of migrating silver American eels (*Anguilla rostrata*) in the St. Lawrence Estuary originating from a stocking program. *Journal of Great Lakes Research* **36**(4): 794-797.

Supplemental Figures

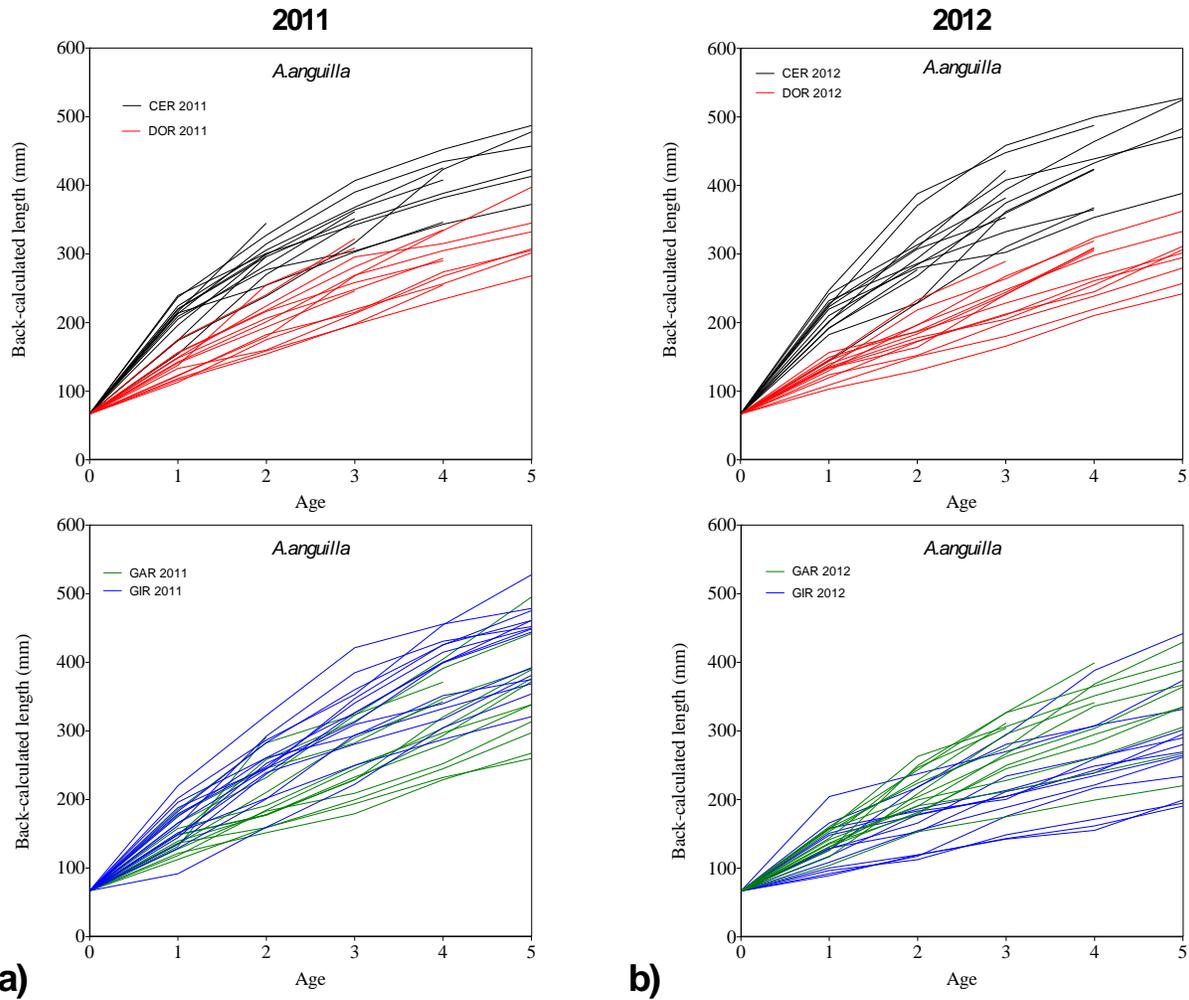


Fig. S1 Growth trajectories of *Anguilla anguilla* captured in fluvial (DOR, Dordogne and GAR, Garonne), estuarine (GIR, Gironde) and coastal (CER, Certes) habitats a) in 2011 and b) in 2012. Each color curve represents an individual growth trajectory from 0 to 5 years old.

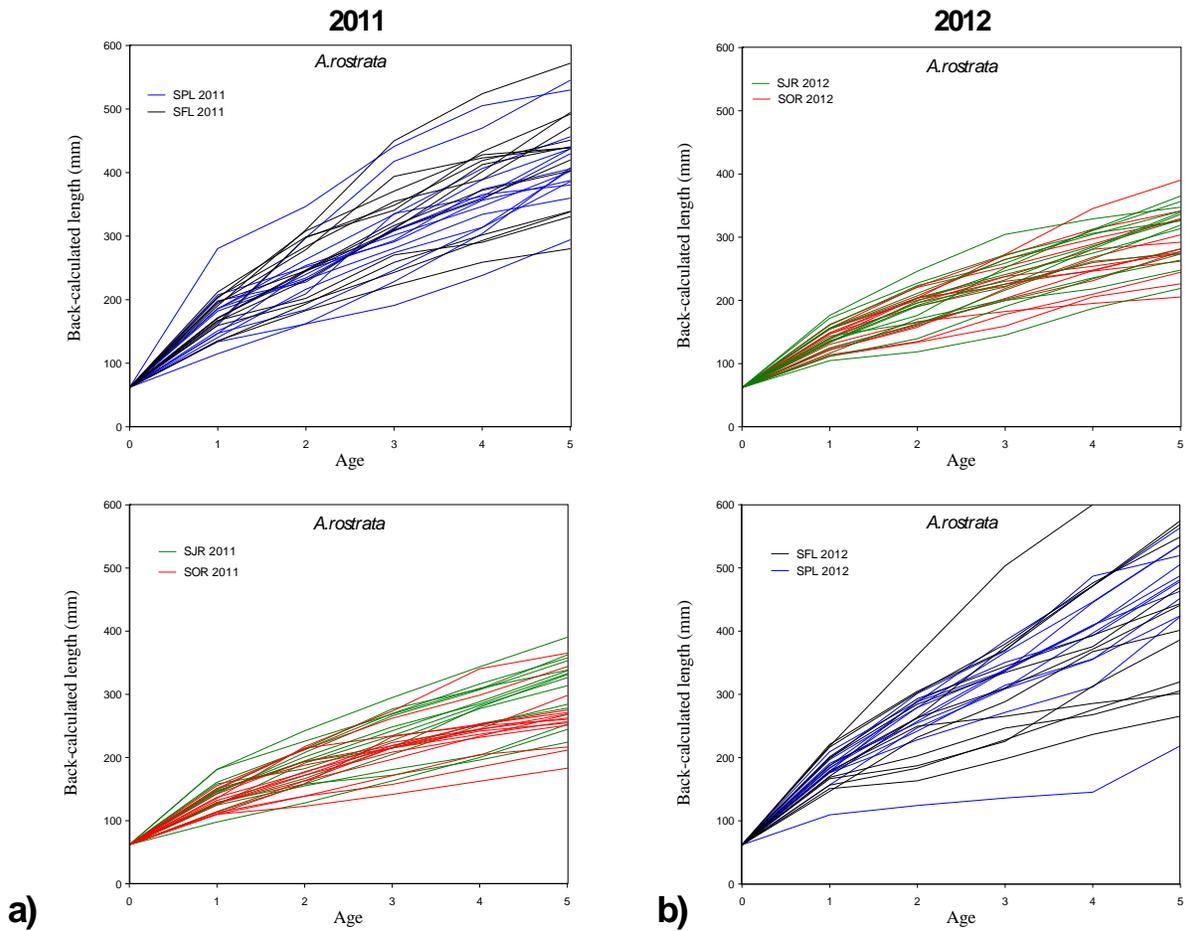


Fig. S2 Growth trajectories representation of *Anguilla rostrata* captured in fluvial (SPL, Lake St. Pierre and SFL, Lake St. François) and estuarine habitats (SJR, St. Jean River and SOR, Sud-Ouest River) a) in 2011 and b) in 2012. Each color curve represents an individual growth trajectory from 0 to 5 years old.

Supplemental Tables

Table S1. Geographical and hydrological characteristics of the Gironde (France) and St Lawrence (Quebec) estuaries.

	Gironde estuary	St. Lawrence estuary
Location (Latitude °N ; longitude °W)	SouthWest France ^{1,2} 45.20°N ; 0.45°W	Eastern Quebec ⁵ 44.06°N ; 76.24°W
Length (km)	76 ^{1,2} (Bec d'Ambès to the limit of Pointe de Suzac-Pointe des Graves)	400 ⁵ (eastern tip of isle Orleans to Pointe des Monts, Northshore)
Width (km)	2 to 11 ^{1,2}	17 to 104 ⁵
Tidal range (m)	1.5 to 5.5 ^{1,2}	3 to 5 ⁵
Depth (m)	5 to 20 ²	13 to > 150 ⁵
Drainage area (km ²)	81 000 ^{2,3}	1 600 000 ⁵
Freshwater discharges (m ³ . s ⁻¹)	2011 May-June: 350 - 337 2012 May-June: 1513 – 666 at Bec d'Ambès ⁴	2011 May-June: 21 925 – 15 707 2012 May-June: 12 567 – 11 922 at Quebec city ⁶

¹Lobry et al. (2003); ²Pasquaud et al. (2008); ³El-Sabh and Silverberg (1990); ⁴ Banque Hydro

(<http://www.hydro.eaufrance.fr/>); ⁵ St Lawrence Center, 1996; ⁶ SLGO (<http://slgo.ca/en/>)

Table S2. Comparison of biological characteristics between Females (F) and Undifferentiated (U) yellow *Anguilla anguilla* sampled in GAR and DOR in 2011 and 2012.

Site	2011				2012			
	DOR		GAR		DOR		GAR	
Sex	<u>U</u>	<u>F</u>	<u>U</u>	<u>F</u>	<u>U</u>	<u>F</u>	<u>U</u>	<u>F</u>
N	8	5	12	2	4	12	10	4
BL (mm)	320 (289, 346)	347 (302, 424)	383 (355, 410)	460 (403, 507)	372 (352, 400)	425 (380, 540)	371 (357, 378)	554 (481, 622)
BW (g)	45 (34, 62)	59 (47, 138)	90 (64, 116)	143 (110, 224)	77 (67, 89)	100 (77, 202)	81 (75, 94)	293 (212, 425)
Age (year)	4 (4, 5)	5 (5, 5)	4 (4, 4)	7 (5, 7)	5 (4, 7)	7 (5, 14)	8 (7, 8)	12 (9, 15)
GR (mm/year)	79 (70, 89)	69 (61, 85)	96 (89, 103)	70 (58, 84)	79 (56, 91)	60 (39, 74)	50 (45, 54)	44 (45, 54)

Each value represents the median (Q1, Q3) for each biological characteristic. No significant differences were observed between F and U (Student T-test, $p < 0.05$).

Table S3: Back-Calculated lengths from 1Y to 5Y years for *A. anguilla* and for *A. rostrata* following the capture sites and species.

Site	<i>A. anguilla</i>				<i>A. rostrata</i>			
	DOR	GAR	GIR	CER	SFL	SPL	SOR	SJR
Length at 1Y (mm)	134 ^b (122, 146)	136 ^b (118, 156)	152 ^b (133, 171)	219 ^a (201, 228)	171 ^a (163, 171)	184 ^a (166, 184)	134 ^b (120, 134)	142 ^b (125, 142)
Length at 2Y (mm)	184 ^c (164, 201)	178 ^c (156, 216)	239 ^b (200, 257)	298 ^a (278, 312)	248 ^a (201, 294)	255 ^a (235, 284)	177 ^b (160, 204)	193 ^b (164, 212)
Length at 3Y (mm)	242 ^c (211, 264)	221 ^c (195, 278)	304 ^b (256, 327)	362 ^a (342, 393)	314 ^a (256, 357)	314 ^a (292, 345)	219 ^b (200, 238)	234 ^b (204, 265)
Length at 4Y (mm)	277 ^c (255, 309)	261 ^c (233, 317)	351 ^b (304, 400)	423 ^a (382, 439)	374 ^a (293, 424)	393 ^a (351, 428)	247 ^b (232, 272)	282 ^b (247, 308)
Length at 5Y (mm)	330 ^c (284, 333)	299 ^c (264, 374)	389 ^b (345, 451)	471 ^a (413, 487)	439 ^a (337, 477)	457 ^a (405, 513)	273 ^b (254, 300)	327 ^b (276, 343)

Each value represents the median (Q1, Q3) for each site. Within a species, different superscript lowercase letters a, b and c indicate statistically significant differences among sites (ANOVA or Kruskal Wallis, $p < 0.05$)

9. ARTICLE 2

Patey G., Couillard C. M., Pierron F., Baudrimont M. et Couture P. Les réponses des biomarqueurs de biotransformation, antioxydants et histopathologiques aux contaminants chez les anguilles jaunes européennes et américaines des estuaires de la Gironde et du St. Laurent.

Sous presse dans Chemosphere. DOI :10.1016chemosphere-2017-08-139

Géraldine Patey : Échantillonnage sur le terrain, analyses biochimiques et histopathologiques, traitement et interprétation des données et rédaction de l'article.

Catherine M. Couillard : Contribution aux traitements des analyses biochimiques et histopathologiques, interprétation des données et rédaction de l'article.

Patrice Couture : Contribution à l'interprétation des données et rédaction de l'article.

Fabien Pierron et Magalie Baudrimont : Révision de l'article.

Biotransformation, antioxidant and histopathological biomarker responses to contaminants in European and American Yellow Eels from the Gironde and St. Lawrence Estuaries

Géraldine Patey^{1,2}, Catherine M. Couillard², Fabien Pierron³, Magalie Baudrimont⁴ and Patrice Couture^{1*}

¹ Institut National De La Recherche Scientifique (INRS), Centre Eau Terre Environnement, 490 De La Couronne, Québec (Québec), G1K 9A9, Canada. Email: geraldine.patey@ete.inrs.ca

² Fisheries and Oceans Canada, Maurice Lamontagne Institute, 850 Route de la Mer, Mont-Joli (Québec), G5H 3Z4, Québec, Canada. Email : catherine.couillard@dfo-mpo.gc.ca

³ CNRS, UMR EPOC CNRS 5805, F-33400 Talence, France. Email: f.pierron@epoc.u-bordeaux1.fr

⁴ Univ. Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, F-33400 Talence, France. Email: magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr

* Corresponding author. Email: patrice.couture@ete.inrs.ca; Phone: +1 418 654 3825

Abstract

Since the early 1980s, populations of American (*Anguilla rostrata*) and European eels (*Anguilla anguilla*) have suffered a sharp decline. The causes of their decline are likely multifactorial and include chemical pollution. A field study was conducted in eight sites varying in organic and metal contamination along the St. Lawrence (Eastern Canada) and Gironde (France) systems to investigate the relationships among contaminants, biological characteristics and biotransformation, antioxidant and histopathological biomarkers in eels from both species. For *A. rostrata*, no major influences of persistent organic contaminants on biomarkers were identified. For *A. anguilla*, eels from the most contaminated site expressed higher surface of MelanoMacrophage Centers (MMCs) and eels from another contaminated site expressed higher amount of spleen lipofuscin pigment. These two histopathological biomarkers were also associated with aging. Compared to eels from the cleanest French site, higher hepatic catalase activity and density of MMC in eels from contaminated sites was related to higher concentration of organic (DDT and metabolites, sum of PCBs, sum of PBDEs) and inorganic (Hg and Cd) contaminants. In both species, a higher deposition of spleen hemosiderin pigment was measured in eels from the most brackish sites compared to eels living in freshwater environments. Our results suggest an association between higher hemosiderin pigment and metal contamination (As for *A. anguilla* and Pb for *A. rostrata*). Parasitism by *A. crassus* was observed in European eels from freshwater sites but not in eels from brackish habitats. Overall, contamination may pose a greater risk for the health of European compared to American eels.

Keywords: EROD activity, Antioxidant enzymes, Histopathological markers, Pollution, Atlantic Eels

1. Introduction

In the Northern hemisphere, the abundance of European eel (*Anguilla anguilla*) and American eel (*Anguilla rostrata*), here called “Atlantic eels”, has severely declined since the early 1980’s (FAO/ICES, 2009; Cosewic, 2012). The causes of their decline are likely multifactorial, including variables such as oceanographic and climate changes, overfishing, barriers to migration, habitat degradation, parasites and chemical pollution (Castonguay et al., 1994; Geeraerts and Belpaire, 2010). Although management and restoration programs have been conducted in several hydrosystems in Europe and North America, eel stocks have not recovered to levels of the past (ICES 2016). An increasing number of recent reports support that pollutants might be among the possible synergistic causes contributing to the collapse of eel stocks (Belpaire et al. 2016). Due to their unique ecological and physiological traits, eels are particularly prone to bioaccumulation of contaminants through gills, skin and contaminated food during their feeding and growth stage (yellow eel). Eels are facultative catadromous fish that can be in contact with contaminated sediments for extended periods, leading to the accumulation of high concentrations of organic contaminants due to their high lipid content (Robinet and Feunteun, 2002; Daverat and Tomás, 2006; Thibault et al., 2007). Finally, eels are considered good bio-indicators of contaminated habitats and are expected to reflect the impacts of local pollutants (Belpaire and Goemans, 2007).

Recently, decreasing muscle concentrations of organic contaminants such as PolyChlorinated Byphenyls (PCBs) and OrganoChlorine Pesticides (OCPs) have been reported in eels from some historically contaminated habitats since their ban 40 years ago (Belpaire et al., 2016). From 1988 to 2008, a decreasing trend in PCB and OCP concentrations has been reported in the muscle of *A. rostrata* from the historically contaminated Lake Ontario (Byer et al. 2013). This trend was confirmed by a significant decrease in the embryotoxic potential of organic mixtures extracted from Lake Ontario eels captured in 1988, 1998 and 2008 for developing *Fundulus heteroclitus* (Rigaud et al. 2016). However, these contaminants are persistent in sediments and levels of PCBs, OCPs and PolyBrominated Diphenyl-Ethers (PBDEs) still remain high and preoccupying

in yellow eels, for example in eels from the Gironde system (Tapie et al., 2011; Guhl et al., 2014). In addition to organic contaminants, metals such as mercury (Hg) and cadmium (Cd) show no trend of decrease and persist in contaminated areas (Maes et al., 2008). Consequently, eels inhabiting contaminated areas could be still affected by a combination of contaminants acting synergistically.

Several field and laboratory studies have reported effects of contaminants in eels at several levels of biological organization from the cellular, molecular and tissue levels to the level of whole organisms using various biological biomarkers to investigate their health status. They have shown that contaminants can delay growth, reduce lipid storage efficiency, cause oxidative stress, induce DNA damage and histopathological lesions, which can ultimately negatively affect migratory and reproductive capacities (Couillard et al., 1997; Robinet and Feunteun, 2002; Palstra et al., 2006; Pierron et al., 2007; Geeraerts and Belpaire, 2010, Gravato et al. 2006). Others effects such as disturbances of the immune and endocrine systems and a reduction of migratory and reproductive capacities have been also reported (Belpaire et al. 2007). In addition, ecological gradients such as latitudinal cline, longer distances to the spawning site and differences in salinity directly or indirectly affect growth rate, body condition, size at metamorphosis and lipid storage, which in turn could affect contaminant uptake (Vøllestad, 1992; Edeline et al., 2007; Thibault et al., 2007; Belpaire and Goemans, 2007; Jessop, 2010; Daverat et al., 2012). For *A. anguilla*, studies have suggested that the nematode *Anguillicola crassus* in the swimbladder of yellow eels could affect their swimming performance, reduce their resistance to other stressors such as contamination and increase spleen size, macrophage and lymphocyte production to combat parasites (Kirk et al., 2000; Lefebvre et al., 2004).

In a series of related studies performed by our team along the St. Lawrence and Gironde hydrosystems (Eastern Canada and Southwest France, respectively), we have identified that certain metals and organic contaminants could disturb physiological functions in yellow Atlantic eels (Baillon et al., 2015a, 2015b, 2016; Caron et al., 2016; Pannetier et al., 2016). In Baillon et al. (2015a, 2015b, 2016), we conducted a large scale and without *a priori* transcriptomic based approach. The global hepatic transcriptome of animals was determined by RNA-Seq. Genes that most likely

responded to single factors were identified. We detected transcriptomic responses typical of PCB-170 and Cd exposure in wild *A. anguilla* collected in the most contaminated site in the Gironde Estuary, associated with changes in the transcription levels of genes involved in hepatic energy metabolism. In another paper (Caron et al. 2016), we focused on biomarkers involved in glycolytic, aerobic and anaerobic capacities and lipid metabolism. We reported an association between silver (Ag), lead (Pb) and arsenic (As) contamination in wild *A. rostrata* from the St. Lawrence River system and inhibition of the enzyme G6PDH, involved in lipid metabolism in liver and which also plays a role in oxidative stress response. This study has also shown an association between zinc (Zn), copper (Cu) and Pb contamination and altered glycolytic and anaerobic capacities in wild *A. anguilla* from the Gironde system. More recently, we have demonstrated a significant difference in early size-at-age (a proxy of early growth rate) between yellow eels captured upstream compared to downstream sites of the St. Lawrence and the Gironde systems (Patey et al., In press). These differences were present as early as 1 year old and could influence contaminant accumulation.

In the present study, we investigated the relationships among tissue concentrations of inorganic and organic contaminants, biological characteristics such as size, age, condition factor and muscle lipids and a set of complementary biomarkers such as hepatic biotransformation enzymes, antioxidant enzymes and splenic histopathological measurements in Atlantic eels. The selected biomarkers have been successfully used, alone or in combination, in previous biomonitoring studies on eels (Couillard et Hodson, 1996; Pacheco et Santos, 2002; Van der Oost et al., 2003; Buet et al., 2006; Schwindt et al., 2008) and are among the list of recommended biomarkers in the Report of the Workshop of the Working Group on Eels and the Working Group on Biological Effects of Contaminants (ICES 2016). First, we examined the induction of Cytochrome P450-dependent monooxygenase, measured as ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) in eel livers. This biotransformation marker is involved in a well-documented biochemical reaction of fish to organic planar contaminants such as PCBs, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), dioxins and furans and may be related to other effects such as oxidative stress (Van der Oost et al., 2003; Whyte et al., 2008). Secondly, we measured hepatic activities of two antioxidant enzymes, catalase (CAT) and superoxide dismutase

(SOD), commonly used as biomarkers of antioxidant capacities in fish and induced by several contaminants such as PCBs, PAHs, organochlorine pesticides (OCPs) and metals (Van der Oost et al., 1996; Livingstone, 2001). In addition, we examined a suite of histopathological biomarkers induced by chronic exposure to contaminants, including density and surface of melano-macrophage centers (MMCs) and deposition of lipofuscin and hemosiderin pigments in spleen (Wolke, 1992; Couillard et al., 1997; Fournie et al., 2001; Au, 2004). In general, biomolecular biomarkers such as EROD, CAT and SOD are more sensitive and specific short-term responses (days to weeks), whereas histopathological biomarkers are responses to chronic exposure to contaminants and reveal more persistent damage.

In this study, yellow eels were sampled in four sites varying in anthropogenic pressure and contamination level in each of the Saint Lawrence System (SLS, Quebec, Canada) and the Gironde System (GS, France), for two consecutive years. The objectives of this study were: (1) to examine variations in responses of biomarkers in wild American and European eels among sampling sites varying in contamination levels and between sampling years within a species; (2) to investigate the relationships between biological characteristics, contaminants and biomarker responses; and (3) finally, to generate a database to better target and prioritize future studies on the impacts of contaminants on eel health in the Gironde and St. Lawrence River basins.

2. Materials and methods

2.1 Sampling sites

A total of 240 yellow eels (15 yellow eels/site/year/species) were captured in eight different sites selected according to salinity, metal and organic contamination gradients found in sediments and biota along the SLS and the GS in May and June 2011 and 2012 as previously described by Baillon et al. (2015b) and Laporte et al. (2016). For *A. rostrata*, each year, 60 yellow eels were sampled in two references sites, St Jean River (SJR, freshwater tributary of the Gulf of the SLS) and Sud-Ouest River (SOR, freshwater tributary of the estuary of the SLS) and two fluvial contaminated sites, St. Pierre Lake (SPL) and St. François Lake (SFL). Yellow eels from SOR and SJR were captured in

running freshwater habitats, which are tributaries opening into a brackish estuary suggesting an influence of marine water (Thibault et al., 2007).

For *A. anguilla*, each year, 60 yellow eels were sampled in two fluvial sites, the Dordogne river (DOR, considered as the least contaminated site in the watershed of the Gironde) and the Garonne river (GAR, located near the city of Bordeaux and contaminated), one estuarine site, Gironde (GIR, contaminated by metals and organic contaminants, (Kessaci et al., 2014)) and finally, one salt marsh site in the Arcachon Bay, Certes (CER) considered as a reference site.

2.2 Wild eels sample collection

All yellow eels were processed using the same standardized protocols in France and in Québec. European and American yellow eels were captured using fyke nets (mesh size of 6.4 mm), trawl (mesh size of 31 mm) and electro-fishing by professional fishers or technical staff. Given the substantial variability in the size of eels growing in different habitats, it was not possible to collect same-sized eels in each sampling site. Body Length (BL) (± 1 mm) and Body Mass (BM) (± 0.1 g) were measured for each fish in order to estimate the condition factor K ($K=[(BM \text{ (g)})/(BL \text{ (cm)}^3)]$). We also determined the ocular index (OI) expressed in % which reflects changes in eye diameter, a useful criterion for assessing the degree of sexual maturation/silvering in eels. Ocular enlargement occurs early in the sequence of sexual maturation (Acou et al., 2005; Durif et al., 2005) and is thought to be a requirement for migration at depth in the ocean. Then, eels were killed as soon as possible by decapitation and rapidly dissected to collect parts of liver, caudal muscle and spleen for biochemical and histological analyses. Samples of muscle were dissected in a standardized area situated at 2 cm posterior to the anus and above the lateral line and kept in aluminum foil at -20°C . Samples of liver were stored in cryogenic tubes at -80°C and samples of spleen were fixed in bottles containing 10% phosphate-buffered formalin. Age was determined from transverse sections of sagittal otoliths as described previously by Verreault et al. (2009). Muscle lipid content was determined by gravimetry after filtration and evaporation of an aliquot of the DiChloroMethane (DCM) extract from the same standardized area of muscle described above and was expressed in percentage of dry-basis lipid content.

The moisture content was determined as described by Tapie et al., (2011) and expressed in percentage of wet-basis moisture content. Finally, each swimbladder was dissected and examined macroscopically to determine the presence of the parasite *A. crassus* (Girard and Elie, 2007). Parasite identification followed descriptions of Moravec and Taraschewski (1988).

Metal analyses (Ag, As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Se, Zn, Hg) were carried out in liver and muscle samples as previously described by Pannetier et al. (2016). The concentrations of seven indicators of PCBs (CB50+28, CB 52, CB 101, CB 118, CB 138, CB 153 and CB 180), eight OCPs (2,4'-DDE, 4,4'-DDE, 2,4'-DDD, 4,4'-DDD, 2,4'-DDT and 4,4'-DDT, hexachlorobenzene (HCB) and lindane) and eight PBDEs (BDE 28, 47, 49, 99, 100, 153, 154, 183, 209), were performed on muscle samples following the procedures described by Caron et al. (2016).

2.3 EROD activity

Supplies and chemicals for EROD assay were purchased from Sigma–Aldrich (St-Louis, MO, USA). EROD activity was measured using a spectrofluorimetric method adapted for microplates by Fragoso et al. (1998). This measure is based on the increase of the fluorescence in the reaction medium due to the transformation of 7-ethoxyresorufin (7-ER) into resorufin. EROD activity was measured in the post-mitochondrial supernatant prepared from homogenates of 50 mg crushed liver in 1 ml of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) (0.1 M, pH = 7.8) grinding buffer and centrifuged at 10 000 g during 20 min at 4°C. Reaction mixtures contained 50 µl of supernatant in HEPES buffer, 10 µl of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH, 20 mg/ml), and 50 µl of 7-ethoxyresorufin (0.024 mg/ml) in DiMethylSulfOxide (DMSO). The activity was quantified in 96-well microplates using a Cytofluor II® plate reader (excitation 530 nm, emission 590 nm, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA). The fluorescence of resorufin was measured at 60 s intervals during 13 min. Fluorescence readings were compared to a resorufin standard curve. All samples were assayed in triplicate. Total protein concentration of the supernatant was measured with Bradford reagent, using bovine serum albumin as a protein standard (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). EROD activity was

expressed as pmol resorufin/min/mg protein. In addition to randomized samples from different sites on each microplate, a positive control was added to assess the quality and repeatability of measurements. Liver homogenates from pooled livers of 15 Atlantic tomcod which were injected 20 mg/kg benzo[a]pyrene (10 mg/ml in corn oil) intraperitoneally and sampled 48 h after treatment were used as positive controls (Couillard et al., 2004). Coefficients of variation among samples and positive control replicates were < 20%, and the coefficient of variation of the sample means was < 25%.

