



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

l'Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par

Quentin PETITJEAN

Le 17 Décembre 2019

Variabilité de réponse aux stress multiples chez le goujon (*Gobio occitaniae*)

JURY

Géraldine LOOT – PR UTIII – Présidente du jury

Christel LEFRANÇOIS – MCF U. La Rochelle- Rapportrice

Patrice COUTURE – PR INRS - Rapporteur

Stéphane BETOULLE - PR URCA - Examineur

Martin DAUFRESNE – DR IRSTEA - Examineur

Séverine JEAN - MCF INPT - Invitée

Ecole doctorale et discipline ou spécialité :

ED - SDU2E : Ecologie fonctionnelle

Unité de recherche :

*UMR 5245 EcoLab – Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle
UMR 5174 EDB – Laboratoire Evolution et Diversité Biologique*

Directeurs de Thèse :

Lisa JACQUIN – MCF UTIII

Pascal LAFFAILLE – PR INPT

“To develop worldwide accepted strategy leading to sustainability of ecosystems against human induced stresses will be one of the greatest tasks of mankind”

Paul J. Crutzen

“For the vast majority of beasts on this planet, stress is about a short-term crisis, after which it’s either over with or you’re over with”

Robert M. Sapolsky

AVANT PROPOS

Ce travail de thèse a été financé par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation français. Les analyses et différentes missions inhérentes au bon déroulement de ce travail ont été financées par l'Agence de l'eau Adour Garonne (projet PHYPAT) et l'initiative structurante Ecosphère Continentale et Côtière dans le cadre de la thématique ECOTOxicologie, écoDYNamique des contaminants (EC2CO-ECODYN).



Ce travail a principalement été réalisé dans les laboratoires EcoLab (laboratoire d'écologie fonctionnelle et environnement) et EDB (laboratoire évolution et diversité biologique) et a fait l'objet de plusieurs collaborations inter-laboratoire.

- **Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement**, UMR5245 EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.
- **Laboratoire Evolution et Diversité Biologique**, UMR5174 EDB, Université de Toulouse, CNRS, IRD, UPS, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.
- **Bordeaux Sciences Agro**, 1 cours du Général De Gaulle, CS 40201, 33175 Gradignan, France
- **Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés**, UMR 5023 LEHNA, Université de Lyon, 3, rue Maurice Audin 69518 Vaulx-en-Velin, France.
- **Centre d'Etudes Biologiques de Chizé**, UMR 7372, Université de la Rochelle, CNRS, F-79360 Villiers en Bois, France.
- **Plateforme APEX**, INRA-Oniris UMR0703 PAnTher La Chantrerie 44307 Nantes Cedex 3, France.
- **Laboratoire de Génie Chimique**, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS Toulouse France.



REMERCIEMENTS


Je tenais tout d'abord à remercier mes directeurs de thèse Lisa Jacquin, Séverine Jean et Pascal Laffaille pour la confiance, le soutien et les conseils, qu'ils m'ont accordé au cours de ces 3 années de thèse. D'ailleurs j'aimerais aussi les remercier pour leur patience, leur bonne humeur et leur entrain qu'ils ont su conserver dans toutes les situations (sur le terrain, au laboratoire et même lors de la relecture de ce manuscrit !).

J'aimerais remercier les membres de mon comité de thèse : Aurélie Goutte, Séverine Jean, Stéphane Betoulle, Simon Blanchet et Raphaël Santos pour les discussions et conseils qu'ils m'ont apporté au cours de ces trois ans.

J'aimerais aussi remercier Annie Perrault et bien entendu Myriam Cousseau (alias Michelle !) et Corinne Pautot pour leur aide sans pareille au cours des pêches mais aussi des expérimentations en laboratoire. Par ailleurs et en leur nom, j'aimerais remercier tous les chanteurs et chanteuses français(e)s décédés durant ces trois ans de thèse, pour avoir régalié leurs oreilles ... au détriment des miennes ! (i.e. compromis auditif pour le bon déroulement de la thèse, sorte de stratégie de compensation). Un double remerciement (cela va faire des jaloux) à Annie et Michelle pour leur soutien et leur mental à toutes épreuves (campagnes de terrain, expérimentations en laboratoire, mise au point des protocoles, centrifugation à 1h du matin dans un BnB ! et j'en passe...).

Je tenais aussi à remercier Sandrine Papillon et Michel LeHénaff pour leur accueil à Bordeaux Sciences Agro, le temps qu'ils ont consacré pour me former et co-encadrer les stagiaires venus réaliser les dosages immuno. D'ailleurs tant qu'à être à Bordeaux je remercie Julie Neury-Ormanni pour m'avoir hébergé et m'avoir fait profiter de la bière Bordelaise durant mon passage à Bordeaux justement.

Je voudrais remercier Raphaël Santos pour cette superbe excursion nocturne dans les rues de Prague et bien sûr pour son aide dans la réalisation des essais COMET. Je remercie d'ailleurs Pierre Marchal et Céline Delafosse pour m'avoir « gracieusement » hébergé durant ma semaine Lyonnaise (enfin, j'ai quand même failli rester dehors !).




J'aimerais aussi et surtout remercier les stagiaires qui m'ont aidé à acquérir les données nécessaires à l'aboutissement de ce travail, (attention la liste est longue !) : Mathilde Pitout, Amaïa Lammarins, Emilie Rojas, Louna Riem, Pauline Madec, Alexianne Damiens, Hortense Hourmat, Melissa Izard, Laura Madeline, Océane Morrisseau, Camille Courcoul, Elisa Su-Fu, Bruno Galle, Cyprian Kauffmann, Flavien Garcia, Leo Bottagisio et Pierre Eon.

J'aimerais remercier les membres de l'équipe technique de l'ENSAT, Yannick, Frédéric, Jean-Marie et René qui ont toujours répondu présent pour me donner un coup de main et me prêter leurs outils ! D'ailleurs double remerciements (si cela devient trop fréquent, cela n'aura plus de valeur) à René sans qui la confection des cages m'aurait occupé pour les 3 ans de cette thèse !

J'aimerais remercier mes collègues doctorants avec qui j'ai co-organisé le crue 2019 des rencontres « Ecology & Behaviour », on en a bavé mais c'était quand même vraiment au top cette affaire !

J'aimerais aussi remercier mes collègues de bureau et de pauses café: Vincent Jassey, Thibaut Rota, Jeremy Jabiol, Louna Riem, Camille Courcoul, Joey Allen, Magali Brosed pour leur soutien et les discussions plus ou moins profondes que nous avons tenues.

J'aimerais remercier tous les membres des laboratoires EcoLab et EDB avec qui j'ai interagi de près ou de loin au cours de ces trois ans, que cela soit seulement pour un café ou bien pour de plus amples discussions. En particulier, Jessica Côte avec qui j'ai partagé plusieurs sessions de captures de goujons mémorables et qui m'a aidé à mettre le pied à l'étrier au commencement de cette aventure qu'est la thèse. Sylvain Lamotte, fidèle planteur de piquet et écailleur redoutable et redouté ! Charlotte Veysiere pour son aide sur le terrain et son second degré. L'équipe de gestion d'EcoLab, Cécile Odorico, Catherine Donati et Cyril Pouzac, qui m'ont tout appris sur les ficelles du métier de gestionnaire financier ! (J'ajoute une ligne à mon CV immédiatement). Spéciale dédicace à Franck Gilbert (Mr le Directeur), Régine Saur et Didier Lambrigot (alias Phiphi) pour leur bonne humeur communicative et leur vannes (parfois douteuses !, je vise particulièrement Phiphi ici).



J'ajoute une ligne pour remercier mes collègues basketteurs du midi qui m'ont permis de réaliser des interludes sportifs au cours de mes journées de travail.

J'aimerais aussi remercier mes amis, Dellois, Belfortains, Bisontins et Toulousains.

J'aimerais enfin remercier ma mère pour les valeurs qu'elle m'a inculquées, sa gentillesse, sa confiance et son soutien indéfectible.

Enfin j'aimerais remercier Sarah Berthe, pour avoir vécu la thèse de l'intérieur et m'avoir supporté à chaque instant de ce projet ! Merci pour ton engagement, ta compréhension, ta patience, ton abnégation, ... enfin pour être toi. Je t'aime.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Publications

Published

Petitjean Q., Côte J., Jean S., Perrault A., Morrisseau O., Laffaille P., Jacquin L., 2020. Direct and indirect physiological effects of multiple environmental stressors on gudgeon health. SCI TOTAL ENVIRON. (special issue). Doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.140657. [Link](#)

Jacquin L., **Petitjean Q.**, Côte J., Laffaille P., Jean S., 2020. Effects of pollution on fish behavior and personality: some research perspectives. FRONT ECOL EVOL (special issue). Doi: 0.3389/fevo.2020.00086. [Link](#)