2.4 Antioxidant enzymes

Catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes were measured in cytosolic supernatant prepared from homogenates of 50 mg crushed liver in HEPES buffer. Liver samples were constantly kept on ice during homogenization. An aliquot of the homogenate was centrifuged at 1 500 g for 5 min at 4°C and the supernatant was stored at – 80°C for SOD assays whereas a second aliquot was centrifuged at 10 000 g for 15 min at 4°C and the supernatant was stored at – 80°C for CAT assays. Catalase and SOD activities were measured using commercial kits from Cayman Chemical Company Inc. (Ann Arbor, MI, USA) in 96 well microplates with a UV/visible spectrophotometer (Cary 50, Varian inc.). The CAT assay is based on the reaction of the enzyme with methanol in the presence of an optimal concentration of H₂O₂. The generated formaldehyde is allowed to react with 4-amino-3-hydrazine-5-mercapto-1,2,4-triazole (as the chromogen). The aldehydes, upon oxidation, change from colorless to a purple color that is measured spectrophotometrically at 540 nm. One unit (U) of CAT activity is defined as the amount of enzyme that causes the formation of 1 nmol of formaldehyde/minute at 25°C. The SOD assay utilizes a tetrazolium salt for detection of superoxide anion radicals generated by xanthine oxidase and hypoxanthine measured spectrophotometrically at 450 nm. One unit of SOD is defined as the amount of enzyme needed to exhibit 50% dismutation of the superoxide radical. All samples were tested in triplicate and each absorbance reading was compared to a standard curve and a positive control. Total protein concentration of the supernatant was determined using the Bradford (1976) method using bovine serum albumin as standard and CAT and SOD activities were expressed as μmol/min/mg protein.

2.5 Histopathological biomarkers

The spleen was selected as a tissue for the examination of the impacts of contaminants on histopathological biomarkers in fish (Au, 2004). A transversal section from the central part of spleen was fixed in 10% phosphate-buffered formalin within minutes after death. Samples were then embedded in paraffin and 6 μm thick sections were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) (Luna, 1968). Two additional sections of spleen were stained with Perls' Prussian blue staining for ferric iron associated with hemosiderin deposits or with Schmorl staining for lipofuscin deposits (Luna, 1968).

To be categorised as a MMC, a MMC had to be composed of three or more macrophages containing yellow to dark brown pigments within their cytoplasm (Couillard and Hodson, 1996). In sections of spleen stained with HE, the density of MMCs was evaluated by counting the number of MMCs at 100X magnification in three randomly selected microscopic fields and by dividing this number by the area of the fields examined (2.86 mm^2). The surface areas of 10 randomly selected MMC were measured with an image analysis system (Image-Pro Express software, version 6.0) and mean of surface area of MMCs were calculated for each fish. The proportion of 25 randomly selected MMCs that stained positively with Perls' Prussian Blue for hemosiderin and Schmorl for lipofuscin was evaluated at 100X magnification. The intensity of staining was graded from 1 to 5 (1: no macrophage stained; 2: 0-25% stained; 3: 25-50% stained; 4: 50-75% stained and 5: > 75%). The reproducibility of the methods was assessed by repeated measurements of a subsample ($\approx 10\%$) of slides. The coefficient of variation among the mean of the third quartile (Q3) for the density and for the surface of MMCs separately in twelve eels were < 25% (repeated 3 times by two different observers for each eel). All tissues were examined blindly and randomly without the observer knowing the site of origin of eels. Density was expressed as number of MMC/ mm^2 and surface as mm^2/MMC .

2.6 Statistical analyses

Analyses of variance were conducted using Prism v. 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) and multivariate analyses were conducted using XLSTAT-

ADA (Addinsoft, USA). Male eels were removed due to a small sample size (N=3 in the GS and N=0 in the SLS). Eels ≤ 2 years old and ≥ 20 years old were also removed, because they were restricted to a small number of sites/sampling year. The total number of eels retained for statistical analyses of variance were 105 in *A. rostrata* and 111 in *A. anguilla* (Table 2).

Before performing the tests, homoscedasticity and normality of data were verified using the Bartlett and the Shapiro-Wilk tests respectively. Biological characteristics, contaminant concentrations and biomarker data were first compared among sampling years within sites using the student t-test ($p \leq 0.05$). Then, data were compared among sampling sites within species using a one-way ANOVA test followed by Tukey-Kramer HSD test to identify significant differences between pairs ($p \leq 0.05$). A non-parametric Kruskal-Wallis test (KW) followed by Dunn's test was performed when the ANOVA's assumptions were not met.

Principal Component Analyses (PCAs) and Kendall rank correlation were performed to explore the relationships among biomarker responses, contaminants and biological characteristics for the two years combined in each species. Prior to PCA analyses, correlation matrices were performed by category of contaminants for PCBs, DDTs, and for PBDEs in order to group contaminant variables correlated with each other from the same category and improve the quality of PCA (data not shown). Due to very strong correlations among all PCB congeners, the sum of 7 PCBs was used. For contaminants of the DDT family, only the muscle concentrations of 4,4'-DDD, 2,4'-DDE and 4,4'-DDE were retained. For contaminants of the PBDE family, only PBDEs 47, 100, 153 and 154 were included. Finally, essential metals (Cu, Se and Zn) in liver and muscle were removed from the analysis since their concentrations were unlikely to pose a risk to the health of eels (Pannetier et al., 2016). Consequently, the non-essential metals Ag, Cd, Pb, Hg and As in muscle and in liver (except for liver Hg due to high proportion of missing values) were kept for PCAs. Only individuals for which measurements were available for each variable were retained for the PCAs (N=82 for *A. rostrata* and N=87 for *A. anguilla*).

In summary, a set of 17 variables including 9 categories of contaminants [sum of PCBs, sum of DDT and metabolites, hexachlorobenzene, lindane, sum of PBDEs,

muscle Ag, Cd, Pb, Hg and As, liver Ag, Cd, Pb and As], 5 biological variables (BL, BM, lipids, age, number of *A. crassus*) and 7 biomarker variables (EROD, CAT, SOD, density and surface of MMCs, lipofuscin and hemosiderin pigments) were considered in a total of 82 yellow eels for *A. rostrata* and 87 yellow eels for *A. anguilla* captured in both years. For contaminants, non-detectable data were replaced by ½ of their Limits of Detection (LoDs). Kendall rank correlations were used to assess the strength relationships among biomarkers, contaminants and biological characteristics. The significance level (p value) of the Kendall's correlations was fixed at 0.05.

3. Results and discussion

3.1 Morphometry and level of contamination in *A. rostrata* and *A. anguilla*

Since contamination and biological characteristics of eels from this study have been reported in companion studies (Baillon et al., 2015b; Baillon et al., 2016; Caron et al., 2016; Laporte et al., 2016; Pannetier et al., 2016), they will only be briefly summarized here.

For *A. rostrata*, fish from the fluvial lakes SPL and SFL were generally larger, older and fatter than fish from SOR and SJR (significantly in 2011 but not in 2012) and no *A. crassus* was detected in American eels (Tables 2 and S.1). As reported by Baillon et al. (2015b), eels from the fluvial lakes SPL and SFL were more contaminated with organic chemicals such as PCBs, PBDEs and DDT and metabolites than fish from the downstream sites SOR and SJR (Table S.2). For non-essential metals, significantly higher concentrations of Cd and Pb were observed in eels sampled in the downstream site SOR compared to the upstream site SFL (Table S.3 and S.4). Muscle Hg was significantly higher in eels from upstream sites SPL and SFL compared to SJR (Pannetier et al., 2016). For *A. anguilla*, in 2011, fish from GIR were significantly longer, heavier and fatter than eels from all other sites and in 2012, the size of eels from GIR was comparable to that of fish from GAR and CER (Table S.1). In both years, eels from GAR were significantly older than eels from DOR and CER and eels from DOR were significantly smaller and lighter than eels from the other sites. A concentration gradient of increasing organic contamination (PCBs, PBDEs and DDT and metabolites) was observed along the French sites in the order CER-DOR-GAR-GIR (Table S.2). High

tissue concentrations of Cd (muscle and liver) and Pb (liver) were detected in eels from the most contaminated sites GIR and GAR and surprisingly also in eels from DOR, a site originally considered as clean (Pannetier et al., 2016). In both species, higher As concentrations were found in fish from the reference sites CER and SJR and from the contaminated site GIR which had in common an elevated salinity (Pannetier et al., 2016). For *A. anguilla* from the most contaminated site GIR, muscle PCBs, DDT and metabolites and Cd concentrations were 10 and 11-folds higher than in *A. rostrata* from the contaminated sites SPL (Tables S.2 and S.4). Eels from SPL had two-fold higher muscle PBDE concentrations and three-fold higher muscle Hg concentrations than eels from GIR (Tables S.2 and S.3). Eels from CER had three-fold higher concentrations of muscle As than eels from SJR (Tables S.2 and S.4). Finally, the ocular index (OI) reached $2.7 \pm (2.0, 3.8)$ (median \pm (Q1, Q3); n=108) and $3.9 \pm (3.3, 4.8)$ (median \pm (Q1, Q3); n=111) for *A. rostrata* and for *A. anguilla* respectively. In pre-migrating silver eels, this index should be > 6.5 (Cottrill, 2002; Pankhurst, 1982). Hence, our eels were not pre-migrating and were all yellow eels.

3.2 Patterns of biological characteristics, contaminants and biomarker responses in *A. rostrata*

The first 3 principal components of the PCA (PC1, PC2 and PC3) covered 37 % of the total variability of the overall data (Table 1). Principal component 1 was mainly composed of biological variables and organic and inorganic contaminants and it separated in two distinct clusters eels from the contaminated sites SFL and SPL from the reference sites SOR and SJR (Figs. 2 a and b). The previously described associations between high concentrations of persistent organic contaminants, higher fat content and older age (Larsson et al, 1990) are illustrated on this axis. No significant association between muscle lipids and biomarker responses were observed although muscle lipids were positively correlated to concentrations of lipophilic organic contaminants (Table S.6). Thus, there is no evidence of a detrimental effect of these compounds on lipid accumulation in yellow eels. Principal component 2 was mainly composed of metal contaminants (Figs. 2 a and b). The majority of eels from SJR were associated with muscle and liver As in agreement with higher As levels (although non-

significant, Tables S.3 and S.4) compared to the group of eels from SOR which was associated with liver Cd. Higher As concentrations in fish from SJR are typical of fish living in marine environments (Pannetier et al., 2016) and could be explained by differences in migratory behavior, spatial distribution and feeding. Further studies combining chemical analyses of otoliths with biomarker and contaminant measurements are recommended to verify this hypothesis. No biomarker variables were distributed along the PC1-axis or the PC2-axis (Table 1 and Fig. 2 a). Since PC1 and PC2 discriminated sampling sites, our results are consistent with the absence of significant differences for most biomarkers (EROD activity, density, surface and accumulation of pigments in splenic MMC) among sampling sites and between years presented in Table 2.

The density and surface of MMCs and the deposition of hemosiderin pigments were distributed along the PC3-axis (Table 1). Hemosiderin pigments in spleen MMC were associated to a group of eels from SOR and SJR sites (Fig. 2 a). Moreover, they were negatively correlated with size and organic contaminants and weakly positively correlated with muscle and liver Pb (Table S.5). An experimental study using common carp (*Cyprinus carpio* L.) has already demonstrated hemosiderin deposition in fish exposed to a mixture of metals (Cd, Pb, Cr and Ni) compared to controls (Vinodhini and Narayanan, 2008). However, given the weak correlation and the lack of significant difference among sites (Fig. 2 a), it seems difficult to conclude for an effect of Pb on deposition of hemosiderin pigment. Note however that in a companion study from the same research project, Caron et al. (2016) identified an association between Ag, Pb and As contamination and an inhibition of the hepatic enzyme G6PDH in the same eels as those used in this study, suggesting an effect of metal contamination in these eels. This enzyme is involved in lipid metabolism and is closely related to antioxidant response (Martinez-Alvarez et al., 2005). Differences in environmental conditions in estuarine compared to fluvial sites could contribute to increase hemosiderin deposition in SJR and SOR sites through exposure to an unknown biological or chemical hemolytic agent.

Catalase and SOD activities were not significantly correlated with PC1, PC2 or PC3 axes and their explained variance (%) was low (Table 1). Although CAT activity was not correlated with biological characteristics or contaminants (Table S.5), eels from

SOR expressed significantly higher activities of hepatic CAT than fish from other sites in 2011 (but not in 2012) and a significant inter-annual difference was observed, with higher CAT activity in 2011 in SOR (Table 2). SOD activity was negatively correlated with size, muscle lipid content and PCBs, more weakly with age, PBDEs and DDT and metabolites and was associated with a group of eels from SOR and with some fish from SPL (Fig. 2 and Table S.5). This observation is consistent with significantly higher liver SOD activity found in eels from SOR in both years and with the significant inter-annual difference observed for SOD, higher in 2012 in SPL fish (Table 2). SOD activity was weakly positively correlated to liver Cd which could possibly explain the high level of SOD activity in SOR and SPL fish (Table S.5). As shown in Fig. 2, a majority of eels from SOR and some eels from SFL were associated with the liver Cd vector in agreement with the significantly higher liver Cd observed in eels from SOR compared to eels from SJR and SFL (Table S.4). Similar results were observed by Martinez-Alvarez et al. (2005), who reported that Cd exposure could cause an increase in antioxidant enzymes by competing with essential metals on protein-binding sites. Further experimental studies are needed to confirm the potential cause-effect relationship behind this weak association.

Although EROD activity did not vary significantly among sites and years, in 2011 however, EROD activity was highly variable in eels from SPL compared to the other sites (with a high 75th percentile of 31.6 compared to 15.7 and 10.3 for SOR and SJR sites respectively, Table 2).

Previous studies conducted in the Gironde and St. Lawrence River systems have reported that some eels during their growth phase migrate from the upstream to the downstream sections and inversely (Daverat and Tomás, 2006; Thibault et al., 2007). Inter-individual variations in migratory behaviour and growth rates (Patey et al., In press), in addition to variations in diet selection (Pegg et al., 2015) could affect contaminant uptake. Although a wide range of persistent contaminants (PCBs, PBDEs, pesticides and metals) were measured in eels in this study, other contaminants could influence the biomarker responses. PAHs are known to induce both EROD and antioxidant enzyme activities (Martinez-Alvarez et al., 2005; Whyte et al., 2008). For example, in field and experimental studies, Gravato et al. (2006, 2010) reported

significant increases in liver EROD activity and antioxidant capacities in European eels contaminated by PAHs. Seasonal or inter-annual variations in natural factors such as temperature and salinity could also influence antioxidant defense and biotransformation enzyme activities in fish, even if exposure remains constant (Martinez-Alvarez et al., 2005; Whyte et al., 2008; Chainy et al., 2016). Eels sampled in tributaries from the downstream St. Lawrence system (SOR and SJR), exposed to a strong salinity gradient over a short distance, are possibly more prone to variations in salinity, metal contaminants and temperature which may possibly cause inter-annual variations in antioxidant enzymes (Thibault et al., 2007; Pannetier et al., 2016).

3.3 Patterns of biological characteristics, contaminants and biomarker responses in *A. anguilla*

The first 3 principal components of the PCA covered 39 % of the variability of the overall data (Table 1). PC1 was mainly composed of age, organic and inorganic contaminants and mainly contributed to separate the most contaminated sites GIR and GAR from the reference site CER (Fig. 3 and Table 1). Like for *A. rostrata*, *A. anguilla* muscle lipids were significantly correlated with morphometric and organic contaminants and no strong correlations were observed among biomarker responses and muscle lipids (Kendall rank correlation < 0.200, Table S.6) suggesting no deleterious effect of contaminants on fat reserves.

Hemosiderin pigment deposition in splenic MMC was distributed along the PC2-axis (Table 1 and Fig. 3 a). Hemosiderin pigment, muscle and liver As scored positively on PC2 and were significantly and positively correlated with each other (Fig. 3 a and Table S.6). Moreover, vectors of these variables are oriented between eels from CER and GIR (Fig. 3 b). This observation is consistent with significantly higher values in fish from the salt marsh site CER and intermediate values in fish from the estuarine site GIR observed in both years (Fig. 1 a). Moreover, it was in agreement with the observation that eels living in brackish or saltwater environments accumulate more As than their freshwater counterparts (Pannetier et al., 2016). Sorensen and Smith (1981) demonstrated the presence of As in hemosiderin granules in the liver of adult channel catfish (*Ictalurus punctatus*) exposed experimentally to As and suggested that this

deposit constituted a mechanism for storage and detoxification. The presence of hemosiderin pigments is linked to a breakdown of red blood cells which could cause hemosiderosis, especially in the spleen, and increase the size and the number of MMCs in fish from contaminated areas (Khan and Kiceniuk, 1984). Further studies are needed to determine if eels living in saltwater environments are exposed, in addition to As, to other chemical or biological hemolytic agents leading to increased deposition of hemosiderin in their spleen.

Although other biomarkers were not significantly correlated with PC1, PC2 and PC3 axes and their explained variance (%) were low (Table 1), contrary to what was observed for *A. rostrata*, in *A. anguilla* most biomarkers displayed significant spatial and inter-annual variations (Table 2). Variations in lipofuscin pigments showed significant differences among sites in 2011, with higher values in fish from GAR compared to fish from DOR (Fig. 1 b). Lipofuscin deposition in splenic MMC was more associated with age and GAR fish (Table S.6 and Fig. 3 b). Moreover, eels from GAR were older than fish from other French sampling sites (Table S.1). Lipofuscin is known as an “aging pigment” and an increase in lipofuscin pigments in MMCs is generally found in older fish (Wolke, 1992; Agius and Roberts, 2003). Therefore, in *A. anguilla*, lipofuscin pigments globally increased in older and more contaminated fish, mostly found in GAR, in contrast with *A. rostrata* in which lipofuscin deposition was not significantly correlated to either of these variables.

Values of density of MMCs were significantly higher in GAR compared to DOR, with intermediate values for fish from GIR and CER in 2012 (Table 2). In 2011, the surface of MMCs expressed significantly higher values in eels from GIR compared to DOR. The PCA analysis showed that the strongest correlations were between density of MMC and muscle Hg and Cd (Kendall's tau = 0.281 and 0.235 respectively) and between surface of MMC and age, BL and BM (Kendall's tau = 0.384, 0.337 and 0.317, respectively, Table S.6). Several studies have reported on correlations between increased number of MMC in fish exposed to Hg and other metals (Meinelt et al., 1997; Agius and Roberts, 2003; Schwindt et al., 2008). Khan et al. (1994) observed an increase in the size of splenic MMCs with increasing length and weight of winter flounder living in a contaminated area and Couillard and Hodson (1996) also reported an

increase of surface of MMCs in the spleen of old wild Atlantic tomcod collected from estuarine sites receiving pulp and paper mill effluents. Supported by these studies, the increase in the density of MMCs in eels from GAR with Hg and Cd contamination and the increase in the surface of spleen MMCs in eels from GIR was possibly associated with aging. Since the Kendall's tau of these correlations was weak, we do not exclude that other potential contaminants and/or natural factors not measured could influence the response of these biomarkers.

Catalase activity was more strongly correlated with higher organic contaminants such as DDT and metabolites, PBDEs and PCBs and associated to eels from GAR and GIR (Fig. 3 and Table S.6). In addition, fish from GIR, GAR and DOR expressed significantly higher liver CAT activities compared to CER fish in 2011 (Table 2). In 2012, only fish from GIR had significantly higher CAT activities compared to GAR fish (Table 2). Liver CAT activity was significantly higher in 2012 than in 2011 but only in fish from CER, in contrast to liver SOD which remained unchanged for these fish, but which decreased between 2011 and 2012 in GAR and GIR. To support the possible effect of organic contaminants on hepatic CAT enzyme in GAR and GIR, other field studies have reported significant increases in CAT activity in yellow *A. anguilla* exposed to organic contaminants (Regoli et al., 2003; Ahmad et al., 2006; Buet et al., 2006).

No significant relationships between EROD activity and tissue contaminant concentrations were observed indicating that this biomarker response was not associated with exposure to the measured persistent contaminants in the Gironde system (Tables S.6). Although concentrations of organic contaminants in eels from GAR and GIR were higher in 2011, EROD activity was twice higher in 2012 in fish from GIR compared to fish from DOR and CER and was also higher in fish from GAR compared to DOR (Table 2). We hypothesize that other chemical factors not measured, such as PAHs, may have contributed to the higher EROD activity found in eels from GAR and GIR in 2012. Elevated concentrations of PAHs and pyrene were detected in the muscle tissue of European flounder (*Platichthys flesus*) in the Gironde Estuary (Laroche et al., 2013). Further studies are needed to confirm the link between PAH exposure and EROD induction in eels from GAR and GIR.

Finally, the parasite *A. crassus* was detected only in *A. anguilla* (Table 2). The number of *A. crassus* was not correlated with any biological, contaminant or biomarker variables (Table S.6). In 2011, fish from the freshwater sites DOR and GAR presented a significantly higher rate of infection compared to samples from the brackish water site GIR and the salt marsh site CER, consistent with field and experimental studies having demonstrated that infection levels of *A. crassus* decrease with an increase in salinity (Kirk et al., 2000; Morrison et al., 2003; Lefebvre and Crivelli, 2012).

Table 1: Explained variance (%) for each significant principal component (PC) of the three different PCA followed by the significant variables in each PC. Variables significantly correlated with the principal components (PC1, PC2, PC3) in each PC are noted in bold.

<u>Species</u> <u>Years</u>	<u>Anguilla rostrata</u>			<u>Anguilla anguilla</u>		
	<u>2011-2012</u>			<u>2011-2012</u>		
<u>Explained variance (%)</u>	<u>PC1</u>	<u>PC2</u>	<u>PC3</u>	<u>PC1</u>	<u>PC2</u>	<u>PC3</u>
Variables	22.21	8.07	6.63	19.72	11.05	8.01
Body Length (mm)	11.39	2.64	0.09	5.37	9.82	3.36
Body Mass (g)	11.56	3.67	0.15	4.67	11.39	3.81
Lipid content (% dw)	8.36	5.48	0.01	4.44	5.01	2.22
Age (year)	2.29	6.38	12.09	8.61	0.02	7.45
Number <i>A. crassus</i>	0.00	0.00	0.00	0.07	9.26	1.02
EROD (pmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	0.67	0.18	4.88	0.36	0.03	9.66
Catalase (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	0.07	1.66	1.71	3.58	0.01	1.00
Superoxide dismutase (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹ protein)	2.45	0.72	1.23	0.09	0.11	4.19
Density of MMCs (number mm ²)	0.04	0.38	16.08	1.37	1.06	3.28
Surface of MMCs (MMC mm ²)	0.08	1.95	21.72	3.54	2.09	5.45
Hemosiderin pigment (median of grades)	1.68	1.58	13.77	0.00	11.29	5.24
Lipofuscin pigment (median of grades)	0.02	0.01	0.01	1.91	0.00	0.59
Hexachlorobenzene (ng g ⁻¹ dw)	6.64	6.51	2.11	5.72	0.32	6.12
Lindane (ng g ⁻¹ dw)	0.04	0.10	0.14	0.18	7.67	9.81
Sum of DDT and metabolites (ng g ⁻¹ dw)	10.57	1.93	0.00	12.08	1.68	1.12
Sum of PBDEs (ng g ⁻¹ dw)	8.27	0.35	0.35	9.33	3.60	1.07
Sum of PCBs (ng g ⁻¹ dw)	11.30	0.14	0.01	10.77	1.10	3.59
Muscle As (μg g ⁻¹ dw)	4.87	14.33	0.00	0.39	12.52	4.64
Muscle Ag (μg g ⁻¹ dw)	0.32	7.54	0.02	0.03	0.84	2.60
Muscle Cd (μg g ⁻¹ dw)	0.65	0.79	3.71	0.19	2.04	5.95
Muscle Pb (μg g ⁻¹ dw)	0.40	2.27	0.01	0.07	2.32	0.44
Muscle Hg (μg g ⁻¹ dw)	4.76	8.01	4.39	7.57	1.89	2.59
Liver As (μg g ⁻¹ dw)	3.96	13.44	0.71	0.17	12.50	3.98
Liver Ag (μg g ⁻¹ dw)	3.13	7.67	0.00	6.08	0.65	0.13
Liver Cd (μg g ⁻¹ dw)	0.50	8.49	13.33	7.03	2.05	0.36
Liver Pb (μg g ⁻¹ dw)	5.99	3.77	3.50	6.39	0.74	10.34

Table 2: Spatial and temporal variations of hepatic EROD activity, antioxidant enzymes, splenic melanomacrophage centers (MMCs) and number of *A. crassus* (median (Q1; Q3) (n)) of yellow *A. rostrata* in the St. Lawrence system and *A. anguilla* in the Gironde system in 2011 and 2012. Different letters indicate significant differences among sites within species and within sampling years (ANOVA or KW, $p \leq 0.05$). An asterisk * indicates a significant difference between 2011 and 2012 (T-test, $p < 0.05$). DOR= Dordogne; GAR= Garonne; GIR= Gironde; CER= Certes; SFL = Saint-François Lake; SPL = Saint-Pierre Lake; SOR = Sud-Ouest River; SJR = Saint-Jean River; NA= Absent.

Species	Year	<i>Anguilla rostrata</i>				<i>Anguilla anguilla</i>			
		SFL	SPL	SOR	SJR	DOR	GAR	GIR	CER
Liver EROD (pmol/min/mg protein)	2011	7.1 (5.7; 8.8) (15)	8.9 (5.2; 31.6) (7)	10.5 (7.9; 15.7) (15)	8.7 (7.6; 10.3) (12)	11.9 (6.3; 13.9) (13)	7.2 (6.1; 14.2) (14)	10.4 (6.9; 12.4) (15)	8.8 (5.1; 11.2) (11)
	2012	5.1 (3.7; 11.7) (12)	7.1 (6.1; 9.9) (14)	11.6 (8.9; 15.9) (15)	11.4 (8.5; 22.5) (15)	9.9 (6.2; 11.0) C (15)	18.6 (13.9; 25.7) AB (15)	19.7 (16.9; 40.2) A (14)	13.3 (8.9; 16.3) BC (14)
Liver Catalase (µmol/min/mg protein)	2011	2368 (1827; 2896) BC (14)	4078 (2657; 5638) AB (7)	3991 (3102; 4312) A* (12)	2246 (1971; 2647) C (15)	2319 (1902; 2581) A (8)	2263 (1455; 2904) A (14)	3515 (2495; 4931) A (14)	893 (631; 984) B (10)
	2012	2168 (1323; 3319) (12)	2260 (1534; 3598) (14)	1953 (1663; 2641) (13)	2350 (1523; 2887) (15)	1961 (1567; 2408) AB (12)	1834 (1606; 2039) B (13)	2768 (2296; 3589) A (14)	1919 (1544; 3148) AB* (12)
Liver superoxide dismutase (µmol/min/mg protein)	2011	5322 (2635; 7629) A (12)	962 (619; 2044) B (5)	5404 (4627; 7261) A (12)	5058 (3793; 5850) A (14)	3910 (3061; 4694) (8)	4281 (2933; 4901) * (14)	3651 (3161; 5261) * (14)	3857 (2762; 4482) (10)
	2012	3320 (2092; 5498) B (12)	3851 (3346; 5305) AB* (14)	6275 (4605; 7646) A (14)	4345 (3008; 6620) AB (15)	3203 (2592; 4175) * (12)	2766 (1775; 3623) (12)	2398 (1827; 3155) (14)	3037 (1957; 3838) (12)
Density of MMCs (number/mm ²)	2011	2.1 (1.4; 2.8) (15)	2.8 (1.7; 4.5) (7)	2.4 (1.7; 3.1) (15)	2.4 (1.7; 3.1) (15)	4.2 (2.8; 5.1) (13)	2.8 (2.1; 3.9) (14)	3.8 (2.4; 4.5) (15)	2.8 (2.4; 4.5) (11)
	2012	2.8 (2.4; 3) (12)	2.6 (1.7; 3.2) (14)	3.5 (2.4; 3.8) (15)	2.8 (2.1; 3.5) (15)	2.8 (2.1; 4.2) AB (15)	4.5 (2.4; 6.3) A (15)	2.8 (2.3; 5.8) AB (14)	1.9 (1.7; 2.3) B (12)
Surface of MMCs (MMC/mm ²)	2011	0.003 (0.002; 0.005) (15)	0.005 (0.003; 0.006) (7)	0.005 (0.003; 0.007) (15)	0.002 (0.002; 0.004) (15)	0.003 (0.002; 0.005) B (13)	0.004 (0.003; 0.007) AB (14)	0.007 (0.006; 0.01) A* (15)	0.003 (0.002; 0.007) AB (11)
	2012	0.004 (0.004; 0.006) (12)	0.003 (0.002; 0.004) (14)	0.005 (0.003; 0.007) (15)	0.003 (0.001; 0.006) (15)	0.005 (0.004; 0.008) * (15)	0.006 (0.004; 0.008) (15)	0.005 (0.003; 0.005) (14)	0.005 (0.003; 0.008) (12)
Number of <i>A. crassus</i>	2011	NA	NA	NA	NA	1 (0.5; 3) A* (13)	2.5 (0; 4.3) A (14)	0 B (15)	0 B (11)
	2012	NA	NA	NA	NA	0 (0; 0) (15)	0 (0; 5) (15)	0 (0; 1) (14)	0 (0; 0.3) (14)

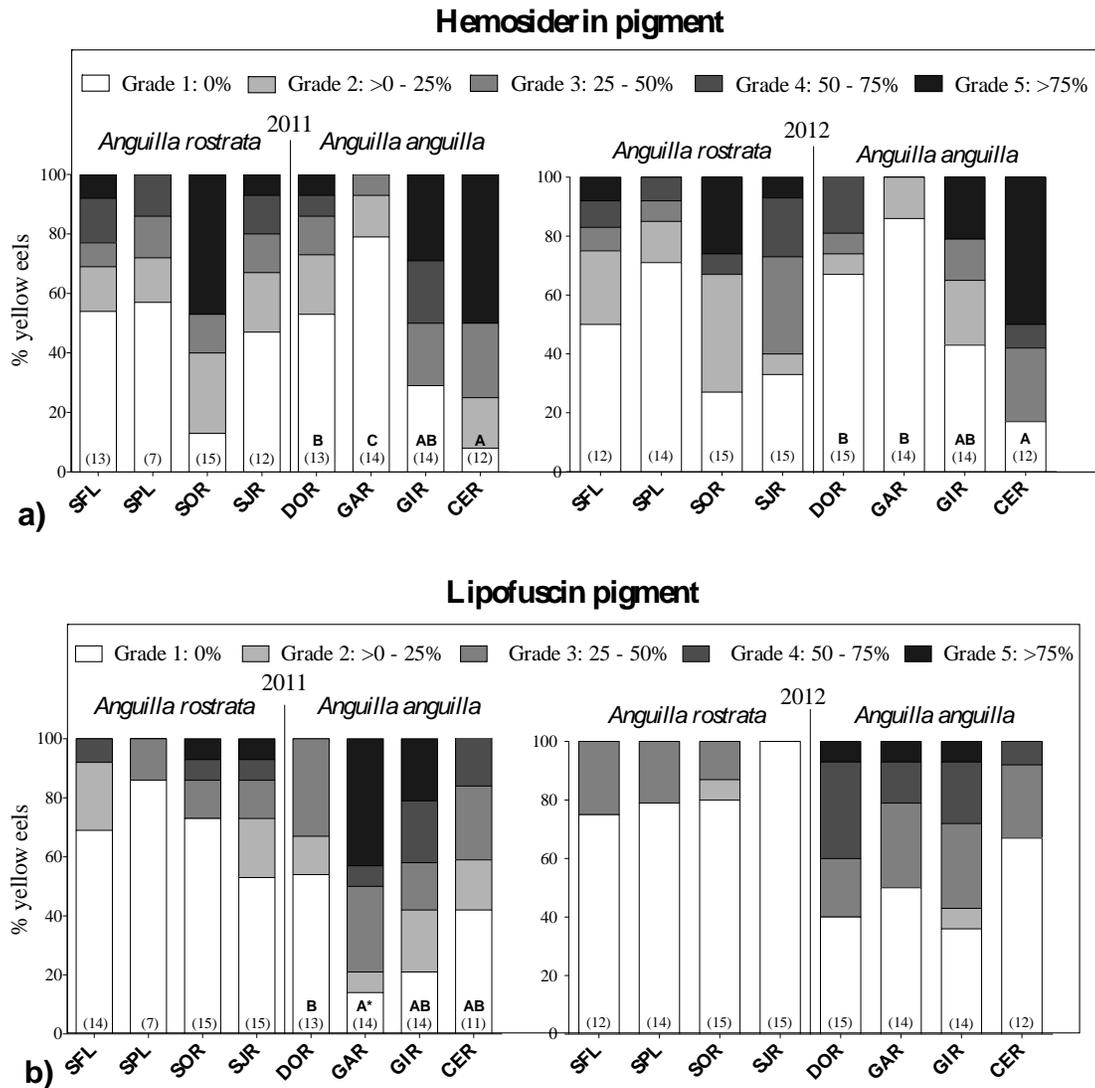
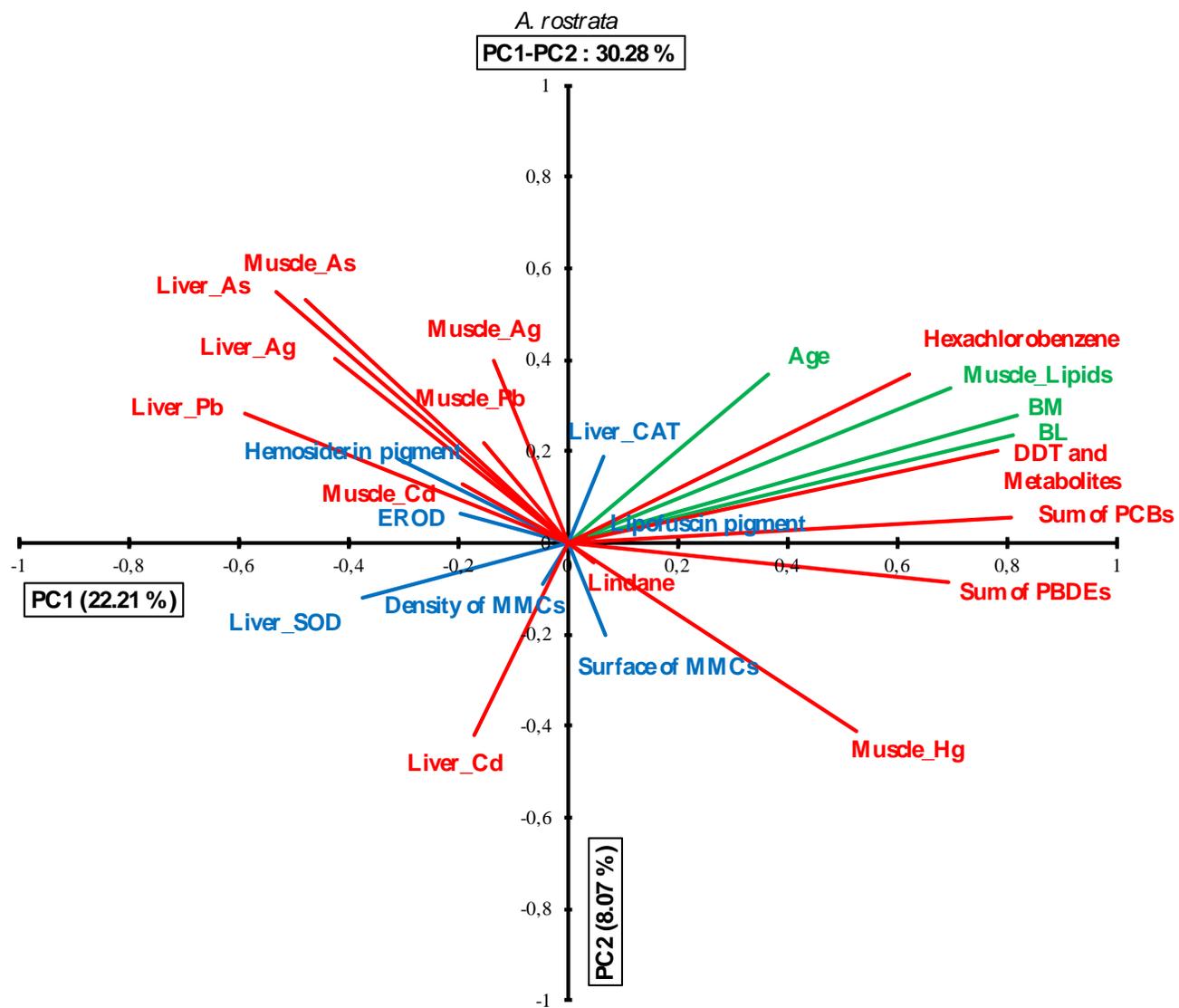
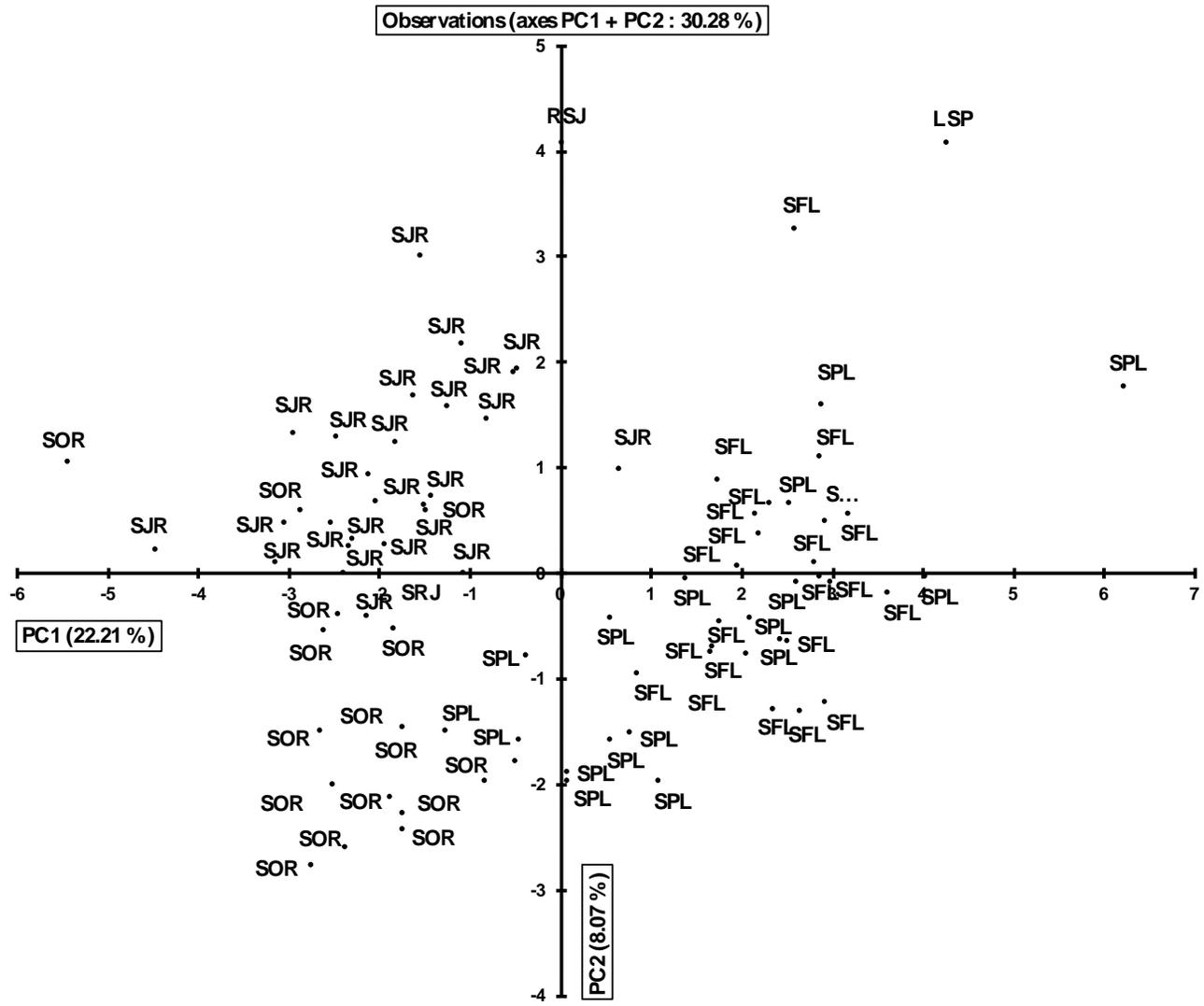


Figure 1. Spatio-temporal variations of the relative proportions of *A. rostrata* in the St. Lawrence System and *A. anguilla* in the Gironde System with different grades of **a)** hemosiderin and **b)** lipofuscin pigment depositions in spleen MelanoMacrophage Centers (MMCs) in 2011 and 2012. Sample size (n) is indicated in parentheses. Different letters indicate significant differences among sites within species and within a sampling year (Kruskal-Wallis test, $p < 0.05$).

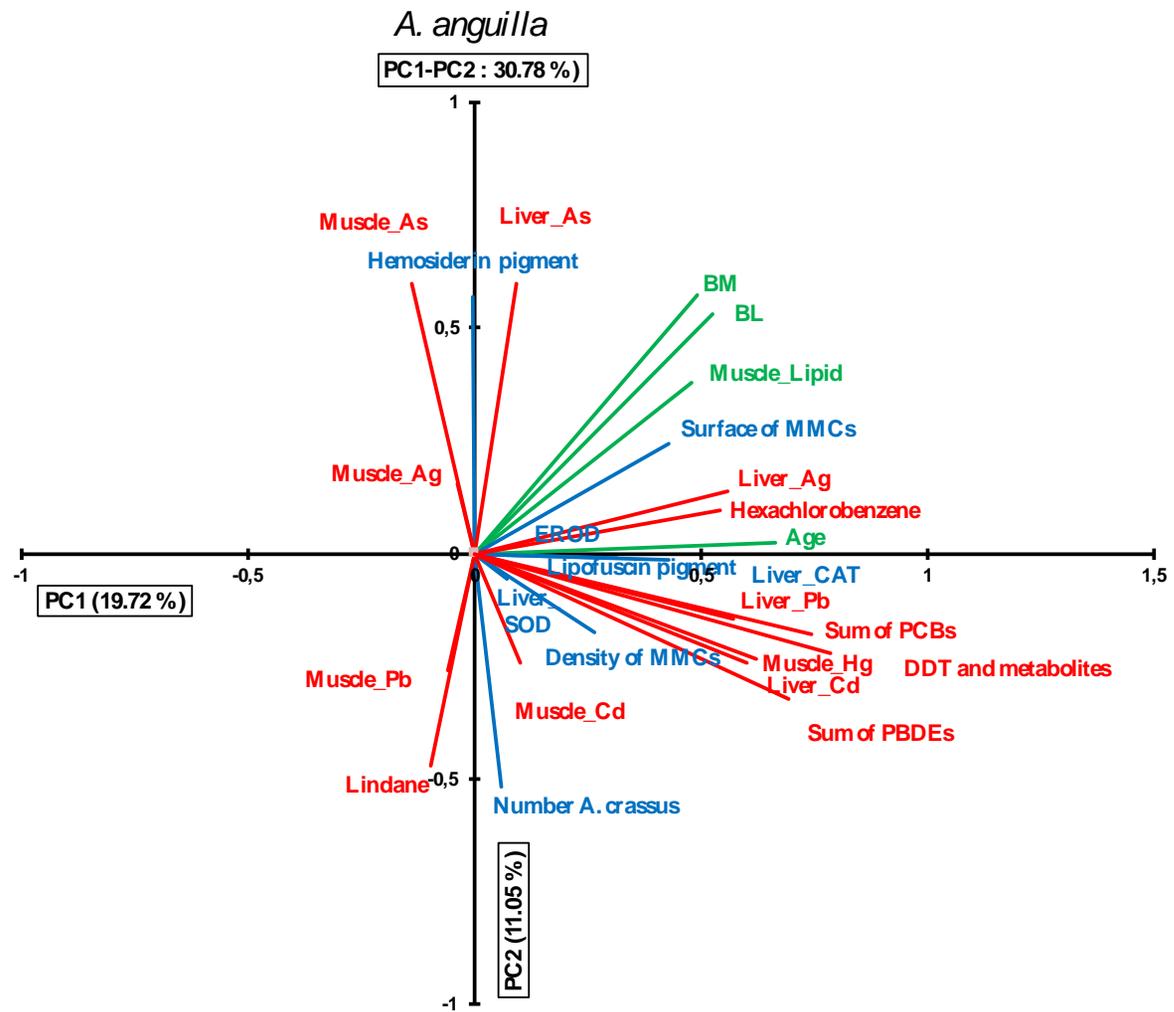


A)

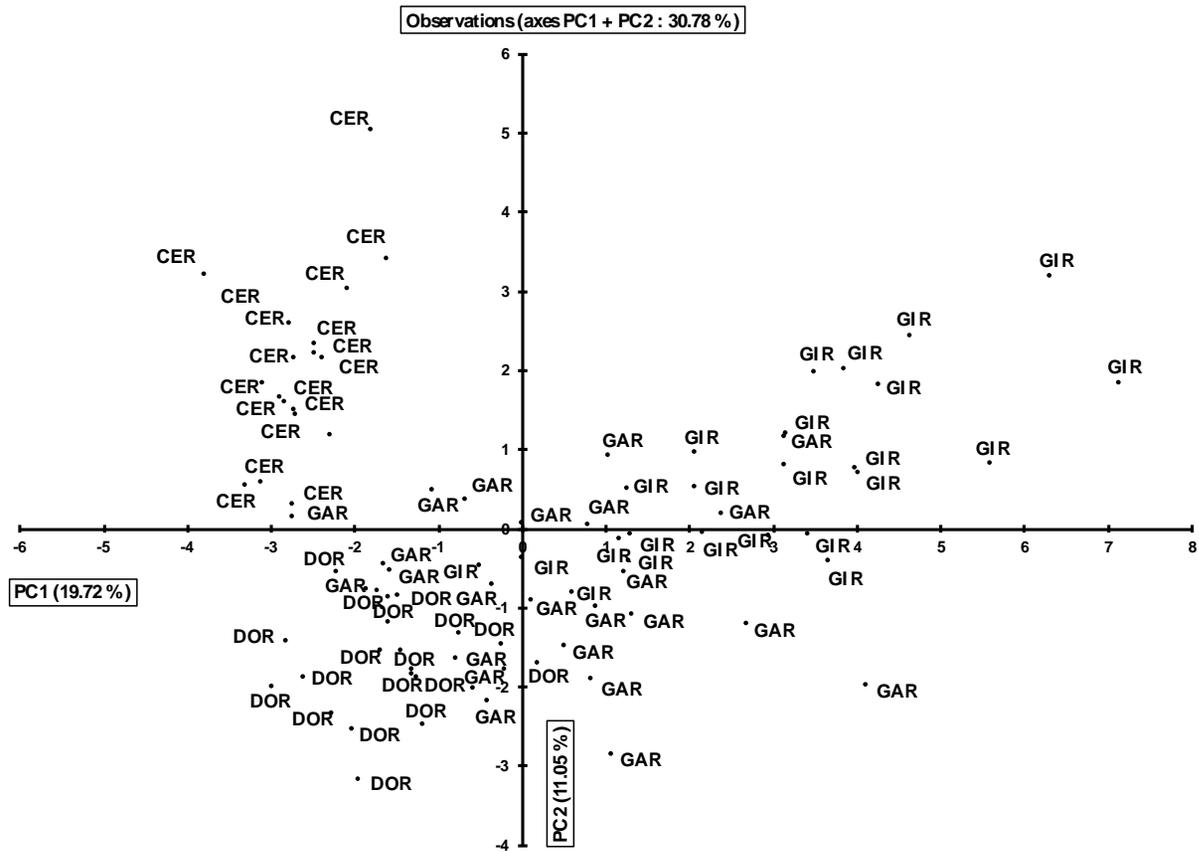


B)

Figure 2. Principal component analysis (PCA) (n=82) illustrating: A) Relationships between patterns of contamination (red), biomarker response (blue) and biological characteristics (green) in *A. rostrata* in 2011 and 2012. Scores for the principal components 1 and 2 were 22.21% and 8.07%, respectively. B) Screening of eels from two fluvial contaminated sites, Lake St. Pierre (LSP) and Lake St. François, (LSF) and two references sites, St Jean River (SJR) and Sud-Ouest River (SOR). Sites of capture are identified for each individual. BM: Body Mass, BL: Body Length, MMCs: Melano-Macrophage centers, SOD: superoxide dismutase and CAT: catalase.



A)



B)

Figure 3. Principal component analysis (PCA) (n=87) illustrating: A) Relationships existing between the pattern of contamination (red), biomarker responses (green) and biological characteristics (blue) in *A. anguilla* in 2011 and 2012. Scores for the principal components 1 and 2 were 19.72% and 11.05%, respectively. B) Screening of eels from contaminated sites, Gironde estuary (GIR) and Garonne River (GAR) and two references sites, Dordogne River (DOR) and the salt marsh Certes (CER). Sites of capture are identified for each individual. BM: Body Mass, BL: Body Length, MMCs: Melano-Macrophage centers, SOD: superoxide dismutase and CAT: catalase

4. Conclusions

Our study revealed similarities in the biomarkers examined between *A. anguilla* and *A. rostrata*, supporting their use in comparative ecotoxicological studies. The basal levels of EROD activity and of biomarkers of histopathology were similar in eels of both species from reference sites. A high deposition of hemosiderin was observed in eels from the most brackish sites in both species. However, the cause of this deposition is uncertain. In *A. anguilla*, it was strongly associated to As accumulation whereas in *A. rostrata*, it was weakly associated to Pb. Further studies are needed on the relationship between environmental variations, migration and feeding patterns and accumulation of potentially hemolytic agents in Atlantic eels growing in saline water, and on the potential impact of this accumulation on blood cells integrity and on the immune function.

In comparison to its American cousin from the St. Lawrence system, *A. anguilla* from Southwest France may be more affected by contaminants. Higher CAT activity, density of MMC and hemosiderin pigment were observed in eels from the contaminated sites GAR and GIR and were related to organic and metal contaminants such as DDTs, PCBs, PBDEs and muscle Hg and Cd. This, in association with the higher concentrations of PCBs, DDTs and metals observed in the tissues of *A. anguilla* from GAR and GIR compared to *A. rostrata*, suggests a more important risk of impacts of these contaminants in these eels compared to American eels from the more contaminated sites SPL and SFL. For *A. rostrata*, in both study years, neither the PCA nor ANOVA identified major influences of persistent organic or inorganic contaminants on EROD, catalase or histopathological biomarkers.

Field studies have already reported that the sensitivity of biomarkers could vary from one habitat to another in response to the complex mixtures of contaminants and other environmental conditions (Wolke, 1992; Van der Oost et al., 2003). Contaminants such as PAHs, dioxins and furans, not measured in our study, are known to induce biotransformation and antioxidant enzymes in the short-term and histopathological biomarkers over longer periods of exposure (Van der Oost et al., 2003). The yellow stage of both species are not strictly catadromous and perform short migrations in order to forage food in more productive environments (Daverat and Tomás, 2006; Thibault et

al., 2007). Even if these migrations are short (≈ 10 km) compared to the reproductive migration of silver eels, they are of considerable importance because they occur during the prolonged growth stage and involve switching between environments varying widely in contaminants and other abiotic factors such as temperature and salinity (Thibault et al., 2007). Finally, the small number of eels that could be collected in this study and the wide range of estimated age (2 to 18 years old) may constitute biases and impose a requirement to be prudent regarding the overall conclusions. The peculiar biology of these species, which grow at widely different rates depending on their habitat (Patey et al, submitted), makes it impossible to eliminate biases such as size and age among study sites. For that purpose, complementary studies with larger sample size and a greater number of sites are recommended. Nevertheless, this study provides a database to better target and prioritize future studies on the impacts of contaminants on eel health in the Gironde and St. Lawrence River basins. Combined with others (Pierron et al., 2014; Baillon et al., 2015a; Baillon et al., 2015b; Baillon et al., 2016; Caron et al., 2016) it supports that contamination represents a risk to the health of European eels from the Gironde system that could be contributing to the lack of recovery of these fish.

5. Acknowledgments

We wish to acknowledge all the staff of the INRS-ETE, UMR EPOC (university of Bordeaux) and IRSTEA (Bordeaux-Cestas) who participated in the field sampling. We are also grateful to A. Caron, P. Pannetier and H. Budzinski for contaminant concentration measurements and to B. Légaré for his expert technical work on EROD assay. We would like to thank G. Verreault and the technical staff from the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs for otolith expertise and for providing us with age data. This work was supported by the joint ANR Blanc (ANR-10-INTB-1704)-NSERC SGP grant IMMORTEEL and by the Aquitaine region (GAGILAU and MICANG projects). The laboratory work of Géraldine Patey was in part supported by Fisheries and Oceans Canada.

6. References

- Acou, A., Boury, P., Laffaille, P., Crivelli, A. J., Feunteun, E., 2005. Towards a standardized characterization of the potentially migrating silver European eel (*Anguilla anguilla*, L.). *Archiv für Hydrobiologie* 164: 237-255
- Agius, C., Roberts, R., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *J. of Fish Dis.* 26, 499-509.
- Ahmad, I., Pacheco, M., Santos, M.A., 2006. *Anguilla anguilla* L. oxidative stress biomarkers: an in situ study of freshwater wetland ecosystem (Pateira de Fermentelos, Portugal). *Chemosphere* 65, 952-962.
- Au, D., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 817-834.
- Baillon, L., Oses, J., Pierron, F., du Colombier, S.B., Caron, A., Normandeau, E., Lambert, P., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., 2015a. Gonadal transcriptome analysis of wild contaminated female European eels during artificial gonad maturation. *Chemosphere* 139, 303-309.
- Baillon, L., Pierron, F., Coudret, R., Normendeau, E., Caron, A., Peluhet, L., Labadie, P., Budzinski, H., Durrieu, G., Sarraco, J., 2015b. Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology* 24, 71-84.
- Baillon, L., Pierron, F., Oses, J., Pannetier, P., Normandeau, E., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., Lambert, P., Bernatchez, L., 2016. Detecting the exposure to Cd and PCBs by means of a non-invasive transcriptomic approach in laboratory and wild contaminated European eels (*Anguilla anguilla*). *Environ. Sci. Pollut. R.* 23, 5431-5441.
- Belpaire, C., Goemans, G., 2007. Eels: contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES J. of Mar. Sci.* 67, 1423-1436.
- Belpaire, C.G.J., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., Hagel, P., De Boer, J., 2009. Decreasing eel stocks: survival of the fittest? *Ecol. Freshw. Fish* 18, 197-214.
- Belpaire, C., Pujolar, J.M., Geeraerts, C., Maes, G.E., 2016. Contaminants in eels and their role in the collapse of the eel stocks. *Biol. Ecol. Anguillid Eels.* 225
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Buet, A., Banas, D., Voltaire, Y., Coulet, E., Roche, H., 2006. Biomarker responses in European eel (*Anguilla anguilla*) exposed to persistent organic pollutants. A field study in the Vaccarès lagoon (Camargue, France). *Chemosphere* 65, 1846-1858.

- Byer, J.D., Lebeuf, M., Alae, M., Brown, R.S., Trottier, S., Backus, S., Keir, M., Casselman, J., Hodson, P.V., 2013. Spatial trends of organochlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in Atlantic *Anguillid* eels. *Chemosphere* 90, 1719–1728.
- Caron, A., Pannetier, P., Rosabal-Rodriguez, M., Budzinski, H., Lauzent, M., Labadie, P., Nasri, B., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. Organic and inorganic contamination impacts on metabolic capacities in American and European yellow eels. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 73 (10), 1557-1566.
- Castonguay, M., Hodson, P., Couillard, C.M., Eckersley, M., Dutil, J.-D., Verreault, G., 1994. Why is recruitment of the American eel, *Anguilla rostrata*, declining in the St. Lawrence River and Gulf? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 479-488.
- Chainy, G.B.N., Paital, B., Dandapat, J., 2016. An overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defence parameters in some invertebrate and vertebrate species. *Scientifica* 2016.
- Cosewic, 2012. COSEWIC assessment and status report on the American eel *Anguilla rostrata* in Canada. Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada. Ottawa. xii + 109pp.
- Cottrill, R. A., McKinley, R. S., Van Der Kraak, G., 2002. An examination of utilizing external measures to identify sexually maturing female American eels, *Anguilla rostrata*, in the St. Lawrence River. *Environ. Biol. Fish.* 65, 271-287.
- Couillard, C.M., Wirgin, I., Lebeuf, M., Legare, B., 2004. Reduction of cytochrome P4501A with age in Atlantic tomcod from the St. Lawrence Estuary, Canada: relationship with emaciation and possible effect of contamination. *Aquat. Toxicol.* 68, 233-247.
- Couillard, C.M., Hodson, P., Castonguay, M., 1997. Correlations between pathological changes and chemical contamination in American eels, *Anguilla rostrata*, from the St. Lawrence River. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 54, 1916-1927.
- Couillard, C.M., Hodson, P.V., 1996. Pigmented macrophage aggregates: A toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? *Environ. Toxicol. and Chem.* 15, 1844-1854.
- Daverat, F., Beaulaton, L., Poole, R., Lambert, P., Wickström, H., Andersson, J., Aprahamian, M., Hizem, B., Elie, P., Yalçın-Özdilek, S., 2012. One century of eel growth: changes and implications. *Ecol. Freshw. Fish* 21, 325-336.
- Daverat, F., Tomás, J., 2006. Tactics and demographic attributes in the European eel *Anguilla anguilla* in the Gironde watershed, SW France. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 307, p. 247-p. 257.
- Durif, C., Dufour, S., Elie, P., 2005. The silvering process of *Anguilla anguilla*: a new classification from the yellow resident to the silver migrating stage. *J. Fish Biol.* 66, 1025–1043.