Petitjean Q., Jean S., Côte J., Lamarins A., Lefranc M., Santos R., Perrault A., Laffaille P., Jacquin L., 2019. Combined effects of temperature increase and immune challenge in two wild gudgeon populations. FISH PHYS BIOCHEM. Doi: 10.1007/s10695-019-00706-6. [Link](#)

Petitjean Q., Jean S., Gandar A., Côte J., Laffaille P., Jacquin L., 2019. Stress responses in fish: from molecular to evolutionary processes. SCI TOTAL ENVIRON. Doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.05.357. [Link](#)

Petitjean, Q., Jacquin, L., Riem, L., Pitout, M., Perrault, A., Cousseau, M., Laffaille, P., Jean, S., 2020. Intraspecific variability of responses to combined metal contamination and immune challenge among wild fish populations. Environ. Pollut. 116042. Doi: 10.1016/j.envpol.2020.116042. [Link](#)

Petitjean, Q., Jacquin, L., LeHénaff, M., Perrault, A., Cousseau, M., Laffaille, P., Jean, S., 2020. Dose- and time-dependent effects of an immune challenge on fish across biological levels. J. EXP. ZOOL. PART ECOL. INTEGR. PHYSIOL. Doi: 10.1002/jez.2430. [Link](#)

In prep

Petitjean Q., Jacquin L., Perrault A., Cousseau M., Laffaille P., Jean S., (In prep). Variability of multiple stressors effects in wild populations: a translocation experiment. Target journal: AQUATIC TOXICOLOGY.

Communications

Communications orales

Oral communication at the [SETAC Europe 29th meeting 2019](#)

Petitjean Q., Jacquin L., Riem L., Rojas E., Perrault A., Cousseau M., Laffaille P., Jean S., Variability of fish population responses to combined contamination and immune stressors in wild gudgeon.

Oral communication at the [SFE² meeting 2018](#)

Petitjean Q., Jacquin L., Riem L., Rojas E., Perrault A., Cousseau M., Laffaille P., Jean S., Variability of fish population responses to combined contamination and immune stressors in wild gudgeon.

Oral communication at the [SEFS meeting 2017](#)

Petitjean Q., Côte J., Jean S., Perrault A., Morrisseau O., Laffaille P., Jacquin L., Responses of freshwater fish to multiple stressors.

Posters

Poster presentation at the [SFE² meeting 2018](#)

Petitjean Q., Jean S., Côte J., Lamarins A., Perrault A., Laffaille P., Jacquin L., Responses to combined temperature and immune stressors in wild gudgeon.

Poster presentation at the [FEE meeting 2017](#)


Petitjean Q., Côte J., Jacquin L., Perrault A., Morrisseau O., Laffaille P., Jean S., Responses of freshwater fish to multiple stressors.

SOMMAIRE

AVANT PROPOS	5
REMERCIEMENTS	7
VALORISATION SCIENTIFIQUE	11
SOMMAIRE	13
CONTEXTE	1
CHAPITRE 1 INTRODUCTION	7
1. RÉPONSE AU STRESS	11
2. FACTEURS DE STRESS ET EXPOSITION MULTIPLE	15
3. EFFETS MULTI-ÉCHELLES	23
4. VARIABILITÉ ENTRE POPULATIONS.....	36
5. OBJECTIFS DE LA THÈSE	40
6. RÉFÉRENCES	41
CHAPITRE 2 MATERIEL & METHODES.....	59
1. CADRE MÉTHODOLOGIQUE.....	61
2. DESIGN EXPÉRIMENTAUX.....	76
3. RÉFÉRENCES	84
CHAPITRE 3 DIRECT AND INDIRECT EFFECTS OF STRESSORS ON GUDGEON HEALTH	89
RÉSUMÉ DU CHAPITRE.....	91
DIRECT AND INDIRECT PHYSIOLOGICAL EFFECTS OF MULTIPLE ENVIRONMENTAL STRESSORS ON GUDGEON HEALTH.....	94
1. INTRODUCTION.....	95
2. MATERIAL AND METHODS.....	97

3. RESULTS	107
4. DISCUSSION.....	112
5. CONCLUSION.....	116
COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS.....	117
ACKNOWLEDGEMENTS	117
REFERENCES	118
SUPPORTING MATERIAL	129
CHAPITRE 4 COST OF IMMUNE RESPONSE	133
RÉSUMÉ DU CHAPITRE.....	135
1. INTRODUCTION.....	126
2. MATERIAL AND METHODS.....	128
3. RESULTS	136
4. DISCUSSION.....	142
5. CONCLUSION.....	146
COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS.....	147
ACKNOWLEDGEMENTS	147
REFERENCES	148
SUPPORTING MATERIALS	157
CHAPITRE 5 COMBINED EFFECTS OF TEMPERATURE AND IMMUNE CHALLENGE IN GUDGEON POPULATIONS.....	158
RÉSUMÉ DU CHAPITRE.....	160
COMBINED EFFECTS OF TEMPERATURE AND IMMUNE CHALLENGE IN GUDGEON POPULATIONS.....	162
1. INTRODUCTION.....	163
2. MATERIAL AND METHODS.....	166

3. RESULTS.....	178
4. DISCUSSION.....	183
5. CONCLUSION	188
COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS.....	189
ACKNOWLEDGEMENTS	189
REFERENCES	190
SUPPORTING MATERIALS	198
CHAPITRE 6 COMBINED EFFECTS OF CONTAMINANTS AND IMMUNE CHALLENGE IN GUDGEON POPULATIONS.....	178
RÉSUMÉ DU CHAPITRE.....	180
COMBINED EFFECTS OF METALS MIXTURE AND IMMUNE CHALLENGE IN 5 GUDGEON POPULATIONS.	183
1. INTRODUCTION.....	184
2. MATERIAL AND METHODS.....	187
3. RESULTS	195
4. DISCUSSION.....	202
COMPLIANCE WITH ETHICAL STANDARDS.....	209
ACKNOWLEDGEMENTS	210
REFERENCES	210
SUPPORTING MATERIALS	223
CHAPITRE 7 SYNTHÈSE ET DISCUSSION GÉNÉRALE.....	228
1. STRESS SIMPLES	232
2. STRESS MULTIPLES	249
3. PERSPECTIVES : ECHELLE D'ORGANISATION ET IMPORTANCE DU COMPORTEMENT POUR FAIRE FACE AUX STRESS	256



4. VARIABILITÉ DE RÉPONSES AUX STRESS ENTRE POPULATIONS : PERSPECTIVE COMPORTEMENTALE	259
5. VARIABILITÉ INTRASPÉCIFIQUE DE RÉPONSE AUX STRESS : PERSPECTIVE ÉVOLUTIVE	263
6. IMPLICATIONS DANS UN CONTEXTE DE CHANGEMENTS GLOBAUX 269	
7. CONCLUSION GÉNÉRALE	271
RÉFÉRENCES	272
ANNEXES	284
ANNEXE 1. STRESS RESPONSES IN FISH: FROM MOLECULAR TO EVOLUTIONARY PROCESSES.....	284
ANNEXE 2. EFFECTS OF POLLUTION ON PERSONALITY AND COGNITION IN FISH: SOME RESEARCH PERSPECTIVES.....	284

CONTEXTE

Suite à la révolution industrielle, l'Homme est entré dans une nouvelle ère marquée par l'avènement de changements globaux : l'Anthropocène (Crutzen, 2006). En effet, les fortes pressions exercées par l'Homme sur les terres (e.g. agriculture, urbanisation) et l'exploitation des ressources (e.g. en eau, fossiles et minérales) impactent fortement les écosystèmes aquatiques et terrestres (McNeill, 2000).

Les écosystèmes aquatiques d'eau douce sont peu représentés à l'échelle de la planète (< 1 % de la surface terrestre) pourtant ils accueillent environ 10% de la biodiversité et plus de 30% des espèces de vertébrés (Strayer and Dudgeon, 2010). Actuellement, ces écosystèmes sont considérés comme les plus dégradés par les activités humaines (Carpenter et al., 2011; Dudgeon et al., 2006). En effet, au cours des 50 dernières années, la densité des populations de vertébrés aquatiques d'eau douce a chuté de plus de 80% (Fig. 1) mais les raisons de cette chute drastique sont encore mal comprises (Harrison et al., 2018; Reid et al., 2019).