- Edeline, E., Beaulaton, L., Le Barh, R., Elie, P., 2007. Dispersal in metamorphosing juvenile eel *Anguilla anguilla*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 344, 213-218.
- FAO/ICES, 2009. FAO European Inland Fisheries Advisory Commission; International Council for the Exploration of the Sea. Report of the 2008 session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels. EIFAC Occasional paper(No. 43): 192pp.
- Fournie, J.W., Summers, J.K., Courtney, L.A., Engle, V.D., Blazer, V.S., 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. J. Aquat. Anim. Health 13, 105-116.
- Fragoso, N.M., Parrott, J.L., Hahn, M.E., Hodson, P.V., 1998. Chronic retene exposure causes sustained induction of CYP1A activity and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. and Chem. 17, 2347-2353.
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. Ecotoxicology 19, 239-266.
- Girard, P., Elie, P., 2007. Manuel d'identification des principales lésions anatomomorphologiques et des principaux parasites externes des anguilles. CEMAGREF/Association Santé Poissons Sauvages. p. 81
- Gravato, C., Guimarães, L., Santos, J., Faria, M., Alves, A., Guilhermino, L., 2010. Comparative study about the effects of pollution on glass and yellow eels (*Anguilla anguilla*) from the estuaries of Minho, Lima and Douro Rivers (NW Portugal). Ecotoxicol. Environ. Saf. 73, 524–533
- Gravato, C., Teles, M., Oliveira, M., Santos, M.A., 2006. Oxidative stress, liver biotransformation and genotoxic effects induced by copper in *Anguilla anguilla* L. -the influence of pre-exposure to b-naphthoflavone. Chemosphere 65, 1821-1830
- Guhl, B., Stürenberg, F.J., Santora, G., 2014. Contaminant levels in the European eel (*Anguilla anguilla*) in North Rhine-Westphalian rivers. Environ. Sci. Eur. 26, 26.
- ICES. 2016. Report of the Workshop of the Working Group on Eel and the Working Group on Biological Effects of Contaminants (WKBECEEL), 25–27 January 2016, Os, Norway. ICES CM 2015/SSGEPD:20. 98 pp.
- Jessop, B.M., 2010. Geographic effects on American eel (*Anguilla rostrata*) life history characteristics and strategies. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 67, 326-346.
- Kessaci, K., Coynel, A., Blanc, G., Deycard, V.N., Derriennic, H., Schäfer, J., 2014. Impacts of anthropogenic pressures on the water quality of the Gironde Estuary (SW France) from the Urban Agglomeration of Bordeaux: spatial characterization and inputs of trace metal

- elements (Ag, As, Cd, Cu, Pb and Zn). EGU General Assembly Conference Abstracts, p. 10196.
- Khan, R., Barker, D., Hooper, R., Lee, E., Ryan, K., Nag, K., 1994. Histopathology in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) living adjacent to a pulp and paper mill. Arch. Environ. Contam. and Toxicol. 26, 95-102.
- Khan, R., Kiceniuk, J., 1984. Histopathological effects of crude oil on Atlantic cod following chronic exposure. Can. J. Zool. 62, 2038-2043.
- Kirk, R., Kennedy, C., Lewis, J., 2000. Effect of salinity on hatching, survival and infectivity of *Anguillicola crassus* (Nematoda: Dracunculoidea) larvae. Dis. Aquat. Organ. 40, 211-218.
- Laporte, M., Pavey, S.A., Rougeux, C., Pierron, F., Lauzent, M., Budzinski, H., Labadie, P., Geneste, E., Couture, P., Baudrimont, M., 2016. RAD sequencing reveals within-generation polygenic selection in response to anthropogenic organic and metal contamination in North Atlantic Eels. Mol. Ecol. 25, 219-237.
- Laroche, J., Gauthier, O., Quiniou, L., Devaux, A., Bony, S., Evrard, E., et al. 2013. Variation patterns in individual fish responses to chemical stress among estuaries, seasons and genders: the case of the European flounder (*Platichthys flesus*) in the Bay of Biscay. Environmental Science and Pollution Research 20, 738–748.
- Larsson, P., Hamrin, S., Okla, L., (1990) Fat content as a factor inducing migratory behaviour in the eel (*Anguilla anguilla* L.) to the Sargasso Sea. Naturwissenschaften, 77, 488-490.
- Lefebvre, F., Crivelli, A.J., 2012. Salinity effects on anguillicolosis in Atlantic eels: a natural tool for disease control. Mar. Ecol. Prog. Ser. 471, 193-202.
- Lefebvre, F., Mounaix, B., Poizat, G., Crivelli, A.J., 2004. Impact of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* on *Anguilla anguilla*: variation in liver and spleen masses. J. Fish Biol. 435-447.
- Livingstone, D., 2001. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. Mar. pollut. bull. 42, 656-666.
- Luna, L.G., 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. Graw-Hill Book Company, New York. 3rd edition. 258 pp.
- Maes, J., Belpaire, C., Goemans, G., 2008. Spatial variations and temporal trends between 1994 and 2005 in polychlorinated biphenyls, Organochlorine pesticides and heavy metals in European eel (*Anguilla anguilla* L.) in Flanders, Belgium. Environ. Pollut. 153, 223–237
- Martinez-Alvarez, R.M., Morales, A.E., Sanz, A., 2005. Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. Fish Biol. Fisher. 15, 75-88.

- Meinelt, T., Krüger, R., Pietrock, M., Osten, R., Steinberg, C., 1997. Mercury pollution and macrophage centres in pike (*Esox lucius*) tissues. *Environ. Sci. and Pollut. Res.* 4, 32-36.
- Moravec, F., Taraschewski, H., 1988. Revision of the genus *Anguillicola Yamaguti*, 1935 (Nematoda: Anguillicolidae) of the swimbladder of eels, including descriptions of two new species, *A. novaezelandiae* sp. n. and *A. papernai* sp. n. *Folia Parasitol.* 35, 125-146.
- Morrison, W.E., Secor, D.H., Piccoli, P.M., 2003. Estuarine habitat use by Hudson River American eels as determined by otolith strontium: calcium ratios. *American Fisheries Society Symposium*, pp. 87-99.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L) *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53, 331-347.
- Palstra, A.P., van Ginneken, V.J., Murk, A.J., van den Thillart, G.E., 2006. Are dioxin-like contaminants responsible for the eel (*Anguilla anguilla*) drama? *Naturwissenschaften* 93, 145-148.
- Pankhurst N. W., 1982. Relation of visual change to the onset of sexual maturation in the European eel *Anguilla anguilla* (L.). *J. Fish Biol.*, 21, 279-296.
- Pannetier, P., Caron, A., Campbell, P.G., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. A comparison of metal concentrations in the tissues of yellow American eel (*Anguilla rostrata*) and European eel (*Anguilla anguilla*). *Scien. Total Environ.* 569, 1435-1445.
- Patey, G., Couillard, C.M., Drouineau, H., Verreault, G., Pierron, F., Lambert, P., Baudrimont, M., Couture, P., In press Early back-calculated size-at-age of Atlantic yellow eels sampled along ecological gradients in the Gironde and St. Lawrence hydrographical systems. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* DOI: 10.1139/cjfas-2017-0025
- Pegg, J., Andreou, D., Williams, C., Britton, J., 2015. Temporal changes in growth, condition and trophic niche in juvenile *Cyprinus carpio* infected with a non-native parasite. *Parasitology* 142, 1579-1587.
- Pierron, F., Baillon, L., Sow, M., Gotreau, S., Gonzalez, P., 2014. Effect of low-dose cadmium exposure on DNA methylation in the endangered European eel. *Environ. Sci. Technol.* 48, 797-803.
- Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.-P., Brèthes, D., Elie, P., Massabuau, J.-C., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquat. Toxicol.* 81, 304-311.
- Regoli, F., Winston, G.W., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., 2003. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing

- capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. Environ. Toxicol. and Chem. 22, 2120-2129.
- Rigaud, C., Couillard, C.M., Pellerin, J., Légaré, B., Byer, J.D., Alaeé, M., Lebeuf, M., Casselman, J.M., Hodson, 2016. Temporal variations in embryotoxicity of Lake Ontario American eel (*Anguilla rostrata*) extracts to developing *Fundulus heteroclitus*. Sci. Tot. Environ. 541, 765-775.
- Robinet, T.T., Feunteun, E.E., 2002. Sublethal effects of exposure to chemical compounds: a cause for the decline in Atlantic eels? Ecotoxicology 11, 265-277.
- Schwindt, A.R., Fournie, J.W., Landers, D.H., Schreck, C.B., Kent, M.L., 2008. Mercury concentrations in salmonids from western US national parks and relationships with age and macrophage aggregates. Environ. Sci. Technol. 42, 1365-1370.
- Sorensen, E.M., Smith, N.K., 1981. Hemosiderin granules: cytotoxic response to arsenic exposure in channel catfish. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 27, 645-653.
- Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., Budzinski, H., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. Chemosphere 83, 175-185.
- Thibault, I., Dodson, J.J., Caron, F., Tzeng, W., Iizuka, Y., Shiao, J., 2007. Facultative catadromy in American eels: testing the conditional strategy hypothesis. Mar. Ecol. Prog. Ser. 344, 219-229.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 13, 57-149.
- Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P., 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. Aquat. Toxicol. 36, 189-222.
- Verreault, G., Dargere, W., Tardif, R., 2009. American eel movements, growth, and sex ratio following translocation. Eels at the edges: Science, status and conservation concerns. American Fisheries Society, Symposium, pp. 129-136.
- Vinodhini, R., Narayanan, M., 2008. Bioaccumulation of heavy metals in organs of fresh water fish *Cyprinus carpio* (Common carp). Int. J. Environ. Res. 5, 179-182.
- Vøllestad, L.A., 1992. Geographic variation in age and length at metamorphosis of maturing European eel: environmental effects and phenotypic plasticity. J. Anim. Ecol., 41-48.
- Whyte, J.J., Jung, R., Schmitt, C., Tillitt, D., 2008. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Crit. Rev. Toxicol. 30, 357-570.
- Wolke, R., 1992. Piscine macrophage aggregates: a review. Annu. Rev. Fish Dis. 2, 91-108

Supplementary material

Table S.1: Spatial and temporal variation of biological characteristics (mean \pm SD (n)) of yellow *A. rostrata* in the St. Lawrence system and *A. anguilla* in the Gironde system in 2011 and 2012. n is the sample size. Different letters indicate significant differences among sites within species and within sampling years (ANOVA or KW. $p \leq 0.05$). Asterisks (*) indicate significant differences between 2011 and 2012 (Student's t-test. $p \leq 0.05$). SFL = Saint-François Lake; SPL = Saint-Pierre Lake; SOR = Sud-Ouest River; SJR = Saint-Jean River; DOR= Dordogne; GAR= Garonne; GIR= Gironde; CER= Certes.

Species	Biological characteristics	Years	<i>Anguilla rostrata</i>				<i>Anguilla anguilla</i>			
			SFL	SPL	SOR	SJR	DOR	GAR	GIR	CER
	Body Length (mm)	2011	827.9 \pm 54.7 ^A (15)	899.7 \pm 27.0 ^{A*} (7)	347.5 \pm 71.6 ^C (15)	529.3 \pm 86.9 ^B (15)	338 \pm 49.5 ^C (15)	446.8 \pm 69.3 ^B (14)	578.7 \pm 58.2 ^{A*} (15)	448.3 \pm 76.6 ^B (12)
		2012	791.9 \pm 71.2 ^A (12)	675.5 \pm 90.1 ^{AB} (14)	386.1 \pm 67.8 ^C (15)	501.4 \pm 109.3 ^{BC} (15)	397.1 \pm 57 ^B (15)	521.7 \pm 132.6 ^A (15)	447.3 \pm 49.4 ^{AB} (14)	464.8 \pm 63.2 ^A (14)
	Body Mass (g)	2011	1222 \pm 124.6 ^A (15)	1522 \pm 152.7 ^{A*} (7)	77.9 \pm 72.3 ^B (15)	290.1 \pm 145.5 ^B (15)	63 \pm 41.3 ^C (15)	160.9 \pm 87.7 ^B (15)	349.5 \pm 124 ^{A*} (15)	172.4 \pm 131.8 ^B (12)
		2012	968.8 \pm 224.1 ^A (12)	598.7 \pm 233 ^{AB} (14)	92.9 \pm 71.2 ^C (15)	278.1 \pm 197.4 ^{BC} (15)	91.3 \pm 41.8 ^B (15)	280.5 \pm 201.2 ^A (15)	149.9 \pm 43.5 ^A (14)	189.9 \pm 90.7 ^A (14)
	Fulton condition (g per cm ³)	2011	0.22 \pm 0.03 ^A (15)	0.21 \pm 0.03 ^{AB} (7)	0.15 \pm 0.03 ^C (15)	0.18 \pm 0.03 ^{BC} (15)	0.15 \pm 0.02 ^B (13)	0.17 \pm 0.02 ^{AB} (14)	0.17 \pm 0.02 ^A (15)	0.17 \pm 0.02 ^{AB} (10)
		2012	0.19 \pm 0.02 ^A (12)	0.18 \pm 0.02 ^A (14)	0.14 \pm 0.02 ^B (15)	0.18 \pm 0.04 ^A (15)	0.14 \pm 0.02 ^B (15)	0.18 \pm 0.04 ^A (15)	0.17 \pm 0.02 ^A (14)	0.18 \pm 0.02 ^A (14)
	Age (years)	2011	12.4 \pm 1.7 ^A (14)	13.6 \pm 3.1 ^{A*} (7)	8.4 \pm 2 ^B (15)	10 \pm 2.3 ^B (15)	4.3 \pm 0.8 ^B (15)	6.3 \pm 2 ^A (14)	9.3 \pm 2.6 ^A (15)	4.4 \pm 1.5 ^B (12)
		2012	11.6 \pm 3.5 (12)	8.6 \pm 2.9 (14)	8.9 \pm 2.5 (15)	9.9 \pm 3.0 (15)	6.5 \pm 3.6 ^{B*} (14)	11 \pm 3.5 ^{A*} (14)	7.2 \pm 3.1 ^{AB} (14)	4.2 \pm 0.9 ^B (14)
	Dry-basis lipid content (%)	2011	25.3 \pm 9.6 ^A (15)	30.8 \pm 4.3 ^A (7)	5.7 \pm 2.6 ^B (6)	13.6 \pm 8.2 ^B (15)	15.1 \pm 11.6 ^C (13)	39.9 \pm 14.2 ^{AB} (13)	52.9 \pm 14.7 ^A (14)	28.8 \pm 9.3 ^{BC} (11)
		2012	34.6 \pm 9.2 ^A (12)	22.5 \pm 12.9 ^{AB} (14)	6.6 \pm 3.5 ^C (13)	18.9 \pm 9.2 ^B (14)	30.4 \pm 16.8 (15)	27 \pm 14.5 (15)	41.7 \pm 20.4 (14)	39.9 \pm 9.5 [*] (14)
	Wet basis moisture content (%)	2011	70.2 \pm 2.8 ^B (15)	69.3 \pm 1.2 ^B (7)	77.6 \pm 0.5 ^A (6)	75.3 \pm 1.9 ^A (15)	73.8 \pm 3.2 ^A (13)	64.9 \pm 6.6 ^{BC} (13)	57.8 \pm 7.5 ^C (14)	69.4 \pm 3.4 ^{AB} (11)
		2012	66.6 \pm 3.8 ^C (12)	71.2 \pm 4.5 ^{BC} (14)	77.0 \pm 1.4 ^A (13)	74.3 \pm 2.7 ^{AB} (14)	69.7 \pm 6.2 (15)	69.2 \pm 5.8 (15)	64.2 \pm 9.1 (14)	65.9 \pm 4.8 (14)

Table S.2: Spatial and temporal variation of organic contaminants (mean \pm SD (n)) of yellow *A. rostrata* in the St. Lawrence system and *A. anguilla* in the Gironde system in 2011 and 2012. n is the sample size and data are expressed as ng g⁻¹ dry weight. Different letters indicate statistically significant differences among sites within species and within sampling years (ANOVA or KW. $p \leq 0.05$). Asterisks (*) indicate significant differences between 2011 and 2012 (Student's t-test. $p \leq 0.05$).

Species	Contaminants	Years	<i>Anguilla rostrata</i>				<i>Anguilla anguilla</i>			
			SFL	SPL	SOR	SJR	DOR	GAR	GIR	CER
Hexachlorobenzene (ng.g ⁻¹ dw)	2011	2.5 \pm 0.9 [*] (15)	3.2 \pm 1.2 [*] (7)	1.5 \pm 0.4 [*] (6)	2.1 \pm 2.9 (15)	1.6 \pm 1.6 ^B (13)	4.1 \pm 2.1 ^{A*} (14)	4.8 \pm 1.6 ^{A*} (15)	1.7 \pm 0.5 ^B (11)	
	2012	1.8 \pm 0.5 ^A (12)	1.2 \pm 0.8 ^A (14)	0.4 \pm 0.3 ^B (13)	1.0 \pm 0.6 ^A (14)	2.5 \pm 1.4 (15)	1.8 \pm 0.8 (15)	2.3 \pm 0.9 (14)	2.2 \pm 1.0 (14)	
Lindane (ng.g ⁻¹ dw)	2011	0.2 < LoQ (15)	0.2 < LoQ (7)	0.2 < LoQ (6)	0.2 < LoQ (15)	4.7 \pm 2 ^A (13)	5.2 \pm 2 ^{A*} (14)	0.5 \pm 0.3 ^B (15)	0.6 \pm 0.4 ^B (11)	
	2012	0.3 \pm 0.2 (12)	0.3 \pm 0.2 (14)	0.2 \pm 0.2 (13)	0.3 \pm 0.2 (14)	12.5 \pm 14.3 ^A (15)	0.6 \pm 0.4 ^{AB} (15)	0.4 \pm 0.2 ^B (14)	0.6 \pm 0.3 ^{AB} (14)	
Sum of DDTs and metabolites (ng.g ⁻¹ dw)	2011	36.6 \pm 11.4 ^A (15)	84.5 \pm 67.1 ^{A*} (7)	14.7 \pm 6.8 ^{B*} (6)	14.6 \pm 2.2 ^B (15)	33.5 \pm 24.9 ^B (13)	156.3 \pm 68.9 ^A (14)	202.9 \pm 49.4 ^{A*} (15)	5.7 \pm 2.6 ^{B*} (11)	
	2012	35.1 \pm 14.9 ^A (12)	30.7 \pm 13.5 ^A (14)	5.1 \pm 6.2 ^B (13)	11.9 \pm 4.2 ^B (14)	84.7 \pm 52.6 ^{A*} (15)	117 \pm 62.3 ^A (15)	105.9 \pm 66.3 ^A (14)	3.9 \pm 1.1 ^B (14)	
Sum of PBDEs (ng.g ⁻¹ dw)	2011	17.7 \pm 4.7 ^A (15)	28.7 \pm 28.7 ^A (7)	9.8 \pm 1 ^{AB} (6)	8.8 \pm 0.9 ^B (15)	15.7 \pm 11.7 ^B (13)	26.5 \pm 10.8 ^A (14)	17.8 \pm 2.6 ^{AB} (15)	7.7 \pm 0 ^C (11)	
	2012	27.2 \pm 10.3 ^{A*} (15)	53.6 \pm 30.9 ^{A*} (7)	10.9 \pm 3.0 ^B (6)	10.4 \pm 1.8 ^{B*} (14)	15.0 \pm 4.4 ^A (13)	19.2 \pm 8.1 ^A (15)	17.1 \pm 6.6 ^A (14)	7.2 \pm 0.1 ^B (14)	
Sum of PCBs (ng.g ⁻¹ dw)	2011	104.1 \pm 44.9 ^A (15)	135.4 \pm 93.5 ^{A*} (7)	27.4 \pm 8.8 ^{B*} (6)	24.6 \pm 10.2 ^B (15)	216.8 \pm 137.8 ^{BC} (13)	1185 \pm 1277 ^{AB*} (14)	1609 \pm 333 ^{A*} (15)	57.1 \pm 22.7 ^C (11)	
	2012	121.0 \pm 42.3 ^A (12)	77.7 \pm 32.2 ^B (14)	17.1 \pm 5.7 ^C (6)	24.9 \pm 8.4 ^C (15)	921.7 \pm 517.2 ^{A*} (15)	475.3 \pm 255.5 ^A (15)	918.8 \pm 449.7 ^A (14)	46.2 \pm 15.8 ^B (14)	

Table S.3: Spatial and temporal variation of muscle non-essential metals (mean \pm SD (n)) of yellow *A. rostrata* in the St. Lawrence system and *A. anguilla* in the Gironde system in 2011 and 2012. n is the sample size and data are expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight. Different letters indicate statistically significant differences among sites within species and within sampling years (ANOVA or KW. $p \leq 0.05$). Asterisks (*) indicate significant differences between 2011 and 2012 (Student's t test, $p \leq 0.05$).

Species		<i>Anguilla rostrata</i>				<i>Anguilla anguilla</i>			
Contaminants	Years	SFL	SPL	SOR	SJR	DOR	GAR	GIR	CER
Muscle Ag ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	0.12 \pm 0.23 (14)	0.08 \pm 0.05 (7)	0.10 \pm 0.17 (15)	0.13 \pm 0.17 (14)	0.09 \pm 0.17 (15)	0.08 \pm 0.1 (15)	0.33 \pm 1 (15)	0.28 \pm 0.74 (15)
	2012	0.09 \pm 0.14 (12)	0.05 \pm 0.05 (14)	0.19 \pm 0.42 (15)	0.14 \pm 0.17 (15)	0.05 \pm 0.04 (15)	0.18 \pm 0.3 (15)	0.2 \pm 0.32 (15)	0.38 \pm 0.55 (15)
Muscle Cd ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	0.006 \pm 0.006 B (14)	0.01 \pm 0.01 AB (7)	0.01 \pm 0.01 A (15)	0.01 \pm 0.01 AB (14)	0.03 \pm 0.02 A (15)	0.01 \pm 0.004 B (15)	0.03 \pm 0.01 A (15)	0.02 \pm 0.05 B (15)
	2012	0.02 \pm 0.02 * (12)	0.01 \pm 0.01 (14)	0.01 \pm 0.01 (15)	0.04 \pm 0.09 (15)	0.02 \pm 0.01 B (15)	0.91 \pm 1.7 A* (15)	0.02 \pm 0.01 B (15)	0.01 \pm 0.01 B (15)
Muscle Pb ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	0.01 \pm 0.02 B (14)	0.01 \pm 0.01 AB (7)	0.05 \pm 0.05 A (15)	0.03 \pm 0.03 AB (14)	0.05 \pm 0.04 (13)	0.12 \pm 0.27 (14)	0.04 \pm 0.04 (15)	0.11 \pm 0.29 (11)
	2012	0.02 \pm 0.02 (12)	0.01 \pm 0.01 (14)	0.07 \pm 0.20 (15)	0.03 \pm 0.08 (15)	0.07 \pm 0.06 (15)	0.08 \pm 0.11 (15)	0.04 \pm 0.05 (14)	0.06 \pm 0.10 (14)
Muscle Hg ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	0.87 \pm 0.19 A (14)	0.98 \pm 0.39 A (7)	0.63 \pm 0.45 AB (14)	0.26 \pm 0.08 B (14)	0.37 \pm 0.055 B (15)	0.28 \pm 0.05 C (15)	0.59 \pm 0.19 A (15)	0.17 \pm 0.05 D (15)
	2012	1.01 \pm 0.41 A (12)	0.59 \pm 0.18 A (14)	0.61 \pm 0.23 A (15)	0.24 \pm 0.069 B (15)	0.43 \pm 0.14 A* (15)	0.42 \pm 0.11 A (15)	0.42 \pm 0.17 A (15)	0.12 \pm 0.04 B (15)
Muscle As ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	0.3 \pm 0.1 C (14)	1.3 \pm 1.3 B (7)	1.8 \pm 1.0 AB (15)	3.6 \pm 1.3 A (14)	1.4 \pm 0.8 B (13)	1.6 \pm 0.9 B (14)	4.7 \pm 1.9 A* (15)	10.6 \pm 4.8 A (11)
	2012	1.3 \pm 2.9 B (12)	0.3 \pm 0.1 C (14)	1.4 \pm 0.6 AB (15)	3.2 \pm 0.9 A (15)	1.3 \pm 0.7 B (15)	2.4 \pm 4.6 B (15)	2.4 \pm 1.2 B (14)	20.1 \pm 12.4 A* (14)

Table S.4: Spatial and temporal variation of liver non-essential metals (mean \pm SD (n)) of yellow *A. rostrata* in the St. Lawrence system and *A. anguilla* in the Gironde system in 2011 and 2012. n is the sample size and data are expressed as $\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight. Different letters indicate statistically significant differences among sites within species and within sampling years (ANOVA or KW. $p \leq 0.05$). Asterisks (*) indicate significant differences between 2011 and 2012 (Student's t test. $p \leq 0.05$).

Species	<i>Anguilla rostrata</i>				<i>Anguilla anguilla</i>				
	Contaminants	Years	SFL	SPL	SOR	SJR	DOR	GAR	GIR
Liver Ag ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	0.23 \pm 0.10 (14)	0.89 \pm 0.79 (7)	0.40 \pm 0.18 (10)	0.73 \pm 0.33 (14)	0.15 \pm 0.07 (12)	0.54 \pm 0.57 (14)	1.38 \pm 0.66 (15)	0.15 \pm 0.07 (11)
	2012	0.36 \pm 0.18 (12)	0.68 \pm 0.43 (14)	0.72 \pm 0.30 (15)	1.27 \pm 0.63 (15)	0.67 \pm 0.32 (14)	0.25 \pm 0.15 (15)	1.05 \pm 0.94 (14)	0.35 \pm 0.15 (14)
Liver Cd ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	0.36 \pm 0.17 (14)	0.39 \pm 0.23 (7)	1.08 \pm 0.91 (15)	0.37 \pm 0.24 (14)	4.70 \pm 1.86 (15)	2.20 \pm 2.78 (15)	11.41 \pm 5.72 (15)	0.06 \pm 0.04 (15)
	2012	0.34 \pm 0.22 (12)	0.67 \pm 0.90 (14)	1.29 \pm 0.60 (15)	0.25 \pm 0.08 (15)	2.40 \pm 0.92 (14)	2.38 \pm 1.28 (15)	3.42 \pm 1.70 (14)	0.52 \pm 1.81 (14)
Liver Pb ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	0.06 \pm 0.03 (14)	0.16 \pm 0.16 (7)	0.15 \pm 0.07 (10)	0.31 \pm 0.2 (14)	0.61 \pm 0.34 (12)	0.98 \pm 0.63 (14)	1.54 \pm 0.57 (15)	0.38 \pm 0.24 (11)
	2012	0.06 \pm 0.03 (12)	0.13 \pm 0.09 (14)	1.56 \pm 5.2 (15)	0.28 \pm 0.12 (15)	0.45 \pm 0.21 (14)	0.12 \pm 0.07 (15)	0.73 \pm 0.43 (14)	0.13 \pm 0.06 (14)
Liver As ($\mu\text{g.g}^{-1}$. dw)	2011	1.9 \pm 0.5 (14)	3.2 \pm 2.6 (7)	2.6 \pm 1.6 (10)	3.9 \pm 1.0 (14)	1.9 \pm 0.8 (12)	1.9 \pm 1.4 (14)	8.0 \pm 2.8 (15)	6.3 \pm 1.8 (11)
	2012	0.7 \pm 0.4 (12)	1.2 \pm 0.6 (14)	2.9 \pm 1.4 (15)	3.3 \pm 1.1 (15)	1.7 \pm 1.1 (14)	1.4 \pm 2.9 (15)	2.7 \pm 1.0 (14)	7.5 \pm 3.6 (14)

Table S.5: Kendall's correlation matrix (n=82) of the variables used in the principal component analysis for yellow *A. rostrata* at capture among sites in 2011 and 2012 combined. Kendall's rank correlation coefficient of all variables are presented and separated in sections a) and b). Significant correlations ($p \leq 0.05$) are indicated in bold. MMCs = splenic Melano-Macrophage Centers.

Variables	BL	BW	Muscle_Lipids	Age	EROD	Liver_CAT	Liver_SOD	Density of MMCs	Surface of MMCs	Hemosiderin pigment	Lipofuscin pigment	Hexachlorobenze:
BL	1	0.920	0.554	0.424	-0.205	0.004	-0.269	-0.163	-0.015	-0.247	0.077	0.492
BW	0.920	1	0.580	0.423	-0.177	0.021	-0.278	-0.167	-0.027	-0.239	0.065	0.540
Muscle_Lipids	0.554	0.580	1	0.380	-0.075	-0.009	-0.286	-0.047	0.056	-0.087	0.057	0.508
Age	0.424	0.423	0.380	1	0.054	0.032	-0.174	0.014	0.140	0.028	0.112	0.396
EROD	-0.205	-0.177	-0.075	0.054	1	-0.004	0.044	0.156	0.113	0.064	-0.079	-0.069
Liver_CAT	0.004	0.021	-0.009	0.032	-0.004	1	0.017	0.105	-0.046	0.158	-0.124	0.074
Liver_SOD	-0.269	-0.278	-0.286	-0.174	0.044	0.017	1	0.004	-0.007	0.197	-0.091	-0.160
Density of MMCs	-0.163	-0.167	-0.047	0.014	0.156	0.105	0.004	1	0.217	0.185	-0.035	-0.056
Surface of MMCs	-0.015	-0.027	0.056	0.14	0.113	-0.046	-0.007	0.217	1	0.226	0.095	0.060
Hemosiderin pigment	-0.247	-0.239	-0.087	0.028	0.064	0.158	0.197	0.185	0.226	1	0.058	-0.059
Lipofuscin pigment	0.077	0.065	0.057	0.112	-0.079	-0.124	-0.091	-0.035	0.095	0.058	1	0.021
Hexachlorobenzene	0.492	0.54	0.508	0.396	-0.069	0.074	-0.160	-0.056	0.060	-0.059	0.021	1
Lindane	-0.024	-0.051	0.077	-0.013	0.037	-0.168	0.028	0.027	0.108	0.108	0.095	0.020
DDT and metabolites	0.598	0.617	0.564	0.266	-0.159	0.095	-0.160	-0.083	-0.005	-0.200	0.061	0.555
Sum of PBDEs	0.469	0.457	0.463	0.185	-0.159	0.018	-0.178	-0.007	0.004	-0.221	0.057	0.335
Sum of PCBs	0.567	0.586	0.542	0.257	-0.126	0.058	-0.229	-0.042	0.050	-0.170	0.052	0.518
Muscle_As	-0.267	-0.261	-0.229	-0.138	0.101	0.102	0.095	0.061	-0.037	0.235	0.034	-0.176
Muscle_Ag	-0.106	-0.100	-0.064	-0.001	0.067	0.001	0.068	0.023	-0.059	0.054	-0.111	-0.018
Muscle_Cd	-0.153	-0.161	0.016	-0.069	0.025	-0.029	-0.042	-0.031	0.007	0.059	0.009	-0.170
Muscle_Pb	-0.191	-0.205	-0.075	-0.070	0.011	0.071	0.070	0.036	0.138	0.260	0.136	-0.083
Muscle_Hg	0.352	0.325	0.207	0.216	-0.076	0.074	-0.072	0.050	0.200	-0.113	0.099	0.231
Liver_As	-0.172	-0.143	-0.212	-0.022	0.144	0.051	0.137	-0.039	-0.044	0.121	0.012	-0.070
Liver_Ag	-0.211	-0.218	-0.093	-0.080	0.131	0.031	0.090	0.077	-0.032	0.101	-0.151	-0.164
Liver_Cd	-0.264	-0.261	-0.228	-0.047	0.094	0.096	0.186	0.167	0.185	0.118	-0.052	-0.206
Liver_Pb	-0.386	-0.373	-0.286	-0.062	0.234	-0.022	0.116	0.207	0.037	0.258	-0.033	-0.272

a)

!

Variables	Lindane	DDT and metabolites	Sum of PBDEs	Sum of PCBs	Muscle_As	Muscle_Ag	Muscle_Cd	Muscle_Pb	Muscle_Hg	Liver_As	Liver_Ag	Liver_Cd	Liver_Pb
BL	-0.024	0.598	0.469	0.567	-0.267	-0.106	-0.153	-0.191	0.352	-0.172	-0.211	-0.264	-0.386
BW	-0.051	0.617	0.457	0.586	-0.261	-0.100	-0.161	-0.205	0.325	-0.143	-0.218	-0.261	-0.373
Muscle_Lipids	0.077	0.564	0.463	0.542	-0.229	-0.064	0.016	-0.075	0.207	-0.212	-0.093	-0.228	-0.286
Age	-0.013	0.266	0.185	0.257	-0.138	-0.001	-0.069	-0.070	0.216	-0.022	-0.080	-0.047	-0.062
EROD	0.037	-0.159	-0.159	-0.126	0.101	0.067	0.025	0.011	-0.076	0.144	0.131	0.094	0.234
Liver_CAT	-0.168	0.095	0.018	0.058	0.102	0.001	-0.029	0.071	0.074	0.051	0.031	0.096	-0.022
Liver_SOD	0.028	-0.160	-0.178	-0.229	0.095	0.068	-0.042	0.070	-0.072	0.137	0.090	0.186	0.116
Density of MMCs	0.027	-0.083	-0.007	-0.042	0.061	0.023	-0.031	0.036	0.050	-0.039	0.077	0.167	0.207
Surface of MMCs	0.108	-0.005	0.004	0.050	-0.037	-0.059	0.007	0.138	0.200	-0.044	-0.032	0.185	0.037
Hemosiderin pigment	0.108	-0.200	-0.221	-0.170	0.235	0.054	0.059	0.260	-0.113	0.121	0.101	0.118	0.258
Lipofuscin pigment	0.095	0.061	0.057	0.052	0.034	-0.111	0.009	0.136	0.099	0.012	-0.151	-0.052	-0.033
Hexachlorobenzene	0.020	0.555	0.335	0.518	-0.176	-0.018	-0.170	-0.083	0.231	-0.070	-0.164	-0.206	-0.272
Lindane	1	0.026	0.075	0.076	-0.010	0.063	0.038	0.045	-0.015	-0.174	0.001	-0.069	-0.009
DDT and metabolites	0.026	1	0.610	0.737	-0.282	-0.080	-0.136	-0.072	0.285	-0.215	-0.238	-0.193	-0.375
Sum of PBDEs	0.075	0.610	1	0.612	-0.400	-0.095	-0.052	-0.073	0.321	-0.390	-0.169	-0.127	-0.354
Sum of PCBs	0.076	0.737	0.612	1	-0.353	-0.113	-0.135	-0.073	0.360	-0.299	-0.271	-0.144	-0.407
Muscle_As	-0.010	-0.282	-0.400	-0.353	1	0.178	0.138	0.207	-0.458	0.499	0.335	-0.059	0.340
Muscle_Ag	0.063	-0.080	-0.095	-0.113	0.178	1	0.082	0.186	-0.135	0.150	0.080	-0.046	0.155
Muscle_Cd	0.038	-0.136	-0.052	-0.135	0.138	0.082	1	0.251	-0.052	0.030	0.124	0.055	0.086
Muscle_Pb	0.045	-0.072	-0.073	-0.073	0.207	0.186	0.251	1	-0.068	0.038	0.078	0.006	0.098
Muscle_Hg	-0.015	0.285	0.321	0.360	-0.458	-0.135	-0.052	-0.068	1	-0.328	-0.352	0.091	-0.351
Liver_As	-0.174	-0.215	-0.390	-0.299	0.499	0.150	0.030	0.038	-0.328	1	0.330	0.019	0.342
Liver_Ag	0.001	-0.238	-0.169	-0.271	0.335	0.080	0.124	0.078	-0.352	0.330	1	-0.002	0.353
Liver_Cd	-0.069	-0.193	-0.127	-0.144	-0.059	-0.046	0.055	0.006	0.091	0.019	-0.002	1	0.109
Liver_Pb	-0.009	-0.375	-0.354	-0.407	0.340	0.155	0.086	0.098	-0.351	0.342	0.353	0.109	1

b)

Table S.6: Kendall's correlation matrix (n=87) of biomarker variables used in the principal component analysis for yellow *A. anguilla* at capture among sites in 2011 and 2012. Kendall's rank correlation coefficient of all variables are presented and separated in sections a) and b). Significant correlations ($p \leq 0.05$) are indicated in bold. MMCs = splenic Melano-Macrophage Centers

Variables	BL	BW	Muscle_Lipids	Age	Number <i>A. crassus</i>	EROD	Liver_CAT	Liver_SOD	Density of MMCs	Surface of MMCs	Hemosiderin pigment	Lipofuscin pigment	Hexachlorobenzene
BL	1	0.888	0.315	0.441	-0.086	0.080	0.090	0	0.037	0.337	0.060	0.159	0.242
BW	0.888	1	0.329	0.430	-0.076	0.117	0.078	-0.030	0.013	0.317	0.068	0.156	0.220
Muscle_Lipids	0.315	0.329	1	0.220	-0.163	-0.02	0.192	0.006	-0.022	0.195	0.185	0.083	0.555
Age	0.441	0.430	0.220	1	0.074	0.154	0.165	0.002	0.199	0.384	-0.119	0.230	0.174
Number <i>A. crassus</i>	-0.086	-0.076	-0.163	0.074	1	0.079	0.023	0.027	0.077	-0.088	-0.322	0.071	-0.011
EROD	0.080	0.117	-0.020	0.154	0.079	1	0.154	-0.167	0.037	0.059	-0.079	-0.014	-0.138
Liver_CAT	0.090	0.078	0.192	0.165	0.023	0.154	1	0.01	0.095	0.145	0.011	0.121	0.162
Liver_SOD	0.000	-0.030	0.006	0.002	0.027	-0.167	0.010	1	0.031	0.036	0.038	-0.067	0.093
Density of MMCs	0.037	0.013	-0.022	0.199	0.077	0.037	0.095	0.031	1	0.136	-0.005	0.025	0.004
Surface of MMCs	0.337	0.317	0.195	0.384	-0.088	0.059	0.145	0.036	0.136	1	0.078	0.223	0.195
Hemosiderin pigment	0.060	0.068	0.185	-0.119	-0.322	-0.079	0.011	0.038	-0.005	0.078	1	-0.249	0.122
Lipofuscin pigment	0.159	0.156	0.083	0.230	0.071	-0.014	0.121	-0.067	0.025	0.223	-0.249	1	0.102
Hexachlorobenzene	0.242	0.220	0.555	0.174	-0.011	-0.138	0.162	0.093	0.004	0.195	0.122	0.102	1
Lindane	-0.281	-0.297	-0.071	-0.212	0.135	-0.217	0.013	0.129	-0.063	-0.241	-0.142	0	0.082
DDT and metabolites	0.265	0.232	0.278	0.467	0.099	0.017	0.309	0.054	0.139	0.205	-0.133	0.181	0.398
Sum of PBDEs	0.156	0.137	0.238	0.413	0.138	0.076	0.330	0.043	0.136	0.170	-0.209	0.201	0.303
Sum of PCBs	0.189	0.154	0.258	0.359	0.012	0.004	0.341	0.055	0.086	0.167	-0.079	0.176	0.352
Muscle_As	0.052	0.086	0.111	-0.247	-0.241	-0.008	0.013	0.035	-0.210	-0.037	0.340	-0.110	0.017
Muscle_Ag	0.086	0.098	0.014	0.038	0.034	0.076	0.012	0.050	-0.042	0.062	-0.083	-0.006	-0.038
Muscle_Cd	-0.008	-0.013	-0.112	0.170	0.126	0.057	0.038	-0.034	0.235	0.074	-0.165	-0.134	-0.081
Muscle_Pb	-0.053	-0.074	-0.051	-0.030	0.096	-0.016	-0.027	0.039	-0.016	-0.040	-0.168	-0.019	0.035
Muscle_Hg	0.187	0.146	0.012	0.431	0.064	0.061	0.218	0.062	0.281	0.213	-0.151	0.090	0.127
Liver_As	0.145	0.175	0.212	-0.078	-0.224	-0.062	0.058	0.004	-0.093	0.080	0.366	0.020	0.105
Liver_Ag	0.249	0.222	0.216	0.244	0.027	0.062	0.237	-0.063	-0.021	0.222	-0.031	0.197	0.243
Liver_Cd	0.046	0.024	0.076	0.282	0.118	0.024	0.284	0.028	0.178	0.055	-0.035	0.072	0.178
Liver_Pb	0.021	-0.006	0.164	0.177	0.058	-0.136	0.287	0.175	0.109	0.015	0.088	0.173	0.279

a)

!

Variables	Lindane	DDT and metabolites	Sum of PBDEs	Sum of PCBs	Muscle_As	Muscle_Ag	Muscle_Cd	Muscle_Pb	Muscle_Hg	Liver_As	Liver_Ag	Liver_Cd	Liver_Pb
BL	-0.281	0.265	0.156	0.189	0.052	0.086	-0.008	-0.053	0.187	0.145	0.249	0.046	0.021
BW	-0.297	0.232	0.137	0.154	0.086	0.098	-0.013	-0.074	0.146	0.175	0.222	0.024	-0.006
Muscle_Lipids	-0.071	0.278	0.238	0.258	0.111	0.014	-0.112	-0.051	0.012	0.212	0.216	0.076	0.164
Age	-0.212	0.467	0.413	0.359	-0.247	0.038	0.170	-0.030	0.431	-0.078	0.244	0.282	0.177
Number <i>A. crassus</i>	0.135	0.099	0.138	0.012	-0.241	0.034	0.126	0.096	0.064	-0.224	0.027	0.118	0.058
EROD	-0.217	0.017	0.076	0.004	-0.008	0.076	0.057	-0.016	0.061	-0.062	0.062	0.024	-0.136
Liver_CAT	0.013	0.309	0.330	0.341	0.013	0.012	0.038	-0.027	0.218	0.058	0.237	0.284	0.287
Liver_SOD	0.129	0.054	0.043	0.055	0.035	0.050	-0.034	0.039	0.062	0.004	-0.063	0.028	0.175
Density of MMCs	-0.063	0.139	0.136	0.086	-0.210	-0.042	0.235	-0.016	0.281	-0.093	-0.021	0.178	0.109
Surface of MMCs	-0.241	0.205	0.170	0.167	-0.037	0.062	0.074	-0.040	0.213	0.080	0.222	0.055	0.015
Hemosiderin pigment	-0.142	-0.133	-0.209	-0.079	0.340	-0.083	-0.165	-0.168	-0.151	0.366	-0.031	-0.035	0.088
Lipofuscin pigment	0.000	0.181	0.201	0.176	-0.110	-0.006	-0.134	-0.019	0.090	0.020	0.197	0.072	0.173
Hexachlorobenzene	0.082	0.398	0.303	0.352	0.017	-0.038	-0.081	0.035	0.127	0.105	0.243	0.178	0.279
Lindane	1	0.060	0.116	0.076	-0.131	-0.165	-0.008	0.193	-0.102	-0.147	-0.163	0.049	0.108
DDT and metabolites	0.060	1	0.718	0.713	-0.256	-0.077	0.152	0.064	0.448	-0.114	0.289	0.430	0.400
Sum of PBDEs	0.116	0.718	1	0.625	-0.311	-0.116	0.139	0.063	0.348	-0.176	0.231	0.324	0.321
Sum of PCBs	0.076	0.713	0.625	1	-0.152	-0.107	0.092	0.067	0.450	-0.017	0.380	0.460	0.476
Muscle_As	-0.131	-0.256	-0.311	-0.152	1	-0.004	-0.192	-0.053	-0.268	0.515	0.053	-0.173	-0.037
Muscle_Ag	-0.165	-0.077	-0.116	-0.107	-0.004	1	0.021	0.052	0.014	-0.005	0.027	-0.035	-0.113
Muscle_Cd	-0.008	0.152	0.139	0.092	-0.192	0.021	1	0.147	0.297	-0.126	0.034	0.274	-0.021
Muscle_Pb	0.193	0.064	0.063	0.067	-0.053	0.052	0.147	1	0.028	-0.076	-0.045	0.035	-0.009
Muscle_Hg	-0.102	0.448	0.348	0.450	-0.268	0.014	0.297	0.028	1	-0.170	0.304	0.531	0.266
Liver_As	-0.147	-0.114	-0.176	-0.017	0.515	-0.005	-0.126	-0.076	-0.170	1	0.202	-0.024	0.175
Liver_Ag	-0.163	0.289	0.231	0.380	0.053	0.027	0.034	-0.045	0.304	0.202	1	0.308	0.279
Liver_Cd	0.049	0.403	0.324	0.460	-0.173	-0.035	0.274	0.035	0.531	-0.024	0.308	1	0.454
Liver_Pb	0.108	0.400	0.321	0.476	-0.037	-0.113	-0.021	-0.009	0.266	0.175	0.279	0.454	1

b)

!

10. ARTICLE 3

Patey G., Couillard C.M., Pierron F., Baudrimont M. et Couture P. Les effets de l'exposition chronique au Cadmium, aux PCBs, à la restriction alimentaire et à la salinité sur l'activité hépatique d'EROD et les biomarqueurs histopathologiques dans la rate chez l'anguille jaune européenne (*anguilla anguilla*).

En préparation pour Science of Total Environment (STOTEN)

Géraldine Patey : Analyses biochimiques et histopathologiques, traitement et interprétation des données et rédaction de l'article.

Catherine M. Couillard : Contribution à l'interprétation des données et rédaction de l'article

Fabien Pierron et Magalie Baudrimont : Révision de l'article.

Patrice Couture : Contribution à l'interprétation des données et rédaction de l'article.

Effect of chronic exposure to cadmium, PCBs, salinity and food restriction on hepatic EROD activity and spleen histopathological responses in yellow European eels *Anguilla anguilla*

Géraldine Patey^{1,2*}, Catherine M. Couillard², Fabien Pierron³, Magalie Baudrimont⁴ and Patrice Couture¹

¹ Institut National De La Recherche Scientifique (INRS), Centre Eau Terre Environnement, 490 De La Couronne, Québec (Québec), G1K 9A9, Canada. Email : geraldine.patey@ete.inrs.ca

² Fisheries and Oceans Canada, Maurice Lamontagne Institute, 850 Route de la Mer, Mont-Joli (Québec), G5H 3Z4, Québec, Canada. Email: catherine.couillard@dfo-mpo.gc.ca

³ Univ. Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, F-33400 Talence, France. Email : f.pierron@epoc.u-bordeaux1.fr

⁴ CNRS, EPOC, UMR 5805, F-33400 Talence, France. Email: magalie.baudrimont@u-bordeaux.fr

* corresponding author. Email: geraldine.patey@gmail.com

In preparation for Science of Total Environment (STOTEN)

Abstract

In aquatic ecosystems, the presence of complex mixtures of contaminants combined with other potentially confounding factors (i.e. natural factors) may result in further difficulties in the interpretation of biomarker responses in wild organisms. In this context, the aim of this study was to investigate the responses of hepatic EROD and spleen histopathological biomarkers such as number and size of spleen melanomacrophage centers (MMC) and deposition of hemosiderin and lipofuscin pigments in MMC in fish exposed experimentally in controlled laboratory conditions to selected contaminants or natural stressors, individually. Yellow European eels (*Anguilla anguilla*) were used in this experimentation due to their faculty to bioaccumulate high concentrations of contaminants in fat tissue. During laboratory experiments, eels were exposed during 45 days to natural factors (high salinity or diet restriction) or contaminants (PCBs or Cd) at levels close to those found in the contaminated sites. Our results revealed a dose-response relationship between EROD activity and muscle PCB concentration and confirmed that EROD activity is a sensitive tool to detect exposure for the most toxic PCBs. No effect of Cd was detected on EROD or spleen density of MMC. However, a higher surface of MMC was associated with higher liver concentrations of Cd and higher hemosiderin deposition in MMC suggesting a potentially toxic effect of Cd. Relationships between condition factor, EROD activity and density of MMC suggested that differences in food intake observed among conditions could affect eel's condition factor and biomarker responses. Indeed, higher density of MMC were observed in eels with low condition factor and low food intake rate suggested an induction of the immune system. Finally, salinity and diet restriction did not affect EROD activity or spleen histopathological biomarker responses. Overall, our results suggest that PCB and Cd contamination had toxic effect on liver biotransformation enzymes and spleen surface of MMC, however future studies are needed to explore relationships among condition factor and food intake rate on eel's biomarker responses.

Keywords: EROD activity, Histopathological markers, European eel, PCB mixture, Cadmium, Natural stressors

1. Introduction

In an environmental context, a vast number of inorganic and organic compounds and natural factors are known to affect biomarker responses in fish and to vary spatially and temporally (Van der Oost et al., 2003; Belpaire et al., 2009; Geeraerts and Belpaire, 2010). Climate change is currently inducing accelerated changes in natural factors such as temperature, pH and salinity, affecting the chemistry, rate of uptake and effects of chemical contaminants in estuarine and marine ecosystems (Schiedek et al., 2007; Couillard et al., 2008; Chaalali et al., 2013). All these modifications can affect the health of vulnerable fish species. The most compelling reason for using biomarkers is that they can give information on the biological effects of pollutants or natural factors on fish species. Nevertheless, the presence of complex mixtures of contaminants combined with potentially confounding factors (i.e. natural factors) may result in further difficulties in the interpretation of biomarker response patterns (Van der Oost et al., 2003). A huge challenge for ecotoxicologists is to distinguish the effects triggered by contaminants from those triggered by natural factors. In this present experimental study, eels were exposed to only one factor at a time in order to assess the response of biomarker according to one stressor.

Anguilla species are commonly used in ecotoxicology as a bioindicator of contamination due to the high concentrations of contaminants accumulated in their tissues during their relatively long growth stage (yellow eel) (Belpaire and Goemans, 2007; Geeraerts and Belpaire, 2010). Historically abundant and widespread in Europe, *Anguilla anguilla* population have suffered a sharp decline since 1980s (Haro et al., 2000; Wirth and Bernatchez, 2003; FAO/ICES, 2009). The causes of their decline are likely multifactorial and include chemical pollution (Geeraerts and Belpaire, 2010). Recently, in Patey et al. 2017b, we have reported significant differences in hepatic ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity and spleen histopathological biomarkers in wild yellow *A. anguilla* captured in contaminated sites compared to reference sites in the Gironde Estuary system (south-west of France). Although, studies have reported elevated tissue concentrations of PCB and metals such as Cd in eels collected in contaminated sites (Baillon et al. 2015; Pannetier et al., 2016), high biomarker

responses were not always associated with high tissue concentrations of these persistent contaminants, suggesting that other contaminants or natural factors were involved (Patey et al., 2017b). Additionally, as we mentioned in Patey et al. (2017a), yellow eels sampled at the Gironde system sites with a contamination gradient may differ by other factors than contamination such as their metabolic or growth rates. These factors may constitute additional biases in interpreting biomarker responses.

Considering all these observations and that the present study is part of a previous laboratory study (Baillon et al., 2016a, b)) examining specific transcriptomic profiles in European yellow eels for different anthropogenic (cadmium (Cd) or PCBs) and natural (salinity or food restriction) factors under controlled conditions, this provided a unique opportunity to investigate the responses of hepatic EROD and spleen histopathological biomarkers in *A. anguilla* exposed experimentally in controlled laboratory conditions than in field context. The selected biomarkers have been used in previous field studies on eels (Couillard et Hodson, 1996; Pacheco et Santos, 2002; Van der Oost et al., 2003; Patey et al., 2017b) and are among the list of recommended biomarkers in the Report of the Workshop of the Working Group on Eels and the Working Group on Biological Effects of Contaminants (ICES 2016). EROD is a biotransformation marker involved in a well-documented biochemical reaction to organic planar contaminants such as coplanar polychlorobiphenyls (PCB) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (Van der Oost et al., 2003; Whyte et al., 2008). Splenic melanomacrophage centers (MMC) are recognized as non-specific histological biomarkers because they vary in number, size and pigment content depending on chronic exposure to contaminants (organic and inorganic contaminants), infections caused by parasites, bacteria and viruses and natural factors (heat stress, food restriction) (Wolke, 1992; Couillard et al., 1997; Kirk et al., 2000; Fournie et al., 2001; Au, 2004). Exposures to Cd and PCB were carried out at two contamination levels in order to mimic the exposure conditions of the Gironde Estuary (Tapie et al., 2011). Salinity and food restriction are natural factors known to show strong variations among sites in the Gironde system. Through this study, our intention was to evaluate the relationships between natural factors (nutritional condition, salinity) and/or specific contaminants (PCB and Cd) in yellow *A. anguilla* and to document relationships between biomarker responses and tissue residues of

PCB and Cd.

2. Materials and methods

As part of an international project encompassing several research teams, the experimental design of this study was conducted and published previously by Baillon et al. (2016a); Baillon et al. (2016b)

2.1 Fish

Fifty-six young yellow *A. anguilla*, with an average body length of 37.71 ± 5.05 cm and an average body mass of 75.0 ± 3.8 g were collected in May 2012 in a low-contaminated brackish marsh (Certes) in the Arcachon Bay in France (Baillon et al., 2016a; Baillon et al., 2016b). Immature eels were used to minimize the effects of sex variation and to compare with the life stage used in previous field studies. After the capture, eels were transported to the laboratory (Marine Station of Arcachon) and allowed to acclimate (one month) to controlled conditions, i.e., running aerated brackish water (salinity 5‰) from natural seawater dilution at 23°C under a natural photoperiod. During this period, eels were fed *ad libitum* every day with blue mussels and no lethality was observed.

2.2 Laboratory exposures and tissue sampling

All procedures of the laboratory studies were described previously by Baillon et al. (2016a); (2016b) and were approved by the Aquitaine fish-birds' ethics committee. Our study focuses mainly on one part of the experimentation, which we briefly summarized as follows:

After a period of acclimatization of 1 month, eight organisms were exposed in each different condition in tanks supplied with natural diluted brackish water (5‰) (except for the “high salinity” condition) during 45 days. For PCBs and Cd exposures, the concentration ranges selected were based on previous studies in order to represent exposure conditions of eels in the Gironde system (Tapie et al., 2011; Baillon et al., 2016a; Baillon et al., 2016b). For PCBs, the trophic route is known to be the major contamination route in fish (Loizeau and Menesguen 1993). In the case of PCB_low and

PCB_high conditions respectively, the food was enriched with pyralene to reach nominal concentrations of 50 ng. g⁻¹ dry weight (dw) or 300 ng. g⁻¹ dw of PCBs via artificial food (fresh fish flesh mixed with oil (1.3%) and agar-agar (0.8%)). The pyralene solution consists of a mixture of seven priority congeners of PCBs (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) (US-EPA). For Cd_low and Cd_high, respectively, nominal concentrations of 0.4 and 4 µg. L⁻¹ of Cd via a solution of CdCl₂ were introduced in the tank water. Control eels and eels on dietary restriction were maintained in uncontaminated tanks with brackish water (salinity of 5‰) and fed with uncontaminated food. Eels from the diet_low condition were fed 2% wet weight fish/day compared to 7.5% wet weight fish/day for other experimental conditions. For the high salinity condition, eels were exposed to a salinity of 17.7 ± 0.2‰ (Baillon et al., 2016a; Baillon et al., 2016b). For all conditions, the unconsumed food was removed every morning, dried and weighed to determine the food intake rate as described by Baillon et al. (2016a); Baillon et al. (2016b). All experimental conditions and result of food intake rate are summarized in Table 1.

After 45 days of exposure, fish were sampled, measured, weighed and then killed by decapitation. At the end of the experimentation, the percentage of eels that died was determined in each condition from the total number of eels present at the beginning and mortality rate (%) was calculated (Table 1). Each swimbladder was dissected and examined macroscopically to determine the presence of the parasite *A. crassus* (Girard and Elie, 2007). The prevalence (number of infected specimens / number of specimens tested x 100) was calculated according to (Margolis et al., 1982). Samples of spleen were extracted and fixed in 10% phosphate-buffered formalin for histopathological analysis. Samples of liver were frozen in liquid nitrogen and preserved at -80°C for later EROD determination and Cd quantification. Samples of caudal muscle were kept in aluminium paper and stored at -20°C for PCB quantification.

Table 1: Experimental conditions employed to test the influence of contaminants and environmental factors on biomarker responses in yellow *A. anguilla*. N = 8 in all treatments at the beginning of the experiment. Food intake rate (%) is calculated by eel and is presented as mean percentage \pm standard deviation (SD). n in parenthesis is the number of food intake assessments in days. Mean designated with different letters are significantly different.