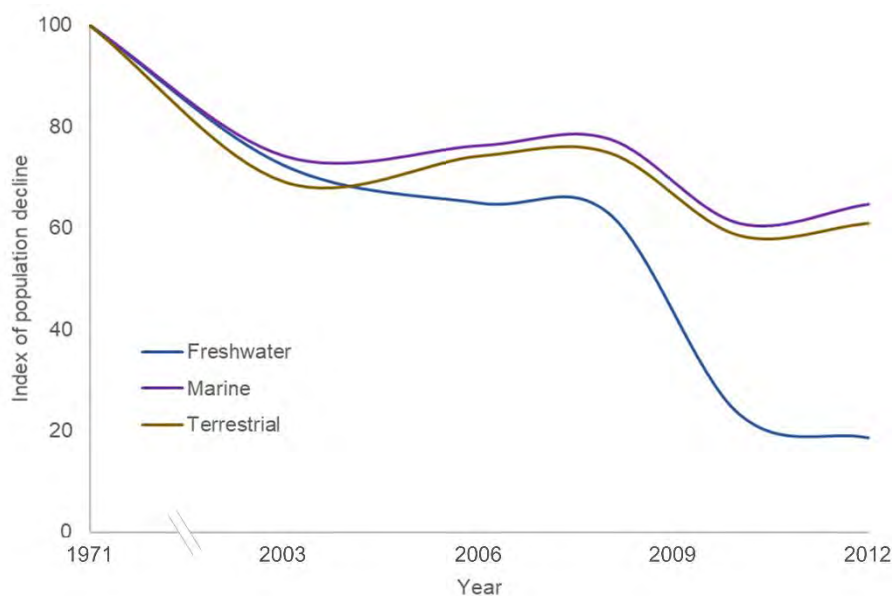


Figure 1. Evolution de l'indice de déclin des populations de vertébrés (living planet index, WWF) au cours du temps. Pour chaque groupe (i.e. eau douce - bleu, marin - violet et terrestre - marron), l'indice est calculé sur un pool de vertébrés. L'indice est relatif à l'année 1970 (i.e. année de référence) pour laquelle la valeur est fixée à 100%. Adapté de Reid et al. (2019).

Au cours des dernières décennies, les recherches en matière de conservation ont convergé vers une même hypothèse : les causes de ce déclin ne seraient pas dues à des facteurs isolés mais seraient plutôt multifactorielles. Ainsi, dans le milieu naturel, les poissons sont exposés à une multitude de facteurs de stress abiotiques. Par exemple, les activités liées à l'extraction et à l'utilisation des métaux constituent les plus anciennes sources de contamination environnementale (Nriagu, 1996). Malgré l'amélioration de la législation en matière de rejets, ces contaminants rémanents continuent d'être relargués dans l'environnement et d'impacter les organismes aquatiques, en particulier les poissons sauvages. De plus, la modification des températures liée au réchauffement climatique est une menace importante pour les populations de poissons (Vinebrooke et al., 2004; Dudgeon et al., 2006; Hamilton et al., 2016). Dans l'environnement les poissons sont aussi exposés à des stress d'origine biotiques tels que les parasites qui peuvent affecter leur état de santé et sont pourtant très peu considérés. Par exemple, l'émergence de pathogènes invasifs peut avoir des conséquences importantes pour les populations de poissons, à la fois dans les élevages et dans le milieu naturel (e.g. Maladie Rénale Proliférative, Okamura et al., 2011, *Gyrodactylus salaris*, Bakke et al., 2007). Dans ce contexte, la pollution, le réchauffement climatique, et les pathogènes sont des sources de stress majeures dont les effets combinés sur les populations sauvages sont encore peu connus (Crain et al., 2008; Ormerod et al., 2010; Petitjean et al., 2019b; Sabater et al., 2019).

Dans l'environnement, ces différents facteurs de stress, qu'ils soient d'origine abiotique ou biotique, sont susceptibles d'interagir de manière complexe (Crain et al., 2008) et d'affecter l'état de santé des poissons de différentes manières (e.g. additivité, antagonisme, synergisme). L'étude de ces stress multiples est en expansion récente dans la littérature (Baillon et al., 2016; Gandar et al., 2016; Grasset et al., 2016; Pédrón et al., 2017; Schmitz et al., 2016). Cependant, la plupart des études se concentrent sur des espèces domestiques en milieu contrôlé (i.e. laboratoire). En contexte naturel, il est difficile de prédire l'effet de la multitude de combinaisons de facteurs de stress sur les organismes sauvages, et ce en raison de la complexité du milieu naturel, et de la variabilité intraspécifique de sensibilité aux stress (Billick and Case, 1994; Whitehead et al., 2017). Différentes interactions directes et indirectes entre facteurs de stress peuvent exister: I) interactions directes entre facteurs de stress dans le milieu (par

exemple la température est susceptible de modifier les propriétés chimiques d'un contaminant et donc sa persistance) (Bailey et al., 2004 ; Noyes et al., 2009) ; et II) interactions indirectes, où les réponses physiologiques induites par un des facteurs de stress modifient la réponse à un facteur de stress secondaire (par exemple, la modification de l'activité métabolique induite par l'augmentation de la température chez les ectothermes peut affecter la biotransformation des contaminants et augmenter leur toxicité) (Noyes et al., 2009). De plus, des variations de sensibilité entre populations ayant évolué dans différents contextes peuvent modifier les effets de ces interactions (Hua et al., 2017; D. Vinebrooke et al., 2004; Fangue, 2006; Whitehead et al., 2017).

Les réponses observées chez les poissons sauvages sont donc très variables en fonction des caractéristiques physico-chimiques du milieu, du niveau de stress encouru, du niveau d'organisation biologique étudié (e.g. moléculaire, cellulaire, organe individuelle, populationnelle) et de l'historique d'exposition des populations considérées. La prise en compte de ces facteurs de variabilité (i.e. interactions entre stress, échelles d'organisation) représente un verrou scientifique majeur pour l'amélioration de la compréhension et la prédictibilité des effets des stress multiples sur les populations de poissons d'eau douce. Pour cette raison, de nombreux auteurs soulignent la nécessité de réaliser des études multi-échelles afin de mieux appréhender les effets complexes des expositions aux stress multiples en milieu naturel, et sur des populations sauvages (Côté et al., 2016; Gandar et al., 2017; Schulte, 2014).

Dans cette thèse, j'ai donc cherché à évaluer :

- 1) Les effets combinés de facteurs de stress abiotique (i.e. augmentation de température ou contamination) et biotique (i.e. parasitisme) sur l'état de santé de poissons d'eau douce *via* une approche multi-échelles (de l'échelle moléculaire à l'échelle de l'individu) (Fig. 2, O1).
- 2) La variabilité de réponses entre populations de poissons ayant des historiques d'exposition différents (Fig. 2, O2).

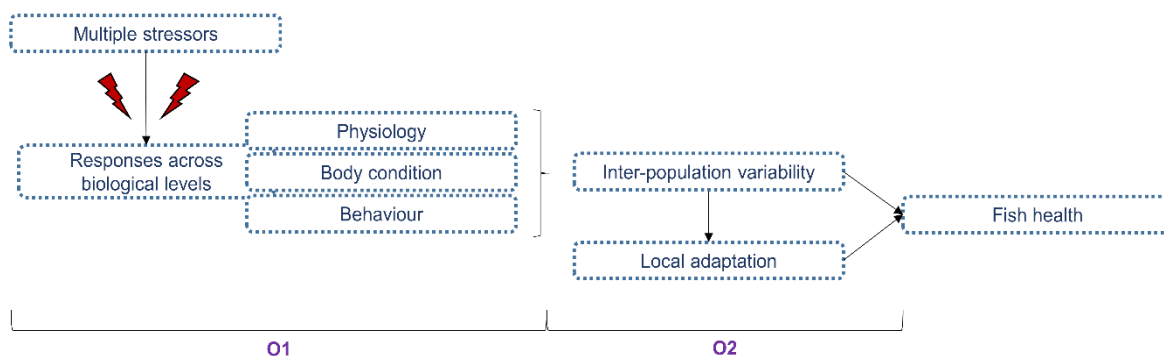



Figure 2. Schéma récapitulatif des objectifs de ce projet de recherche doctorale. L'objectif O1, correspond à l'évaluation des effets des stress multiples à travers plusieurs niveaux d'organisation biologique, de la physiologie des poissons (i.e. échelle moléculaire et cellulaire) à leur condition et leur comportement (i.e. échelle individuelle). L'objectif O2, vise à évaluer la variabilité de réponse entre populations de poissons ayant des historiques d'exposition différents. Dans le cas où de la variabilité de réponse au stress serait observée entre populations, l'adaptation locale des populations à leur environnement sera testée afin d'évaluer si la variabilité observée entre populations était adaptative (affecte de manière positive l'état de santé des poissons).