Treatments	exposure condition	Contamination route	Salinity (‰)	Temperature (°C)	Food ration (%)	Food intake (%) ¹	Mortality (%) ²
Controls	-	-	5	23	7.5	71.9 \pm 3.33 b (22)	13
Diet_low	2 % wet weight fish/day	-	5	23	2	27.8 \pm 1.16 f (22)	0
Salinity_high	17.7 \pm 0.2 ‰ of salinity	-	18	23	7.5	56.84 \pm 4.99 c (22)	38
PCB_low	[PCBs] 50 ng. g ⁻¹	Food	5	23	7.5	94.64 \pm 1.85 a (22)	25
PCB_high	[PCBs] 300 ng. g ⁻¹	Food	5	23	7.5	32.15 \pm 1.73 e (22)	38
Cd_low	[Cd] 0.4 μ g. L ⁻¹	Water	5	23	7.5	68.85 \pm 3.4 b (22)	25
Cd_high	[Cd] 4 μ g. L ⁻¹	Water	5	23	7.5	43.4 \pm 1.91 d (22)	0

¹Note: The statistical differences of food intake rate (%) among conditions presented in this table correspond to the first part of the experiment for our study. The overall results of food intake rate (%) for all experimental conditions were detailed in Baillon et al. (2016) including the first and second part of the laboratory experimentation.

²Note: No significant differences in the mortality rate (%) were observed among conditions using Fisher's exact test.

2.3 Chemical analysis

The analysis of the seven indicator PCBs (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) was performed in the diets and in eel muscle following the procedures described elsewhere (Baillon et al., 2015). The detection limits ranged from 0.2 ng. g⁻¹ to 2 ng. g⁻¹ dw. All PCB concentrations were expressed in ng. g⁻¹ of dw tissue. Cd analyses were carried out in liver and water samples following the procedure described by Pierron et al. (2007). The detection limit for water samples was 0.1 µg. L⁻¹ Cd. Cadmium concentrations in liver fish were expressed as ng. g⁻¹ of dw.

2.4 EROD assay

Supplies and chemicals for EROD assay were purchased from Sigma–Aldrich (St-Louis, MO, USA). EROD activity was measured in the post mitochondrial supernatant prepared from homogenates of 50 mg crushed liver in 1 ml of N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) grinding buffer and using an adaptation of a microplates spectrofluorimetric method (Fragoso et al., 1998). This measure is based on the increase of the fluorescence in the reaction medium due to the transformation of 7-ethoxyresorufin (7-ER) into resorufin. The activity was quantified in 96-well microplates using a Cytofluor II® plate reader (excitation 530 nm, emission 590 nm, PerSeptive Biosystems, Framingham, MA, USA). All samples were assayed in triplicate. Total protein concentration of the supernatant was measured with Bradford reagent, using bovine serum albumin as a protein standard (BIO-RAD Laboratories, Hercules, CA, USA). EROD activity was expressed as pmoles resorufin.min⁻¹.mg⁻¹ protein.

2.5 Histopathology

A transversal section from the central part of spleen was fixed in 10% phosphate-buffered formalin within minutes after death. Samples were then embedded in paraffin and sections 6 µm thick were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) (Luna, 1968). Two additional sections of spleen were stained with Perls' Prussian blue staining for ferric iron associated with hemosiderin deposits or with Schmorl staining for lipofuscin deposits (Luna, 1968). In sections of spleen stained with HE, the density and the surface of Melano-Macrophage Centers (MMCs) were evaluated with the same procedures used

in Patey et al. 2017 (in submission). Density was expressed as number of MMC (mm^2)⁻¹ and surface as mm^2 MMC⁻¹. The proportion of 25 randomly selected MMCs that stained positively with Perls' Prussian Blue for hemosiderin and with Schmorl for lipofuscin was evaluated and classified from 1 to 5 grades as follows: 1: no macrophage stained; 2: 0-25% stained; 3: 25–50% stained; 4: 50-75% stained and 5: > 75%.

2.6 Statistical analysis

The multivariate analyses and Kendall correlations were conducted using XLSTAT-ADA (Addinsoft, USA) and Kruskal Wallis test and linear regressions using Prism v. 7.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Fish Hepato-Somatic Index (HSI) and Fulton condition factor are calculated as follows: $\text{HSI} = (\text{liver weight (g)} / \text{total body mass (g)} * 100)$ and $\text{Fulton condition factor} = [(\text{total body mass (g)} * 10^5) / (\text{body length (mm)})^3]$. First, a Principal Components Analysis (PCA) and a Kendall rank correlation test were performed to explore the statistical influence of biological characteristics on biomarker responses. PCA was used here to identify relationship between morphometric traits (body length, body mass, condition factor and HSI) and biomarker responses (EROD, density and surface of MMC and deposition of hemosiderin and lipofuscin pigments) measured in a total of forty-six eels from all conditions.

Secondly, in complementary to the PCA, two separate Kendall correlation analyses were performed to test the statistical influence of measured tissue concentrations of contaminants and lipid contents on biomarker responses for controls, PCBs and Cd exposures. The first correlation matrix was made among eels from PCB_high, PCB_low conditions and controls and the second was produced among eels from Cd_high, Cd_low conditions and controls. The significance level of the Kendall's correlations was fixed at 0.05 and relationships were considered strong when the Kendall's tau coefficient was > 0.05.

Thirdly, a non-parametric Kruskal-Wallis test (KW) followed by a Dunn's multiple comparison test were used to compare "not normally distributed" data of biological characteristics, concentrations of contaminant and biomarker responses among conditions (i.e. Controls, Diet_low, Salinity_high, PCB_low, PCB_high, Cd_low and Cd_high). Indeed, before analysis, the normality (Shapiro-Wilk test) and

homoscedasticity of the data set were tested. The mortality rate and the prevalence of parasites were compared among conditions using the Fisher's exact test. For all statistical results, the level of significance was set at $P \leq 0.05$.

Finally, dose-response relationships for EROD activity, density and surface of MMC in function of measured tissue concentration of contaminants were assessed by linear regression analysis. Before performing simple linear regression, data of EROD activity, density and surface of MMC and concentration of contaminant were log-transformed to fulfil the assumptions of homoscedasticity and normal distribution of residuals.

3- Results

3.1. Exposure concentrations and level of contaminants measured in eels

The average PCB concentrations (sum of 7 PCBs listed above) in control and PCB-enriched foods reached $25.0 \pm 3.6 \text{ ng. g}^{-1}$ dry weight (dw) for control food, $36.8 \pm 12.1 \text{ ng. g}^{-1}$ dw for PCB_low and $207.2 \pm 15.4 \text{ ng. g}^{-1}$ dw for PCB_high (Baillon et al., 2016a). The average Cd concentrations were $0.09 \pm 0.01 \text{ } \mu\text{g. L}^{-1}$ in the control tank, $0.42 \pm 0.04 \text{ } \mu\text{g. L}^{-1}$ in Cd_low tank and $4.00 \pm 0.18 \text{ } \mu\text{g. L}^{-1}$ in the Cd_high tank (Baillon et al., 2016a).

Eels exposed to the Cd_high condition had 7.3 and 4.9 times higher hepatic concentrations of Cd compared to controls and to eels from the Cd_low condition, respectively (Table 2). Unexpectedly, eels exposed to PCB_low condition had 2.5 and 1.6 times higher muscle concentrations of PCBs compared to eels exposed to PCB_high condition and controls respectively (Table 2).

Table 2: Median and first and third quartiles (Q1; Q2) of biological characteristics, muscle [PCB], liver [Cd] and biomarker responses of yellow *A. anguilla* exposed to different laboratory conditions. In each condition, N is the total number of eels at the end of the experiment (45 days). The prevalence of *A. crassus* is presented in % (percent of eels infested) within treatment and n in parenthesis is the number of eels infested by *A. crassus*. Different superscript uppercase letters indicate statistically significant differences among conditions (ANOVA, KW, $p \leq 0.05$ or Fisher's test, $p \leq 0,001$).

		Controls	Diet_low	Salinity_high	PCB_low	PCB_high	Cd_low	Cd_high
Biological characteristics	N	8	8	5	6	5	8	6
	Body length (cm)	38.0 (35.3 ; 39.8)	36.5 (35.8 ; 37.8)	35.3 (35.0 ; 36.9)	36.0 (35.5 ; 37.5)	38.0 (36.8 ; 39.0)	36.5 (34.8 ; 38.6)	37.3 (35.4 ; 38.2)
	Body mass (g)	65 (53 ; 83)	76 (65 ; 87)	51 (50 ; 66)	84 (68 ; 97)	67 (57 ; 73)	66 (57 ; 83)	66 (58 ; 82)
	Condition Factor (g per cm ³)	0.13 ab (0.11 ; 0.14)	0.15 ab (0.13 ; 0.17)	0.12 b (0.11 ; 0.14)	0.18 a (0.15 ; 0.19)	0.11 b (0.11 ; 0.14)	0.14 ab (0.13 ; 0.16)	0.14 ab (0.13 ; 0.14)
	HSI (%)	0.86 (0.81 ; 1.05)	0.81 (0.72 ; 0.98)	0.93 (0.86 ; 1.19)	1.08 (0.85 ; 1.35)	0.73 (0.69 ; 0.78)	0.77 (0.66 ; 1.29)	0.72 (0.62 ; 0.91)
	Muscle lipid content (%)	50 (25 ; 64)	ND	ND	58 (54 ; 61)	16 (2 ; 65)	ND	ND
	Prevalence of <i>A. crassus</i> (%)	9 b (1)	25 b (2)	0 b	0 b	60 a (3)	0 b	0 b
Contaminants	Liver [Cd] ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	0.10 b (0.04 ; 0.13)	ND	ND	ND	ND	0.07 b (0.05 ; 0.22)	0.46 a (0.24 ; 1.11)
	Muscle [PCBs] ($\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ dw)	114.1 b (79.7 ; 137.2)	ND	ND	184.8 a (104.1 ; 220.4)	74.55 b (50.86 ; 83.75)	ND	ND
Biomarkers	EROD ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ prot)	5.5 ab (5.1 ; 6.0)	6.6 ab (4.5 ; 11.7)	2.2 b (1.9 ; 4.4)	11.1 a (8.1 ; 12.9)	3.3 b (2.1 ; 6.1)	8.9 a (5.8 ; 12.5)	5.3 ab (4.4 ; 7.6)
	Density of MMC ($\text{number}\cdot(\text{mm}^2)^{-1}$)	2.1 ab (2 ; 3.5)	3 ab (2.2 ; 3.4)	2.1 ab (1.4 ; 3.1)	1.7 b (1.3 ; 2.2)	3.3 a (3.2 ; 3.9)	2.1 ab (1.7 ; 2.9)	2.4 ab (1.7 ; 2.8)
	Surface of MMC ($\text{mm}^2\cdot\text{MMC}^{-1}$)	0.007 (0.005 ; 0.010)	0.005 (0.003 ; 0.009)	0.004 (0.003 ; 0.006)	0.005 (0.003 ; 0.007)	0.005 (0.005 ; 0.007)	0.007 (0.003 ; 0.009)	0.009 (0.007 ; 0.011)
	Hemosiderin pigment (mean of grade)	5 (4 ; 5)	3 (2.2 ; 4)	3 (1.8 ; 3.5)	2.8 (1.4 ; 3.9)	3 (2 ; 4.5)	3 (2.5 ; 3.9)	4 (3.3 ; 4)
	Lipofuscin pigment (mean of grade)	1 (1 ; 1)	1.5 (1 ; 2.9)	1 (1 ; 1.3)	1 (1 ; 2.8)	1 (1 ; 2.8)	2.8 (1 ; 3)	1.5 (1 ; 3.4)

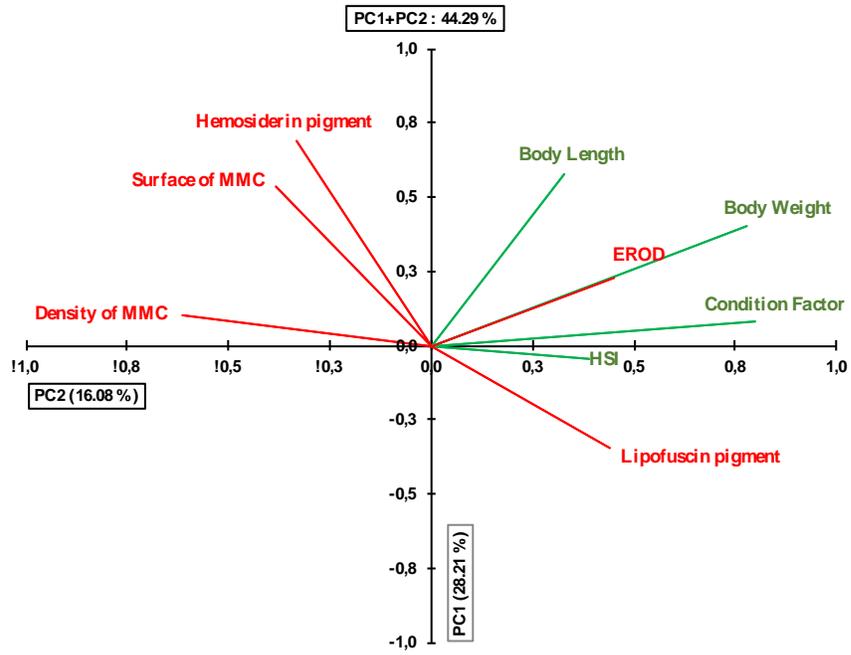
3.2 Influence of biological characteristics on biotransformation and histopathological biomarkers

The first 3 principal components of the PCA (PC1, PC2 and PC3) covered 58 % of the total variability of the overall data (Table 3). Using the first two principal components, the analysis allowed a separation of eels according to biological characteristics and biomarker responses (Fig. 1 A).

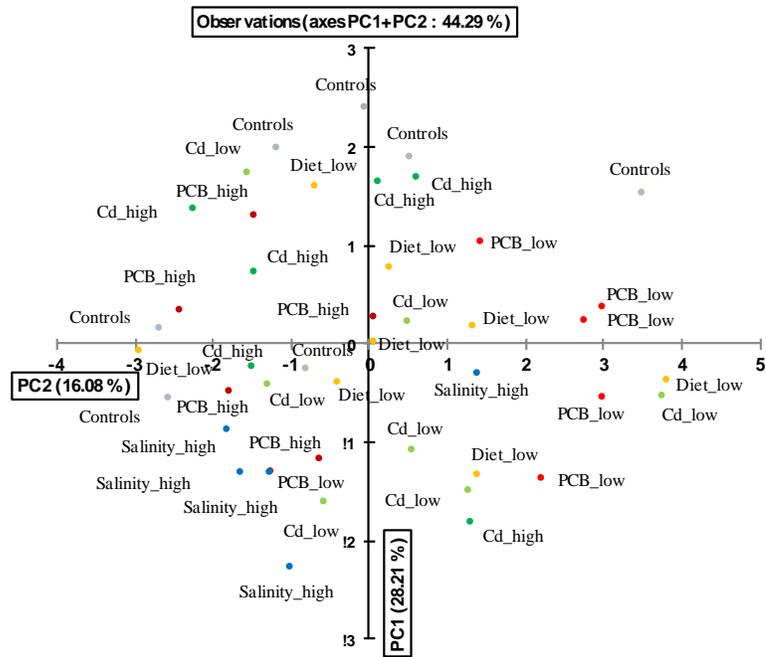
The first principal component (PC1) was mainly composed of condition factor and body mass (Table 3) and mainly contributed to separate eels exposed to PCB_low from those exposed to PCB_high and salinity_high (Fig. 1 A and B). Although the PC1 axis did not discriminate groups of eels from other conditions, the first result is consistent with the significantly higher condition factor observed in eels exposed to PCB_low compared to eels exposed to salinity_high and PCB_high and the absence of significant differences among conditions for the other biological characteristics (body length and HSI; Table 2). Surprisingly, condition factor and body mass of eels exposed to diet_low condition were identical to eels exposed to PCB_low while the opposite was suspected.

The second principal component (PC2) was mainly composed of hemosiderin pigment, body length and surface of MMC, respectively (Table 3) and no clear separation among eels from different conditions was observed (Fig. 1 B). It was corroborated by the absence of significant difference in body length, hemosiderin pigment and surface of MMC in eels among all treatments including controls (Table 2). Although biotransformation, density of MMC and lipofuscin pigment biomarker variables did not significantly contribute to PC1 and PC2 (Table 3), they were nevertheless projected between these axes (Fig. 1 A). EROD activity was weakly and positively correlated with condition factor and body mass (Fig. 1 A and Table S1). In addition, EROD activity and condition factor were positively and linearly related in eels from all conditions pooled (Fig. 2a). Unlike for EROD activity, the density of MMC was weakly and negatively correlated with the condition factor, body mass and HSI (Fig. 1 A and Table S1). Density of MMC and condition factor were negatively and linearly related in eels from all conditions pooled (Fig. 2b). Eels exposed to PCB_low condition had higher EROD activity and higher condition factor than eels exposed to salinity_high and

PCB_high conditions (Table 2). Eels exposed to PCB_high condition had higher densities of MMC compared to eels exposed to PCB_low condition (Table 2). EROD activity and spleen histopathological biomarkers did not differ significantly between controls and other conditions (Table 2). Surface of MMC and hemosiderin pigment were not correlated with biological characteristics but positively correlated together (Table S4). Finally, no significant difference in the deposition of lipofuscin pigments was observed among conditions (Table 2), however, lipofuscin pigment was weakly and positively correlated with condition factor and body mass (Table S4).



A)



B)

Figure 1. Principal component analysis (PCA) (n=44) illustrating: A) Relationships between patterns of biomarker response (red) and biological characteristics (green) in *A. rostrata* exposed to different laboratory treatments. Scores for the principal components 1 and 2 were 28.21% and 16.08%, respectively. B) Screening of eels from different laboratory treatments: Controls, Diet_low, Salinity_high, PCB_low, PCB_high, Cd_low, Cd_high. Treatments are identified for each individual. MMCs: Melano-Macrophage centers, HSI: hepatosomatic index.

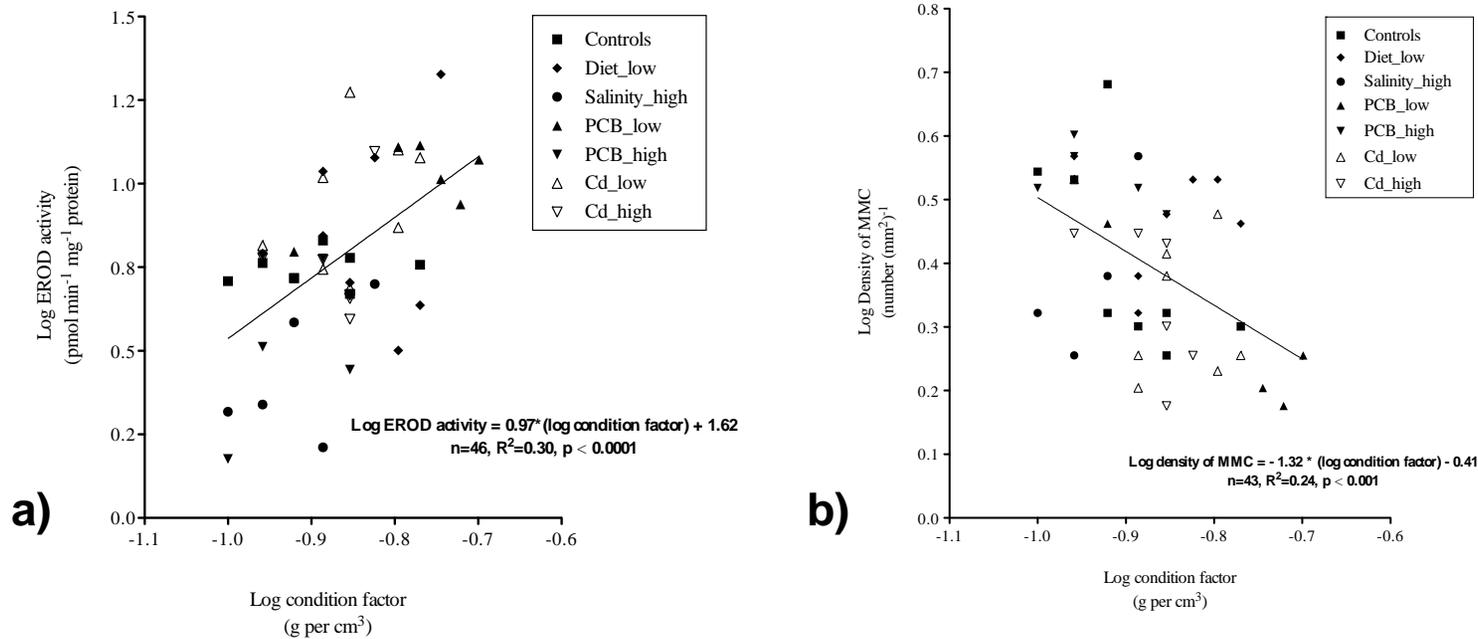


Figure 2. Relationship between log transformed data of condition factor and a) log EROD activity and spleen b) log density of MMC in *A. anguilla* exposed to different laboratory conditions. Each symbol represents a fish from a specific treatment (refer to the legend box). The solid line refers to the significant linear regression between the condition factor (X-axis) and the biomarker (Y-axis) with the following model formula of the regression is $Y = a * (X) + b$ where a is the slope and b the intercept. All data were log-transformed.

Table 3: Explained variance (%) for each significant principal component (PC) of the three different PCA followed by the significant variables in each PC. Significant biological or biomarker variables of yellow *A. anguilla* correlated with the principal components (PC1, PC2, PC3) in each PC are noted in bold.

	PC1	PC2	PC3
<u>Explained variance (%)</u>	28.21	16.08	13.90
<u>Variables</u>			
Body Length (cm)	4.17	23.27	17.49
Body Mass (g)	23.92	11.03	3.74
Condition Factor (g per cm ³)	25.28	0.42	0.04
HSI (%)	5.93	0.15	31.74
EROD (pmol min ⁻¹ . mg ⁻¹ . protein)	7.95	3.62	13.61
Density of MMC (number. mm ²)	14.91	0.68	5.44
Surface of MMC (MMC. mm ²)	5.80	19.88	0.55
Hemosiderin pigment (median of grades)	4.32	32.69	5.48
Lipofuscin pigment (median of grades)	7.72	8.27	21.92

3.3 Influence of lipid content and contaminants on biotransformation and histopathological biomarkers

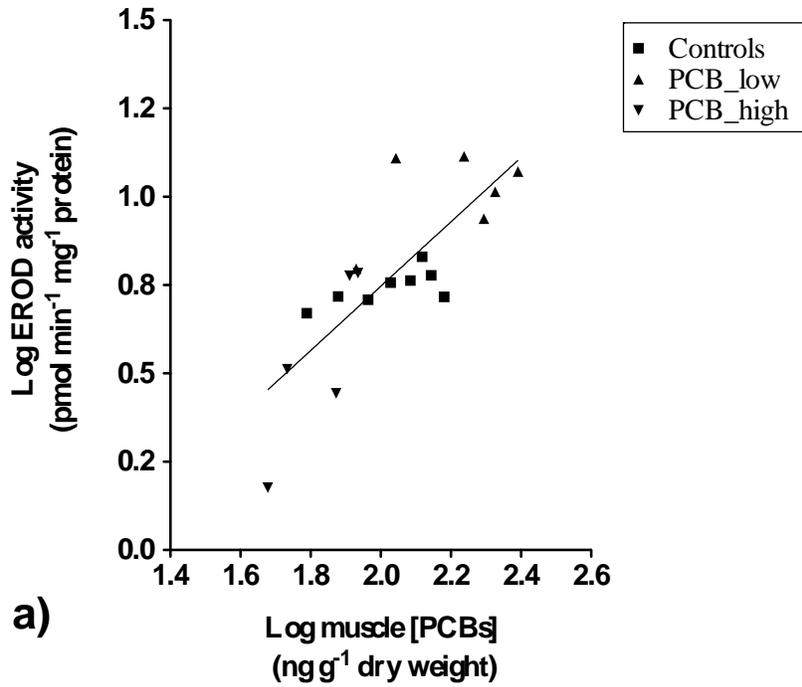
When combining control, PCB_high and PCB_low conditions, EROD activity increased strongly and linearly with increasing muscle PCB concentrations in eels exposed to PCB_high, PCB_low and controls (Fig. 3 a). Highest levels of EROD activity (ranged from 10 to 13 pmol.min⁻¹.mg protein⁻¹) were observed in eels exposed to the PCB_low condition with PCBs concentration ranged from 85 to 250 ng. g⁻¹ dw.

Conversely, spleen density of MMC was linearly and negatively related to muscle PCB concentrations (Fig 3. b)). At concentrations ranging from 50 to 100 ng. g⁻¹ dw, spleen density of MMC ranged from 2.6 to 4.8 MMC. (mm²)⁻¹ and these values were mostly found in controls and PCB_high eels. Eels exposed to PCB_low had lower densities of MMC from 0.8 to 2 MMC. (mm²)⁻¹ at muscle PCB concentrations ranging from 100 to 250 ng. g⁻¹ dw. Surface of MMC in controls and in eels exposed to Cd_low increased with liver Cd concentrations ranging from 0 to 0.5 µg. g⁻¹ dw to reach a plateau from the concentration of 0.5 µg. g⁻¹ dw (Fig 3 c)).

No significant relationships between lipid content and biomarkers responses were observed in eels exposed to both PCB conditions and controls. Moreover, no significant

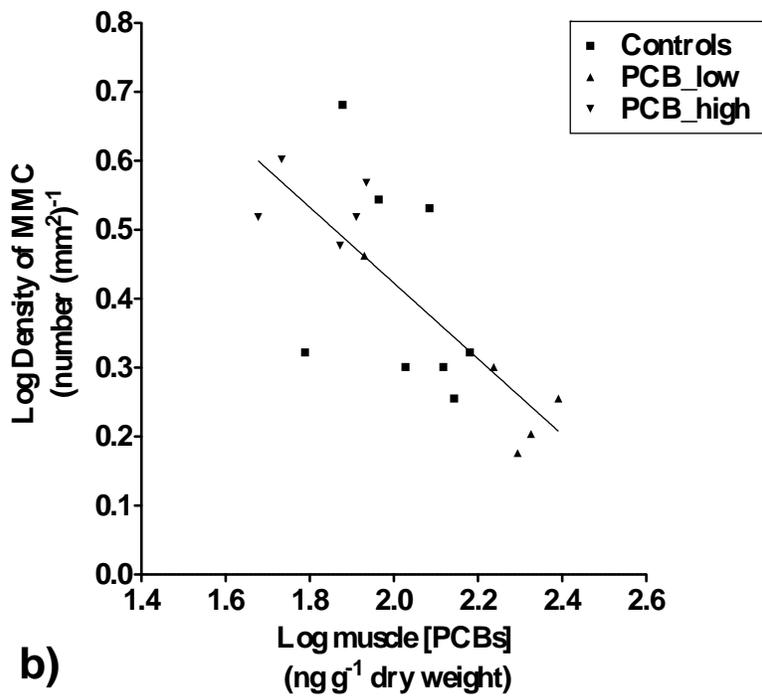
relationships were observed between liver Cd concentration and EROD activity or spleen density of MMC. Finally, spleen surface of MMC was not significantly correlated with muscle PCBs. All results are presented in supplemental information (Table S2).

$\text{Log EROD activity} = 0.55 * (\text{log muscle [PCBs]} - 1.80)$
 $n=19, R^2=0.63, p < 0.0001$



a)

$\text{Log Density of MMCs} = -0.81 * (\text{log muscle [PCBs]} + 1.52)$
 $n=18, R^2=0.56, p < 0.001$



b)

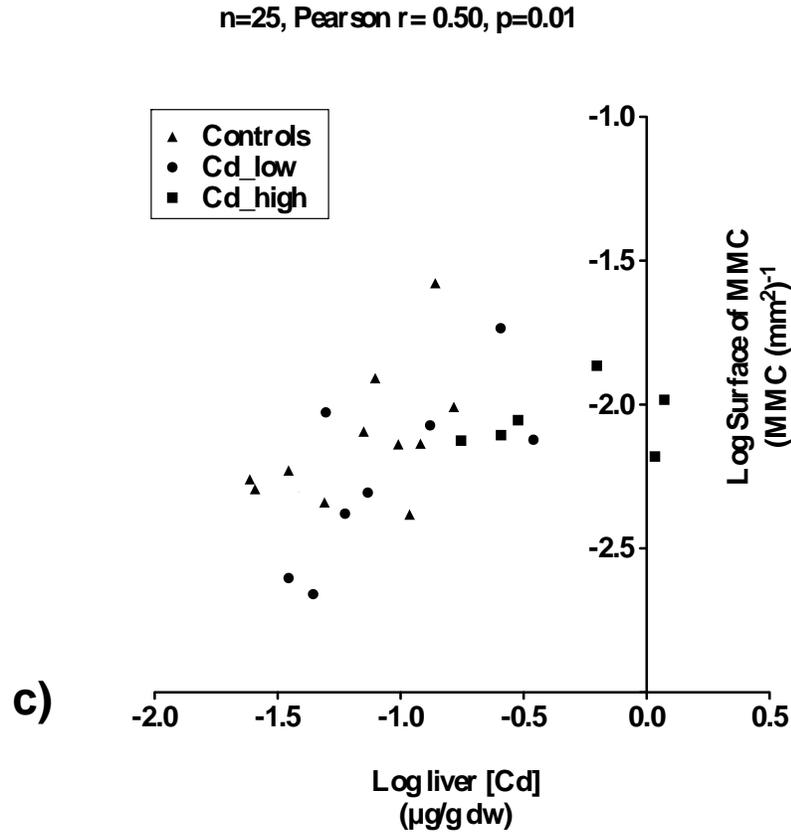


Figure 3. Response of a) EROD activity, b) density of MMCs and c) surface of MMCs after exposure to different concentrations of PCBs (for a) and b)) and Cd (for c)) after 45 days of exposure of yellow *A. anguilla*. Each symbol represents a fish from a specific treatment or controls (refer to legend boxes). For figures a) and b), the solid line refers to the significant linear regression between the contaminant (X-axis) and the biomarker (Y-axis) with the following model formula of the regression is $Y = a \cdot (X) + b$ where a is the slope and b the intercept. All data were log-transformed.