Dans ce contexte, la première partie de cette thèse s'est focalisée sur la rédaction d'une introduction portant sur les interactions entre facteurs de stress, leurs effets au travers des différentes échelles d'organisation biologique, des molécules aux populations (chapitre 1 et annexe 1).

Par la suite, et après la description des principales méthodologies utilisées lors de ce travail de doctorat (chapitre 2), trois approches complémentaires ont été utilisées :

Une approche transversale de terrain, visant à mettre en évidence les interactions potentielles entre trois gradients de stress (i.e. contamination chimique, température et pression de parasitisme) et leurs liens potentiels avec l'état de santé de populations de goujons sauvages (*Gobio occitaniae*) dans le milieu naturel (chapitre 3). L'utilisation de ce type d'approche revêt un intérêt particulier au regard de la conservation des populations de poissons sauvages face aux stress multiples puisqu'elle permet de définir les niveaux de stress auxquels sont exposés les poissons dans leur milieu naturel, et de faire un état des lieux des impacts de ces stress en condition naturelle.

Une approche expérimentale en conditions contrôlées qui se décline en 3 objectifs principaux : i) déterminer la dynamique de la réponse immunitaire en lien avec une attaque parasitaire chez une espèce de poissons d'eau douce (chapitre 4) ; ii) identifier les liens causaux entre l'exposition aux facteurs de stress, combinés ou non, et leurs effets sur l'état de santé des poissons (chapitre 5 et 6) ; et iii) identifier les




niveaux d'organisation biologique pour lesquels les réponses aux stress sont les plus marquées, de l'échelle moléculaire à l'individuelle, en tenant compte de la variabilité de réponse entre populations (chapitre 5 et 6).

Une approche de translocation réciproque en milieu naturel visant à tester l'implication de l'adaptation locale dans la variabilité de réponses entre populations dans des conditions semi-naturelles (Voir chapitre 7 partie 5.2. Adaptation locale : expérience de translocation).

Pour terminer, le chapitre 7 portera sur la synthèse et la discussion des résultats obtenus au cours de ce projet.



CHAPITRE 1
INTRODUCTION



Ce chapitre 1 a pour objectif de présenter succinctement les différents éléments nécessaires à la contextualisation de ce travail de recherche doctorale. La première partie de ce chapitre se focalise sur la présentation des concepts qui ont émergé de différentes disciplines et ont permis de définir de manière intégrée la réponse au stress. La seconde partie porte sur une présentation des pressions/facteurs de stress qui pèsent sur les écosystèmes aquatiques et la multi-exposition des poissons d'eau douce. Dans un troisième temps, il s'agit de décliner les différentes réponses qui sont déclenchées suite à l'exposition aux stress au travers de plusieurs échelles d'organisation biologique (i.e. de la molécule à l'individu). La quatrième partie vise à discuter des connaissances actuelles sur la variabilité de réponses au stress entre populations ayant évolué dans des conditions différentes. Une partie de cette introduction a été publiée dans un premier article (annexe 1) qui reprend les grandes idées présentées ici tout en précisant certains concepts notamment relatifs aux stratégies métaboliques et aux processus évolutifs.

1. Réponse au stress

Selon les disciplines considérées, la réponse d'un individu au stress se décline sous différentes formes. Par exemple du point de vue de l'endocrinologie, la réponse au stress est définie plutôt à l'échelle moléculaire, et correspond à la sécrétion d'hormones (i.e. les catécholamines et les glucocorticoïdes) suite à la stimulation du système nerveux central par un facteur de stress (Box 1). La sécrétion de ces hormones déclenche une cascade de réponses physiologiques qui permet de maintenir une homéostasie compatible avec la survie des individus (Barton, 2002; Cannon, 1932; Selye, 1956). Cependant, ces hormones ont des effets pleïotropiques et sont impliquées dans de nombreux autres mécanismes, dont la mobilisation d'énergie et la réponse anti-inflammatoire (MacDougall-Shackleton et al., 2019). La sécrétion de ces hormones joue donc plutôt un rôle de médiateur en permettant de réguler la réponse au stress elle-même et la cascade de modifications physiologiques qu'elle induit (Sapolsky et al., 2000). De plus, au niveau moléculaire, les avancées de ces dernières décennies en génomique et transcriptomique ont permis de caractériser des groupes fonctionnels de gènes dont l'expression est liée à la réponse au stress (e.g. métabolisme énergétique, immunité, gestion du stress oxydant et apoptose cellulaire) (Kassahn et al., 2009). Ainsi, à l'échelle moléculaire, la réponse au stress est souvent initiée par des modulations de l'expression de gènes qui provoquent des effets en cascade à des échelles supérieures.