4- Discussion

Controls

After 45 days of exposure, neither the PCA nor conventional statistical approaches identified major significant differences in biomarker responses between controls and eels exposed to other conditions. In our study, eels from all treatments including controls had similar biological characteristics (length, body mass and organosomatic indices for liver (HSI)), were from the same un-contaminated site and were acclimated under identical conditions suggesting that other factors may have influenced biomarker responses in controls. A significant mortality was observed in control, diet_low and PCB_high conditions. The cause of mortality is unknown but possibly due to infection by pathogens. Sublethal effects associated with mortality may have increased the variability of biomarker responses among conditions. Moreover, in Baillon et al. (2016a; 2016b), significant differences in food intake rate (%) were observed between controls and other conditions. Indeed, controls had significantly higher food intake rate (71.90 %) compared to eels exposed to Salinity_high (56.84%), PCB_high (32.15 %), Diet_low (27.80 %) conditions and significant lower food intake rate compared to eels exposed to PCB_low (94.64%). As described by Baillon et al. (2016b), variation in food intake rate (%) had resulted in differences in levels of PCB concentrations in eels exposed to different PCB conditions and controls. Eels exposed to PCB_low condition had significantly higher muscles PCB concentrations compared to eel exposed to PCB_high and controls. In addition, no significant difference in PCB concentrations was observed between controls and PCB_high condition. Considering all these observations, we can expect that the absence of significant differences in biomarker responses between controls and other conditions could be linked to the high variability in food intake rate observed among conditions.

Biotransformation biomarker responses

Given some limitations related to the experimental design, this study is the first to establish a relationship between measured tissue concentration of PCB from pyralene solution in eel muscles and hepatic EROD activity while other studies have demonstrated relationships between EROD activity and the injected dose of other

solutions of PCB namely Arochlor 1254. A significant dose-response relationship between hepatic EROD activity and muscle PCBs concentration have been highlighted and had confirmed that EROD activity increased in dose dependent manner to PCB contaminants contained in Pyralene solutions. In agreement with these observation, previous laboratory studies (Hewitt et al., 1998; Regoli et al., 2003) have reported dose-response relationships between EROD activity in *A. anguilla* and PCB concentrations. In Regoli et al. (2003), eels injected intraperitoneally with a solution of PCBs namely Arochlor 1254 at 0, 0.1, 1, 10 and 50 mg.kg⁻¹ of body weight during 7 days had increased hepatic EROD activity compared to controls. In Hewitt et al. (1998), PCB 77 and 169 injected intraperitoneally at 0.1, 1, 5, 10, 50, 100 mg. kg⁻¹ of body weight induced EROD activity compared to control after 21 days. Unfortunately, in their work and in other laboratory studies in *A. anguilla*, no dose responses to Pyralene solution on EROD activity have been already carried out. Further studies would be useful to validate our results and explore possible relationships among induction of EROD activity in response to low dose exposure of Pyralene solution in *A. anguilla*.

No salinity or diet restriction conditions have been demonstrated to have an effect on hepatic EROD activity in *A. anguilla*. Concerning eels exposed to high salinity, this result is consistent with the literature that reported no significant effect of salinity on EROD activity in fish (Hylland et al., 1998; Amutha and Subramanian, 2010; Fonseca et al., 2011). Conversely, for eels exposed to Diet_low condition, it was expected an decrease in EROD activity. In fish, long-term studies (> 3 weeks) have shown that reduced food intake involves a decrease in condition factor and in EROD activity (Andersson, 1985; van der Oost et al., 1996). Another consequence related to reduced food intake could be an increase in hepatic concentrations of persistent lipophilic contaminants after the mobilization of the lipid reserves during fasting and consequently an increase in the activity of EROD (Couillard et al.2004). However, in our study, yellow eels were from the uncontaminated site Certes and are supposed to be clean, so they were unlikely mobilizing sufficient concentrations of contaminants to induce EROD during fasting. High variations in food intake rate observed among experimental conditions in our study could explain the absence of EROD responses to Diet_low condition.

Finally, liver Cd accumulation did not influence EROD activity. The absence of Cd effects on EROD activity is consistent with the study of Lemaire-Gony and Lemaire (1992) which reported no significant induction of EROD in *A. anguilla* exposed to 5 µg. L-1 of Cd during 24 days. Whyte et al. (2008) mentioned that this class of contaminant did not interact directly with EROD activity.

Histopathological biomarker responses

In this work, the density of MMC decreased significantly as muscle PCB concentrations increased and was negatively correlated with EROD activity. In addition, the density of MMC was negatively related to morphological characteristics such as body mass, condition factor and HSI. Conversely, as suggested by the literature, the density of MMC would be expected to increase in response to EROD induction and exposure to PCBs (Agius, 1985; Wolke, 1992; Couillard and Hodson, 1996; Agius and Roberts, 2003). The negative correlation in our study between the density of MMC and eel's condition factor in association with the low food intake rate observed in eels exposed to PCB_high and Diet_low suggests that these eels were weakened by a lack of food which consequently could induce the immune system leading to the increase of splenic MMC. An increased density of spleen MMC has been observed in food deprived or fish in low condition factor in various organs of different species such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), tilapia (*Tilapia*), olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) (Agius and Roberts, 1981; Flaño et al., 1996; Hur et al., 2006; Seol et al., 2009). During starvation, essential processes in fish are maintained at the expense of accumulated energy reserves, resulting in the progressive depletion and wastage of body tissues. These studies reported that the increased density of MMC is mainly due to catabolic tissue degradation. However, further studies are needed to establish the possibility that others factors such as water quality, temperature, age or diseases may play a role in increasing MMC.

Changes in number of MMC could be also induced by others factors such as parasitism. Parasitism could be an additional reason for the high number of spleen MMC observed in fish exposed to PCB_high and Diet_low conditions compared to eels with no presence of *A. crassus*. The highest prevalence of *A. crassus* (60%) was observed in eels exposed to PCB_high. Moreover, these eels had higher level of density of MMC

compared to eels exposed to PCB_{low}. Previous laboratory studies have reported that infested eels exhibited loss of appetite, thinning and abnormal behaviour such as hanging near the surface (Liewes and Schaminee-Main, 1987; Van Banning et al., 1990). Thus, we hypothesize that the presence of *A. crassus* could be an additional factor combined with low food intake rate and low condition factor affecting the density of CMM in spleen. Macrophages execute a multiplicity of function and one of them is a defensive response against parasitic invasions (Wolke, 1992). The presence of *A. crassus* is pathogenic and elicits a chronic inflammatory response in eels which results in the development of melano-macrophage centers (Wolke, 1992; Agius and Roberts, 2003). Kirk (2003) have reported an increase of inflammatory responses in infested European eels associated with an intense production of splenic MMC. Therefore, studies of fish nutrition in relation to parasitism and histological changes in MMC are required to improve our understanding of the responses of wild and cultured fish to feeding conditions.

The surface of MMC was positively correlated with liver Cd concentration and deposition of spleen hemosiderin pigment. For the relation between surface of MMC and liver Cd concentration, the dose-response curve exhibited a linear relationship followed by a plateau suggesting a possible effect of Cd on surface of MMC. This result was supported by Suresh (2009) who reported a significantly higher surface of splenic MMC after a 120-hour exposure to the 120-hour median lethal concentration of CdCl₂ estimated (20.93 mg. L⁻¹) in *Tilapia mossambica*. In their work, the concentration of CdCl₂ was strongly higher than those used in our experiment. In contrast, Lemaire-Gony et al. (1995) reported that Cd exposure (40 µg/L, 10 times higher concentration compared to our study) for 15 days had no effect on spleen MMCs in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Giari et al. (2007) reported that the surface of spleen MMC was less influenced than the density of MMC in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to different Cd concentrations. No histopathological lesions were observed in any internal organ of the bluegill (*Lepomis macrochirus*) during 163-day chronic exposure to different concentration of Cd (0.3, 1, 3.5, 12 mg Cd/L (Versteeg and Giesy, 1986). Overall, the effects of Cd on the surface of splenic MMC have not been clearly demonstrated in fish. Authors did not report the tissue concentrations of Cd in

fish but only relationships between water concentration of Cd and responses of MMC. In the absence of relationships between tissue concentrations of Cd measured in fish and biomarker responses from other studies, comparison with our study remains difficult. Therefore, our study highlights the need for further studies to verify the relationships between tissue concentrations of Cd and the surface of MMC in eels exposed under controlled conditions.

In our study, a significant correlation was observed between hemosiderin pigment and surface of MMC. Hemosiderin is composed of ferric iron and is derived from the catabolism of haemoglobin from old erythrocytes (Wolke, 1992). In fish, the deposition of hemosiderin was observed to be largely restricted to spleen MMCs and some studies reported in both healthy and diseased fish that splenic MMC are involved in the storage of hemosiderin (see Agius, 1985 for a review). Laboratory studies have highlighted that sub-lethal Cd toxicity produces haematological disorders causing anaemia in fish leading to lysis of erythrocytes (Ruparelia et al., 1990; Remyła et al., 2008). In the absence of correlation between Cd concentration and spleen hemosiderin pigment, our results suggested an indirect mechanism of Cd toxicity on the accumulation of spleen hemosiderin pigment. To confirm this latter hypothesis, further biochemical and haematological studies are needed to explore the pathogenesis of this response.

5. Conclusions

This study is the first to establish relationships between muscle concentration of PCB from pyralene solution and hepatic EROD activity and between liver concentration of Cd and surface of splenic MMC in yellow European eels exposed to a laboratory experiment.

Hepatic EROD activity measured in European eels was induced by exposure to PCBs contained in a Pyralene solution. Although only PCB-118 in this commercial solution is a dioxin-like PCB, the induction of EROD activity by dietary exposure to this mixture suggests that is a sensitive tool to detect exposure to the most toxic PCBs present in this solution. No significant effects of Cd, salinity and diet restriction were detected on EROD activity. However, the positive relationship between condition factor and EROD activity in association with a higher food intake rate in eels with high condition factors suggest that the nutritional status is important for microsomal enzyme systems to

function properly. Conversely, significant lower condition factor and lower food intake rate in association with high prevalence of *A. crassus* could be explain the increased density of MMC observed in eels exposed to PCB_high condition and suggest an induction of the immune system. Finally, higher surface of MMC was directly associated with higher liver Cd concentrations and we hypothesize that higher hemosiderin deposition in MMC was indirectly related to Cd toxicity. Overall, our results provide a database to better target and prioritize future studies on the impacts of condition factor, food intake rate associated with contaminant exposure on eel's biomarker responses.

6. Acknowledgments

We wish to acknowledge the contribution of Lucie Baillon, a former PhD student from the university of Bordeaux (France) who carried out the overall laboratory experimentation and collected samples required for this study. We are also grateful to A. Caron, P. Pannetier and H. Budzinski for contaminant concentration measurements and to B. Légaré for his expert technical work on EROD assay. This work was supported by the joint ANR Blanc (ANR-10-INTB-1704)-NSERC SGP grant IMMORTEEL and by the Aquitaine region (GAGILAU and MICANG projects). The biochemical and histopathological analyses of Géraldine Patey were in part supported by Fisheries and Oceans Canada.

7. References

- Agius, C., 1985. The melano-macrophage centres of fish: a review. *Fish immunology*, 85-105.
- Agius, C., Roberts, R., 1981. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. *Journal of Fish Biology* 19, 161-169.
- Agius, C., Roberts, R., 2003. Melano-macrophage centres and their role in fish pathology. *Journal of Fish Diseases* 26, 499-509.
- Amutha, C., Subramanian, P., 2010. Effect of temperature, salinity, pH and naphthalene on ethoxyresorufin-O-deethylase activity of *Oreochromis mossambicus*. *Toxicological & Environmental Chemistry* 92, 127-135.

- Andersson, T., 1985. Regulation of xenobiotic metabolism in rainbow trout liver: effects of induction ambient temperature and starvation. Ph.D.thesis, University of Göteborg, Göteborg, Sweden.
- Au, D., 2004. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Marine Pollution Bulletin* 48, 817-834.
- Baillon, L., Pierron, F., Coudret, R., Normandeau, E., Caron, A., Peluhet, L., Labadie, P., Budzinski, H., Durrieu, G., Sarraco, J., 2015. Transcriptome profile analysis reveals specific signatures of pollutants in Atlantic eels. *Ecotoxicology* 24, 71-84.
- Baillon, L., Pierron, F., Osés, J., Pannetier, P., Normandeau, E., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., Lambert, P., Bernatchez, L., 2016a. Detecting the exposure to Cd and PCBs by means of a non-invasive transcriptomic approach in laboratory and wild contaminated European eels (*Anguilla anguilla*). *Environmental Science and Pollution Research* 23, 5431-5441.
- Baillon, L., Pierron, F., Pannetier, P., Normandeau, E., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., Lambert, P., Bernatchez, L., Baudrimont, M., 2016b. Gene transcription profiling in wild and laboratory-exposed eels: Effect of captivity and in situ chronic exposure to pollution. *Science of The Total Environment* 571, 92-102.
- Belpaire, C., Goemans, G., 2007. Eels: contaminant cocktails pinpointing environmental contamination. *ICES Journal of Marine Science: Journal du Conseil* 64, 1423-1436.
- Belpaire, C.G.J., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., Hagel, P., De Boer, J., 2009. Decreasing eel stocks: survival of the fittest? *Ecology of Freshwater Fish* 18, 197-214.
- Chaalali, A., Chevillot, X., Beaugrand, G., David, V., Luczak, C., Boët, P., Sottolichio, A., Sautour, B., 2013. Changes in the distribution of copepods in the Gironde estuary: A warming and marinisation consequence? *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 134, 150-161.
- Conover, W.J., Iman, R.L., 1981. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* 35, 124-129.
- Couillard, C.M., Hodson, P., Castonguay, M., 1997. Correlations between pathological changes and chemical contamination in American eels, *Anguilla rostrata*, from the St. Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 1916-1927.

- Couillard, C.M., Hodson, P.V., 1996. Pigmented macrophage aggregates: A toxic response in fish exposed to bleached-kraft mill effluent? *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1844-1854.
- Couillard, C.M., Wirgin, I.I., Lebeuf, M., Légaré, M., 2004. Reduction of cytochrome P4501A with age in Atlantic tomcod from the St. Lawrence Estuary, Canada: relationship with emaciation and possible effect of contamination. *Aquatic Toxicology* 68, 233– 247
- Couillard, C.M., Macdonald, R.W., Courtenay, S.C., Palace, V.P. (2008) Chemical-environment interactions affecting the risk of impacts on aquatic organisms: a review with a Canadian perspective - interactions affecting exposure. *Environmental Reviews*, 16, 1-17.
- FAO/ICES, 2009. FAO European Inland Fisheries Advisory Commission; International Council for the Exploration of the Sea. Report of the 2008 session of the Joint EIFAC/ICES Working Group on Eels. EIFAC Occasional paper (No. 43): 192pp.
- Flaño, E., López-Fierro, P., Razquin, B., Kaattari, S., Villena, A., 1996. Histopathology of the renal and splenic haemopoietic tissues of coho salmon *Oncorhynchus kisutch* experimentally infected with *Renibacterium salmoninarum*. *Diseases of Aquatic Organisms* 24, 107-115.
- Fonseca, V., Franca, S., Vasconcelos, R., Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Bebianno, M., Cabral, H., 2011. Short-term variability of multiple biomarker response in fish from estuaries: Influence of environmental dynamics. *Marine Environmental Research* 72, 172-178.
- Fournie, J.W., Summers, J.K., Courtney, L.A., Engle, V.D., Blazer, V.S., 2001. Utility of splenic macrophage aggregates as an indicator of fish exposure to degraded environments. *Journal of Aquatic Animal Health* 13, 105-116.
- Fragoso, N.M., Parrott, J.L., Hahn, M.E., Hodson, P.V., 1998. Chronic retene exposure causes sustained induction of CYP1A activity and protein in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 17, 2347-2353.
- Geeraerts, C., Belpaire, C., 2010. The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology* 19, 239-266.

- Giari, L., Manera, M., Simoni, E., Dezfuli, B., 2007. Cellular alterations in different organs of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) exposed to cadmium. *Chemosphere* 67, 1171-1181.
- Girard, P., Elie, P., 2007. Manuel d'identification des principales lesions anatomomorphologiques et des principaux parasites externes des anguilles. CEMAGREF/Association «Santé Poissons Sauvages». 67p.
- Haro, A., Richkus, W., Whalen, K., Hoar, A., Busch, W.-D., Lary, S., Brush, T., Dixon, D., 2000. Population decline of the American eel: implications for research and management. *Fisheries* 25, 7-16.
- Hewitt, S., Fenet, H., Casellas, C., 1998. Induction of EROD activity in European eel (*Anguilla anguilla*) by different polychlorobiphenyls (PCBs). *Water Science and Technology* 38, 245-252.
- Hylland, K., Nissen-Lie, T., Christensen, P., Sandvik, M., 1998. Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L. *Marine Environmental Research* 46, 51-55.
- Hur, J.W., Woo, S.R., Jo, J.H., Park, I.S., 2006. Effects of starvation on kidney melanomacrophage centre in olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel). *Aquaculture* 37, 821-825.
- Kirk, R., 2003. The impact of *Anguillicola crassus* on European eels. *Fisheries Management and Ecology* 10, 385-394.
- Kirk, R., Kennedy, C., Lewis, J., 2000. Effect of salinity on hatching, survival and infectivity of *Anguillicola crassus* (Nematoda: *Dracunculoidea*) larvae. *Diseases of Aquatic Organisms* 40, 211-218.
- Lemaire-Gony, S., Lemaire, P., 1992. Interactive effects of cadmium and benzo (a) pyrene on cellular structure and biotransformation enzymes of the liver of the European eel *Anguilla anguilla*. *Aquatic Toxicology* 22, 145-159.
- Lemaire-Gony, S., Lemaire, P., Pulsford, A.L., 1995. Effects of cadmium and benzo (a) pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology* 31, 297-313.

- Liewes, E., Schaminee-Main, S., 1987. Onderzoek naar de effecten van de parasiet *Anguillicola crassus* op de ontwikkeling van de paling (*Anguilla anguilla*) in een zout water palingmesterij. Report from 'TEXVIS BV', Den Burg, Texel, Netherlands.
- Loizeau, V., Menesguen, A., 1993. A steady-state model of PCB accumulation in dab food web. *Oceanologica Acta*, 16, 633-640.
- Luna, L.G., 1968. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. (3 rd Ed. MacGraw-Hill, New-York, 1960)
- Margolis, L., Esch, G., Holmes, J., Kuris, A., Schad, G., 1982. The use of ecological terms in parasitology (report of an *ad hoc* committee of the American Society of Parasitologists). *The Journal of Parasitology* 68, 131-133.
- Pannetier, P., Caron, A., Campbell, P.G.C., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2016. A comparison of metal concentrations in the tissues of yellow American eel (*Anguilla rostrata*) and European eel (*Anguilla anguilla*). *Science of Total Environment* 569-570, 1435-1445.
- Pacheco, M., Santos, M.A., 2002. Biotransformation, genotoxic, and histopathological effects of environmental contaminants in European eel (*Anguilla anguilla* L.) *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 331-347.
- Patey, G., Couillard, C.M., Drouineau, H., Verreault, G., Pierron, F., Lambert, P., Baudrimont, M., Couture, P., 2017a (in press). Early back-calculated size-at-age of Atlantic yellow eels sampled along ecological gradients in the Gironde and St. Lawrence hydrographical systems. *Canadian Journal Fisheries and Aquatic Sciences*. DOI: 10.1139/cjfas-2017-0025
- Patey, G., Couillard, C.M., Pierron, F., Baudrimont, M., Couture, P., 2017b (in press). Biotransformation, antioxidant and histopathological biomarker responses to contaminants in European and American Yellow Eels from the Gironde and St. Lawrence Estuaries. *Chemosphere* (MS# CHEM47151R1).
- Pasquaud, S., Béguer, M., Larsen, M.H., Chaalali, A., Cabral, H., Lobry, J., 2012. Increase of marine juvenile fish abundances in the middle Gironde estuary related to warmer and more saline waters, due to global changes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 104, 46-53.

- Pierron, F., Baudrimont, M., Bossy, A., Bourdineaud, J.-P., Brèthes, D., Elie, P., Massabuau, J.-C., 2007. Impairment of lipid storage by cadmium in the European eel (*Anguilla anguilla*). *Aquatic Toxicology* 81, 304-311.
- Regoli, F., Winston, G.W., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., 2003. Integrating enzymatic responses to organic chemical exposure with total oxyradical absorbing capacity and DNA damage in the European eel *Anguilla anguilla*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 2120-2129.
- Reist, J.D., Wrona, F.J., Prowse, T.D., Power, M., Dempson, J.B., Beamish, R.J., King, J.R., Carmichael, T.J., Sawatzky, C.D., 2006a. General Effects of Climate Change on Arctic Fishes and Fish Populations. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 35, 370-380.
- Reist, J.D., Wrona, F.J., Prowse, T.D., Power, M., Dempson, J.B., King, J.R., Beamish, R.J., 2006b. An overview of effects of climate change on selected Arctic freshwater and anadromous fishes. *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 35, 381-387.
- Remyla, S.R., Ramesh, M., Sajwan, K.S., Kumar, K.S., 2008. Influence of zinc on cadmium induced haematological and biochemical responses in a freshwater teleost fish *Catla catla*. *Fish Physiology and Biochemistry* 34, 169-174.
- Ruparelia, S., Verma, Y., Saiyed, S., Rawal, U., 1990. Effect of cadmium on blood of tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peters), during prolonged exposure. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 45, 305-312.
- Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R.W., 2007. Interactions between climate change and contaminants. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1845-1856.
- Seol, D.W., Hur, J.W., Kim, D.S., Nam, Y.K., Bang, I.C., Park, I.S., 2009. Effect of starvation on kidney melano-macrophage centre in sub-adult rock bream, *Oplegnathus fasciatus*. *Journal of Fish Science and Technology* 12, 49-53.
- Suresh, N., 2009. Effect of cadmium chloride on liver, spleen and kidney melano macrophage centres in *Tilapia mossambica*. *Journal of Environmental Biology* 30, 505-508.
- Tapie, N., Le Menach, K., Pasquaud, S., Elie, P., Devier, M.H., Budzinski, H., 2011. PBDE and PCB contamination of eels from the Gironde estuary: from glass eels to silver eels. *Chemosphere* 83, 175-185.

- Van Banning, P., Haenen, O., Perkins, F., Cheng, T., 1990. Effects of the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* in wild and farmed eel, *Anguilla anguilla*. Pathology in Marine Science, 317-330.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. Environmental Toxicology and Pharmacology 13, 57-149.
- Van der Oost, R., Goksøyr, A., Celander, M., Heida, H., Vermeulen, N.P., 1996. Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*) II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. Aquatic Toxicology 36, 189-222.
- Versteeg, D.J., Giesy, J.P., 1986. The histological and biochemical effects of cadmium exposure in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). Ecotoxicology and Environmental Safety 11, 31-43.
- Whyte, J.J., Jung, R., Schmitt, C., Tillitt, D., 2008. Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in fish as a biomarker of chemical exposure. Critical Reviews in Toxicology 30, 347-570
- Wirth, T., Bernatchez, L., 2003. Decline of North Atlantic eels: a fatal synergy? Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences 270, 681-688.
- Wolke, R., 1992. Piscine macrophage aggregates: a review. Annual Review of Fish Diseases 2, 91-108.

Supplemental material

Table S1: Kendall's correlation matrix (N=46) of biological variables used in the principal component analysis for *A. anguilla* exposed to different conditions during 45 days. Significant correlations are indicated in bold and the significance level of the Kendall's correlations was fixed at 0.05. HSI: hepato-somatic index; MMC: splenic melanomacrophage centers.

Variables	Body length	Body weight	Condition factor	HSI	EROD activity	Density of MMC	Surface of MMC	Hemosiderin
Body weight (cm)	0.462	1						
Condition factor (g per cm ³)	0.086	0.635	1					
HSI (%)	-0.039	0.184	0.265	1				
EROD activity (pmol min ⁻¹ .mg ⁻¹ .protein)	0.021	0.282	0.300	0.156	1			
Density of MMC (number.mm ²)	-0.034	-0.324	-0.408	-0.242	-0.254	1		
Surface of MMC (MMC.mm ²)	0.037	-0.098	-0.130	-0.096	-0.113	0.167	1	
Hemosiderin (median of grades)	0.075	-0.080	-0.170	-0.003	0.120	0.174	0.368	1
Lipofuscin (median of grades)	0.040	0.227	0.301	-0.120	0.023	-0.156	-0.218	-0.316

Table S2: Combined results of Kendall's correlation matrix. The first correlation matrix (N=19) was composed of biomarker variables, muscles lipid content and sum of [7 PCBs] (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) and the second correlation matrix (N=22) was composed of biomarker variables and liver [Cd]. Significant correlations ($p \leq 0.05$) are indicated in bold. MMC: splenic melanomacrophage centers; Cd = Cadmium; PCB = polychlorinated biphenyls.

Variables	EROD activity	Density of MMC	Surface of MMC	Hemosiderin	Lipofuscin
Lipid content (%)	0.041	-0.185	-0.251	-0.349	0.104
Sum of [PCBs] (ng.g ⁻¹ dw)	0.602	-0.506	-0.064	0.090	0.052
Liver [Cd] (µg.g ⁻¹ dw)	-0.247	0.111	0.403	0.141	-0.083

11. ANNEXES

ANNEXE I-1 Les effets des contaminants, des facteurs biologiques et environnementaux sur les réponses de biomarqueurs de biotransformation et des capacités antioxydantes chez l'anguille.

Légende :

- 0 : aucun changement de réponse ou pas de réponse significative
- + : induction ou augmentation de la réponse du biomarqueur
- : inhibition ou diminution de la réponse
- +/- : induction et inhibition de la réponse ont été observé

Contaminant	EROD		CAT		SOD	
	Action	Références (Réf.)	Action	Réf.	Action	Réf.
HAP	+ β -Naphthoflavone (β -NF)	Fenet et al. (1996) (Laboratoire et terrain)	+ NAP + Phénanthrène + Fluoranthène + Pyrène	Buet et al. (2006) (Terrain)	- Acénaphthylène - Fluoranthène	Buet et al. (2006) (Terrain)
	+ Fluoranthène, +Dibenzo(ah)anthracene	Buet et al. (2006) (Terrain)	+ β -NF - β -NF combiné au chrome(Cr)	Ahmad et al. (2006) (Laboratoire)	0 Métabolites HAP	Van der Oost (1998) (Terrain)
	+ Acide déhydroabiétique (DAH)	Pacheco et Santos, (2001)(Laboratoire)	+ Métabolites HAP	Ahmad et al. (2004) (Terrain)		
	+ β -NF	Pacheco et Santos, (2005)(Laboratoire)	0 Métabolites HAP	Van der Oost (1998) (Terrain)		
	+ Benzo(a)pyrène combiné au Cd	Lemaire-Gony et Lemaire, (1992) (Laboratoire)	- 4,6-dinitro-ortho-cresol (DNOC)	Braunbeck et Völkl (1991) (Laboratoire)		

Contaminant	EROD		CAT		SOD		
	Suite	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
HAP	+ Benzo(a)pyrène + β-NF	Regoli et al. (2003) (Laboratoire)	- Phénanthrène - Anthracène - Fluorantène - Pyrène - Benzo(a)anthracène - Chrysène - Benzo(b,k)fluoranthrène - Benzo(a,e)pyrène	Gravato et al. (2010) (Terrain)			
	+ Naphthalène (NAP) +β-NF	Teles et al. (2002) (Laboratoire)	- β-NF combiné au Cu	Gravato et al. (2006) (Laboratoire)			
	+1-hydroxypyrene (1-OHPyr) +1-hydroxyphenanthrene (1-OHPhen)	Kammann et al. (2013) (Laboratoire) Kamman et al (2014) (Terrain)					
	+ Benzo(a)pyrène + β-Naphthoflavone (β-NF)	Schlezinger et Stegerman (2000)					
PCDD/PCDF	+ PCDD et PCDF	Revue de littérature : Van der Oost et al. (2003) Whyte et al. (2000)	+/- PCDD et PCDF	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)	+/- PCDD et PCDF	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)	
	+ 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo p-dioxin (TCDD)	Regoli et al. (2003) (Laboratoire)	0 PCDD et PCDF	Van der Oost et al. (1996) (Terrain)	0 PCDD et PCDF	Van der Oost et al. (1996) (Terrain)	

EROD			CAT		SOD	
Suite	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
PCDD/PCDF	+ 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo <i>p</i> -dioxin (TCDD)	Hewitt et al. (1998) (Laboratoire) Bonacci et al. (2003) (Laboratoire) Hodson et al. (1994) (Terrain)	0 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo <i>p</i> -dioxin (TCDD)	Regoli et al. (2003)(Laboratoire)	0 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo <i>p</i> -dioxin (TCDD)	Regoli et al. (2003)(Laboratoire)
Effluents d'usine de pâtes et papiers (BKPME)	+ Acide abiétique (contenu dans les BKPME)	Pacheco et Santos (1999) (Laboratoire)	+/- BKPME	Santos et al. (2004) (Terrain)		
	+/- BKPME	Maria et al. (2003) (Laboratoire)				
PCB	+ PCB avec une structure planaire en particulier le PCB 77, 126 et 169 (par exemple : le mélange de type Aroclors 1254)	Revue de littérature : Geeraerts and Belpaire (2009) Van der Oost (1996) (Terrain) Whyte et al. (2000)	+/- PCBs	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)	+/- PCBs	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)
	+ 23 PCBs congénères	Buet et al. (2006) (Terrain)	+ 23 PCBs congénères	Buet et al. (2006) (Terrain)	+ 23 PCBs congénères	Buet et al. (2006) (Terrain)
	0 43 PCBs congénères	Corsi et al. (2005) (Terrain)	La catalase est dépendante de l'accumulation de PCBs et peut répondre par une hyperactivité.			
	+ Diesel et essence soluble dans l'eau	Pacheco et Santos (2001) (Terrain)				
	+ tétrachlorobiphényl	Schlezinger et Stegerman (2000) (Laboratoire)				

Suite	EROD		CAT		SOD	
	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
	+ PCB 77	Marohn et al. (2008) (Laboratoire)				
	+ PCB 77	Hewitt et al. 1998 (Laboratoire)				
	+ PCB 169					
	+ Arochlor 1254					
	+ Arochlor 1254	Regoli et al. (2003) (Laboratoire)				
OCP	+/- les pyréthri-noïdes et mélange d'OCPs	Revue de littérature : Van der Oost 1996 Whyte et al. (2000)	0 OCPs	Van der Oost et al. (1996) (Terrain)	0 OCPs	Van der Oost et al. (1996) (Terrain)
	0 Lindane, dieldrine, hexachlorobenzène (HCB), Le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE)	Buet et al. (2006)	0 Lindane, dieldrine, hexachlorobenzène (HCB), Le dichlorodiphényldichloroéthylène (DDE)	Buet et al. (2006) (Terrain)	- Lindane	Buet, A. et al., (2006) (terrain)
	0 Mélange d'OCPs	Corsi et al. (2005) (Terrain)				
MÉTAUX	+ Cadmium (Cd) en association avec le Benzo(a)pyrène	Revue de littérature chez le poisson : Whyte et al. (2000) (chez le poisson)	+ Cu + Cd + Mercure (Hg) + As	Revue de littérature chez le poisson : Martinez et al. (2005) Sevcikova et al. (2011)	+ Cu + Cd + Hg + As	Revue de littérature chez le poisson : Martinez et al. (2005) Sevcikova et al. (2011)
	- Cuivre (Cu)					
	- Hg, les organoétains					
	- Cd	Lemaire-Gony et al. 1992 (Laboratoire)	+ Cd	Pierron et al. (2007) (laboratoire)	+ Cd	Pierron et al. (2007) (Laboratoire)
	+ Cd en association avec le Benzo(a)pyrène					
	+ Cu	Gravato et al. (2006) (Laboratoire)	- Zinc (Zn)	Gravato et al. (2010) (terrain)		

	EROD		CAT		SOD	
Suite	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
	- Zn, Cr, Cu	Oliviera et al. (2005) (Terrain)	- Zn, Cr, vanadium (V), Pb, Cu	Guimaraes et al. (2008) (Terrain)	0 Zn, Cr, V, Pb, Cu dans les sédiments	Guimaraes et al. (2008) (Terrain)
			- Cr (combiné au β -NF)	Ahmad et al. (2006) (Laboratoire)		

Facteurs Biologiques	EROD		CAT		SOD	
	Action	Références	Action	Références	Action	Références
Âge/taille	+ Avec l'âge et la taille qui augmente au cours de la croissance, la bioaccumulation des contaminants augmente également (facteur en lien avec l'âge et la taille) et induise les réponses d'EROD	Revue de littérature : Whyte et al. (2000)	- Si la quantité d'ERO augmente avec l'âge, les défenses antioxydantes sont altérées. La détérioration fonctionnelle associée au vieillissement est le résultat d'une accumulation de dommages oxydatifs infligés par d'ERO non éliminés	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)	- Idem que pour la CAT	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)
Type de nourriture	+ Avec une nourriture de type invertébrés benthiques (stade jaune) - Avec une nourriture de type poissons et dans la colonne d'eau	Whyte et al. (2000)	+ Avec une nourriture riche en acide gras et en vitamine E - Une nourriture trop riche en lipides et un surpoids	Martinez et al. (2005)	- Idem que pour la CAT	Martinez et al. (2005)
Malnutrition	- Diminution des activités microsomaes du foie	Whyte et al. (2000)	- Une nourriture trop riche en lipides et un surpoids	Martinez et al. (2005)	+ Restriction alimentaire	Martinez et al. (2005)

EROD			CAT		SOD	
Facteurs environnementaux	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
Température	+ Lorsque la température augmente	Revue de littérature : Whyte et al. (2000)	+ / - L'adaptation à des changements de température implique des ajustements des propriétés fonctionnelles des mitochondries et de leur quantité, affectant ainsi la production de ROS et celle des défenses antioxydantes	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)	+ / - Idem que pour la CAT	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)
	+ Lorsque la température augmente	Gorbi et al. (2005) (Terrain)	+ / - en fonction des changements de température et espèce de poissons	Van der Oost (2003)	+ / - Idem que pour la CAT	Van der Oost (2003)
	+ Pendant la saison chaude de l'été - Pendant la saison froide de l'hiver	Rotchell et al. (1999) (Terrain)				
	0 pas d'effet observé entre 20° et 25°C	Pacheco et Santos (2001) (Laboratoire)				
Salinité	+/- Peu d'effet de la salinité avec une forte variabilité interannuelle	Hylland et al. (1998) Fonseca et al. (2011) (Chez les poissons estuariens et terrain) Livingstone et al. (2000) (Chez l'anguille et terrain)	+ Avec l'augmentation de la salinité	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)	+ Avec l'augmentation de la salinité	Revue de littérature : Martinez et al. (2005)

Facteurs environnementaux	EROD		CAT		SOD	
	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
Hypoxie	- Condition extrême d'hypoxie	Rahman et Thomas (2012) (Chez les <i>Micropogonias undulatus</i> , laboratoire)	+ Condition hypoxie	Pierron et al. (2007) (laboratoire)	+ Condition hypoxie	Pierron et al. (2007) (laboratoire)

ANNEXE I-2 : Les effets des contaminants, des facteurs biologiques et environnementaux sur les réponses de biomarqueurs histopathologiques chez l'anguille.

Légende :

0 : aucun changement de réponse ou pas de réponse significative

+ : induction ou augmentation de la réponse du biomarqueur

- : inhibition ou diminution de la réponse

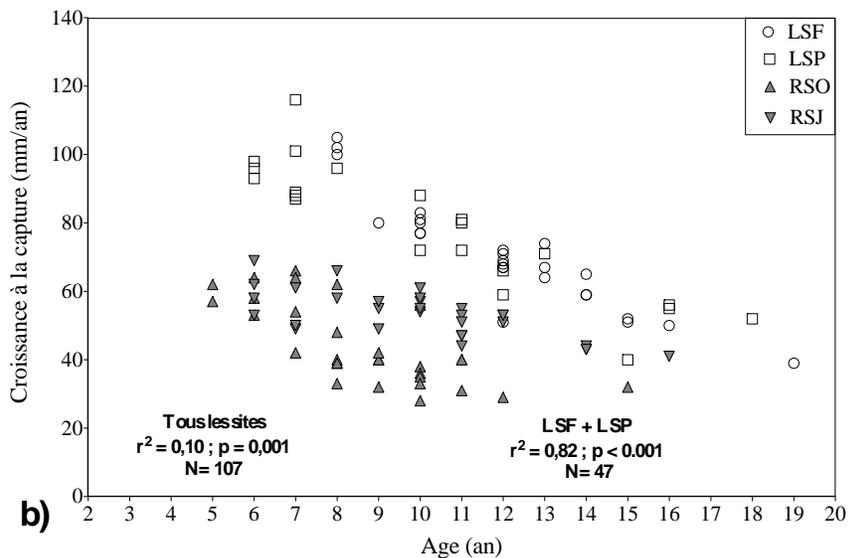
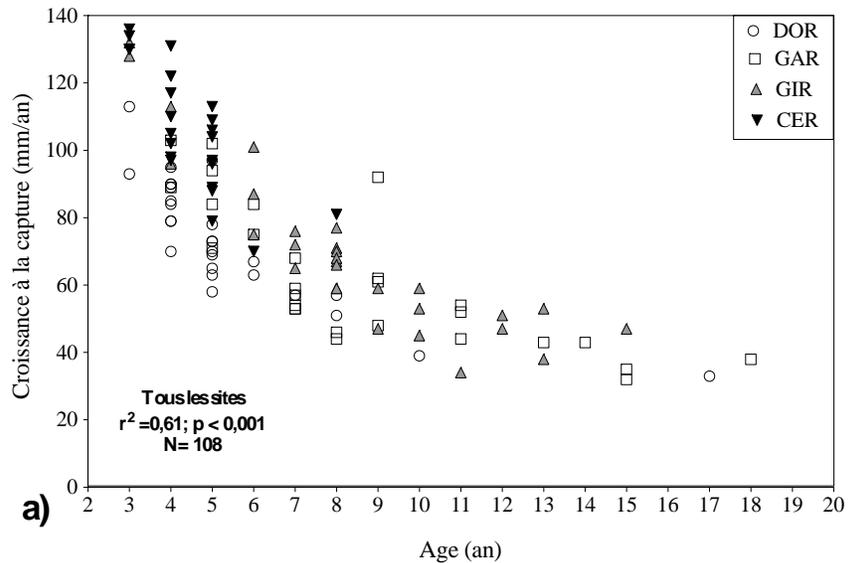
+/- : induction et inhibition de la réponse ont été observé

Biomarqueurs histopathologiques						
Contaminants	Densité et surface des centres mélanomacrophages		Dépôt de lipofuscine		Dépôt d'hémosidérine	
	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
HAP	+ PAH, lindane, dieltrine (dans le foie et la rate)	Roche et al. (2002) (Terrain) Ribiero et al. (2005) (Terrain) Pacheco et Santos, (2002) (Laboratoire) Teles et al. (2003) (Laboratoire)	+ Dans le foie et la rate (chez le poisson)	Revue de littérature: Wolke (1992)	+ dans le foie et la rate (chez l'anguille européenne, <i>Anguilla anguilla</i>)	Santos et Hall (1990) Pacheco et Santos, 2002
PCDD/PCDF	+	Ghosh et al. (2013) (Chez la morue de roche, <i>Trematomus bernacchii</i>) Baker et al. (1994) (Chez le Chabot, <i>Myoxephalus spp.</i>)	+ Dans le foie et la rate	Blazer et al. (1992)		
PCB	+ Mélange de PCB	Geeraerts and Belpaire (2009) Ribiero et al. (2005) (Terrain)	+ Dans le foie et la rate	Blazer et al. (1992)		
	+ PCB 126 (suppression du système immunitaire et altération des tissus)	Sure et Knopf (2004)				

Densité et surface des centres mélanomacrophages			Dépôt de lipofuscine		Dépôt d'hémosidérine	
Contaminants	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
BKME	+ Dans le foie, la rate et le rein ± Lié à une maladie infectieuse et peut-être indirectement lié à l'effluent de pâtes et papiers	Couillard et al. (1996) (Terrain, chez le meunier noir) Couillard et al. (1999) (Chez le poulamon d'Atlantique, terrain)	+ Dans le foie et la rate (chez l'anguille européenne, <i>Anguilla anguilla</i>)	Pacheco et Santos (2002)	+ Dans le foie et la rate (chez l'anguille européenne, <i>Anguilla anguilla</i>)	Pacheco et Santos (2002)
Métaux	+ Une des principales fonctions des CMM est le stockage de métaux + Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, V et Zn + Méthylmercure + Mercure	Revue de littérature : Agius et Roberts (2003) Roche et al. (2002) (Chez l'anguille, terrain) Kerambrun (2012) (Chez le turbot, terrain) Drevnick (2008) (Chez le brochet, terrain) Schwindt et al. (2008)	- Cd (dans le foie et la rate)	Suresh (2009)	+ Cd (dans le foie et la rate)	Suresh (2009)

Facteurs biologiques	Densité et surface des centres mélanomacrophages		Dépôt de lipofuscine		Dépôt d'hémosidérine	
	Action	Réf.	Action	Réf.	Action	Réf.
Âge	+ Dans le foie et la rate	Revue de littérature : Wolke (1992) Schwindt et al. (2006) Couillard et al. (1996) Couillard et al. (1999)	+ Dans le foie et la rate	Revue de littérature : Wolke (1992)	+ Dans le foie et la rate	Revue de littérature : Wolke (1992)
Sous-alimentation	+ Dans la rate et le rein	Revue de littérature : Wolke (1992)	0	Revue de littérature : Wolke (1992)	0	Revue de littérature : Wolke (1992)
Déséquilibre nutritionnel	+ Déficience en vitamine E ou poisson en embonpoint	Revue de littérature : Wolke (1992)				
Maladies infectieuses	+ Bactéries, parasites, virus + En présence du nématode <i>Anguillicola crassus</i>	Revue de littérature : Wolke (1992) Couillard et al. (1999) (Chez le poulamon d'Atlantique, terrain) Revue de littérature : Kirk (2003) (Chez l'anguille)	+ En présence du nématode <i>Anguillicola crassus</i>	Kirk (2003) (revue de littérature chez l'anguille)	+ En présence du nématode <i>Anguillicola crassus</i>	Revue de littérature : Kirk (2003) (Chez l'anguille)
Facteurs environnementaux						
Température	+ Dans la rate avec l'augmentation de la température	Revue de littérature : Wolke (1992)				
Salinité	Pas d'effet direct observé sur les biomarqueurs histopathologiques dans la rate des anguilles jaunes. Cependant, l'augmentation de la salinité joue un rôle sur la croissance, le type de nourriture, le métabolisme de l'anguille jaune et pourrait être un facteur indirect à l'augmentation en nombre et taille des CMM ainsi que l'accumulation pigmentaire.					

ANNEXE II Relation linéaire entre la croissance (taille à la capture/âge à la capture) et l'âge à la capture a) chez les anguilles européennes échantillonnées le long du SG (DOR, GAR ET GIR) et dans le marais salant de Certes (CER) et b) chez les anguilles américaines échantillonnées le long du SSL dans la partie fluviale (LSP et LSF) et dans les tributaires de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent (RSO et RSJ).



ANNEXE III Protocole de l'analyse biochimique d'EROD adapté au foie de l'anguille

Prélèvement des échantillons

- Prélever le foie
- Peser le foie et le poisson pour avoir le rapport hépato-somatique (RHS)
- Congeler directement dans de l'azote liquide puis conservé à -80°C.

Quantité tissus nécessaire : 50mg. Néanmoins selon les tissus (foie ou intestin), le niveau de gras pour le foie, et l'espèce, 20mg peuvent être suffisant.

- Préparation des homogénats
- Traitement des tissus :

Échantillon pesé et identifié par un #1 de travail (échantillon conservé sur de la glace)

- Ajouter une quantité de Hepes Grinding Buffer (HGB) en fonction du type et de la quantité de tissu (selon niveau de gras pour foie de l'anguille).

Il s'agit d'ajouter 200µL de HGB au tissu (maximum 250µl sinon lors du broyage du liquide peut être éjecter du tube), d'homogénéiser le tissu puis de compléter avec le volume de buffer requis pour atteindre le volume total prévu.

- L'homogénéisation se fait directement dans un micro-tube à centrifuger 1,5mL à l'aide d'un Pellet pestel® Motor (Kontes).
- L'homogénat est remis sur glace en attendant la centrifugation.

Centrifugation :

- 9000 ou 10000G, 4°C, 20 minutes
- Surnageant (S92) récupéré avec une micropipette ou une pipette pasteur (sur la glace) dans un cryotube pour le recongeler à -80°C (par exemple si on veut faire les dosages de protéines plus tard).

Dosage EROD

- Préparation des standards de résorufine

- **Résorufine (pour Standard)**

A) Super stock à 5 mg/mL :

Pour 50mL : 0.25g (250mg) de résorufine, ajouter 50 mL de DMSO

Note : long à dissoudre. Couvrir complètement avec un papier d'aluminium puis placer sur une plaque agitatrice 2-3 jours.

Conservation : au frigo à long terme dans une bouteille ambrée

B) Stock à 0.5mg/mL ou 500 µg/mL :

Pour 10mL : 1mL de super stock(A) dans 9mL de DMSO

Conservation : au frigo à long terme dans une bouteille ambrée

Standard	Concentration Résorufine (µg/mL)	V solution stock (B) µl		V DMSO µl	Total volume (ml)
0	0	0		1000	1
1	1	2	+	998	1
2	2	4	+	996	1
3	3	6	+	994	1
4	4	8	+	992	1
5	5	10	+	990	1

- Échantillons (50µl dans 3 puits) puis standards (10µl dans 2x2 puits) sont répartis dans la plaque. Les tubes sont vortexés avant la distribution (sauf le premier standard qui ne contient que du DMSO).
- Dans puits de standard, ajouter au distributeur 40µl de Hépes Buffer (HB), 50µl de 7er/Hépes dans tous les puits
- Incubation 10 minutes à T° ambiante en recouvrant la plaque d'un papier d'aluminium.
- À la dernière minute, préparer le NADPH en ajoutant le volume d'eau nécessaire
- Distribuer rapidement 10µl de NADPH dans tous les puits
- Faire tout de suite une lecture sur spectromètre : lecture en fluo (excitation 530nm, émission 590nm) pendant 13 minutes toute les minutes avec un shake d'une puissance moyenne de 2 secondes avant chaque lecture.

Dosage des protéines

Préparation des échantillons et solutions :

Le dosage de protéines totales peut être fait juste après l'analyse EROD ou bien l'échantillon S9 peut être congelé à -80°C et analysé ultérieurement.

Les échantillons doivent être plus ou moins dilués selon le type de tissus, le niveau de gras et l'espèce. Des essais sont nécessaires pour s'assurer que les valeurs mesurées sont dans la gamme de la courbe standard.

- Dilution : $10\mu\text{l}$ d'échantillon + $100\mu\text{l}$ d'eau
- Réactif BIO-RAD3 dilué : 1 volume + 4 volume d'eau.
- Standard utilisé : ampoule d'albumine liquide (diluée, gelée à -20°C et conservée plus d'un an).

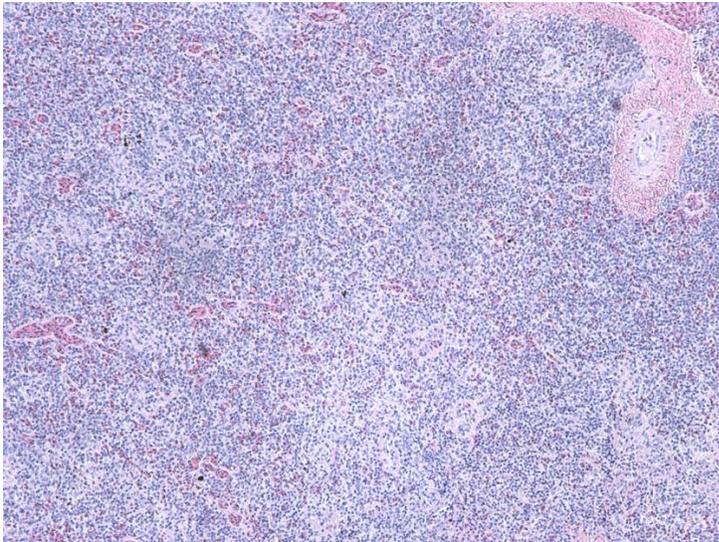
Préparation de la plaque :

- Échantillons ($10\mu\text{l}$ dans 3 puits) puis standards ($10\mu\text{l}$ dans 2 puits) sont répartis dans la plaque. Les tubes sont vortexés avant la distribution.
- Ajout de $200\mu\text{l}$ de réactif BIO-RAD
- 5 minutes d'incubation à T° ambiante en recouvrant la plaque
- Lecture au spectrophotomètre en absorbance à 595nm (Shake moyen de 5 secondes avant la lecture)

Analyse des résultats

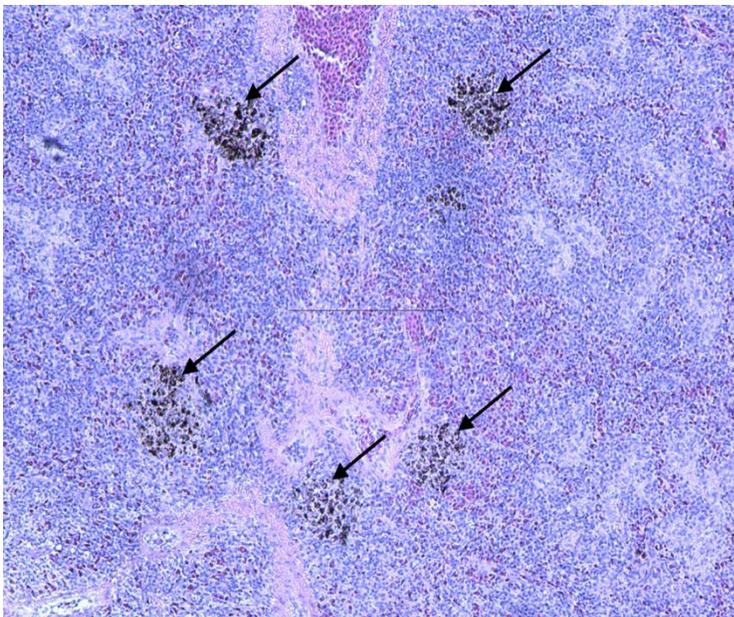
Analyser les résultats à l'aide du fichier Excel « macro calcul EROD »

ANNEXE IV Photographies numériques de l'histologie de la rate chez l'anguille jaune



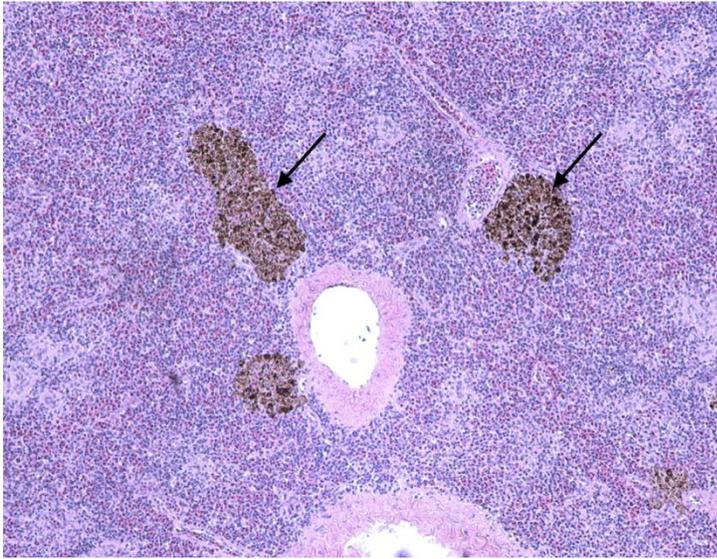
Photographie 1 : Aspect microscopique d'une rate normale chez une anguille jaune témoin sans centres mélanomacrophages (Coloration hématoxyline et éosine (H&E), grossissement x 60)

Remarque : La rate des poissons est recouverte d'une fine capsule conjonctive fibreuse qui envoie peu de travées dans l'organe. On y retrouve essentiellement les mêmes structures de base que chez les autres vertébrés, à savoir pulpes blanche et rouge, vaisseaux sanguins et ellipsoïdes.



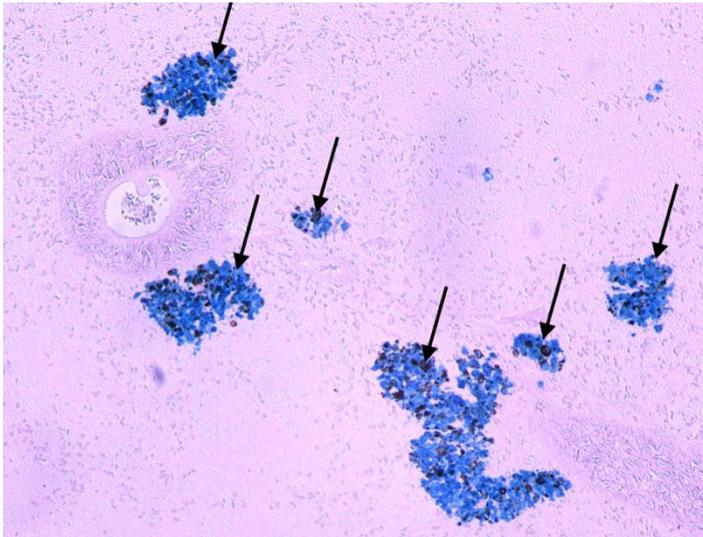
Photographie 2 : Présence de densité élevée de centre mélanomacrophages (CMM) dans la rate d'une anguille jaune (H&E, grossissement X 60)

Remarque : Les CMM sont identifiés sur la photographie à l'emplacement de la pointe de flèche. Sur cette coupe, les CMM (amas de mélanomacrophages, cellules immunitaires, phagocytaires remplies de pigments) se reconnaissent aisément à leur couleur foncé (verdâtre ou brun).



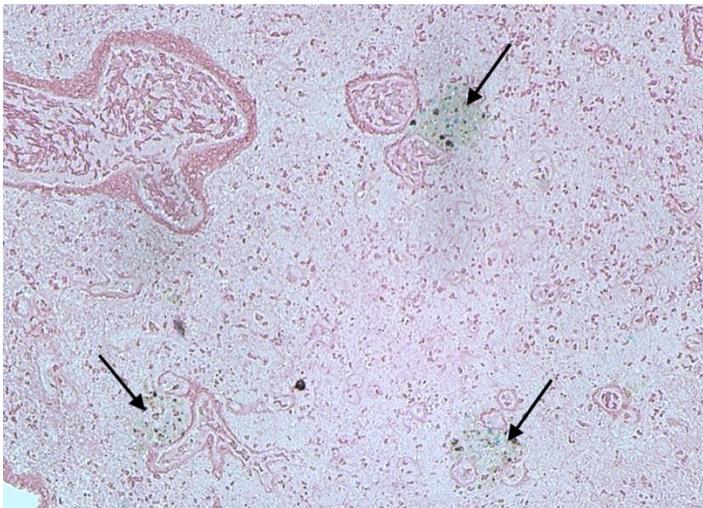
Photographie 3 : Présence de surface élevée de CMM dans la rate d'une anguille jaune (H&E, grossissement X 60)

Remarque : Les grandes surfaces de CMM sont identifiées sur la photographie à l'emplacement de la pointe de flèche.



Photographie 4 : Présence de dépôts d'hémosidérine à l'intérieur des CMM dans la rate d'une anguille jaune (coloration Perls, grossissement X 60)

Remarque : Les dépôts d'hémosidérine apparaissent sous la forme de granules noirs à l'intérieur de chaque CMM et les CMM sont identifiés sur la photographie à l'emplacement de la pointe de flèche et sont colorés en bleu.



Photographie 5 : Présence de dépôts de lipofuscine à l'intérieur des CMM dans la rate de l'anguille jaune (coloration Schmorl, grossissement X 60)

Remarque : Les dépôts de lipofuscine apparaissent d'une couleur blanchâtre à l'intérieur de chaque CMM et les CMM sont identifiés sur la photographie à l'emplacement de la pointe de flèche.