Du point de vue de la physiologie, la réponse au stress correspond à l'ajustement dynamique de nombreux paramètres physiologiques qui permettent de maintenir l'homéostasie (Box 1) (McEwen and Wingfield, 2010). On parle alors d'allostasie (Box 1). La réponse au stress correspond généralement à la mise en place d'ajustements physiologiques qui peuvent limiter les conséquences négatives d'un facteur de stress sur la fitness (i.e. valeur sélective) (Box 1) des individus à long terme. Cependant, si le coût énergétique lié à ces ajustements physiologiques est trop élevé (i.e. charge allostatique) ou si le stress cause un dérèglement prolongé des mécanismes allostatiques, la capacité de l'individu à maintenir son homéostasie peut être altérée, ce

qui peut affecter son état de santé. Inspiré des concepts d'allostasie (McEwen and Wingfield, 2010), de capacité métabolique (Fry, 1947), d'allocation énergétique (Kooijman, 2010) et de tolérance thermique limitée par l'oxygène (Pörtner, 2002), le concept de tolérance énergétique au stress, permet de lier les conséquences d'un stress sur la physiologie de l'individu à celles observables aux échelles d'organisation supérieures et en particulier du comportement (Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012).

Box 1.

Définitions

Facteur de stress : perturbation, pression introduite dans un système auquel elle est étrangère ou qui y est présente naturellement mais qui, notamment en lien avec les activités humaines, excède sa gamme de variation habituelle (Barrett et al., 1976; Townsend et al., 2008).

Homéostasie : état d'équilibre dynamique qui tend à maintenir les conditions internes d'un organisme (e.g. pH, oxygène) (Cannon, 1932).

Allostasie et charge allostatique : l'allostasie est le procédé par lequel l'homéostasie est maintenue, elle caractérise donc la capacité d'un organisme à réguler les fonctions physiologiques (e.g. hormones, cytokines) qui agissent en tant que médiateurs de l'homéostasie. La charge allostatique correspond donc à la somme de coûts liés à ces fonctions régulatrices (McEwen and Wingfield, 2010). Dans ce projet, la charge allostatique correspond ainsi au pool d'énergie nécessaire (i.e. au coût) des processus de maintenance.

Fitness ou valeur sélective : espérance de la contribution relative du phénotype d'un individu aux générations ultérieures. Elle représente la performance des individus et est généralement estimée par une ou plusieurs composantes telles que la survie et l'investissement dans la reproduction (e.g. la fertilité, le nombre de descendants) (Ricklefs and Miller, 2005).

Phénotype : état d'un caractère observable qui résulte de l'interaction entre le génotype d'un individu et l'environnement dans lequel il se développe.

Syndromes comportementaux : suite de plusieurs traits comportementaux corrélés et répétables qui définissent la personnalité d'un individu au sein du continuum craintif/prudent, téméraire (i.e. shy – bold) (Réale et al., 2007; Sih et al., 2004). Cette notion a par ailleurs été proposée comme une extension du « pace of life syndrome » (i.e. mode/rythme de vie) qui intègre les traits physiologiques et d'histoire de vie dans un continuum plus large : rythme de vie lent - rapide (i.e. slow – fast). (Réale et al., 2007; Sih et al., 2004).

Réponse au stress : suite complexe d'ajustements biochimiques, physiologiques et comportementaux se manifestant suite à l'exposition à un facteur de stress. Ces ajustements permettent de minimiser les effets délétères de l'exposition, mais selon leur coût, (i.e. charge allostatique) les performances individuelles peuvent être affectées.

Ce concept de tolérance énergétique au stress place donc le métabolisme énergétique et les mécanismes de réallocation en tant qu'éléments centraux en vue d'expliquer les effets des facteurs de stress sur les individus. Ce concept suggère ainsi que sous l'effet des facteurs de stress deux stratégies métaboliques peuvent être observées, une stratégie de compensation (i.e. réallocation d'énergie entre fonctions pour subvenir à l'augmentation des coûts liés à la maintenance, ou mise en place des défenses face au stress), et une stratégie de conservation (i.e. réduction drastique du fonctionnement du métabolisme et de la réponse au stress pour réduire les coûts énergétiques) (Fig. 3). Ce concept sera exposé de manière plus détaillée dans les parties suivantes.

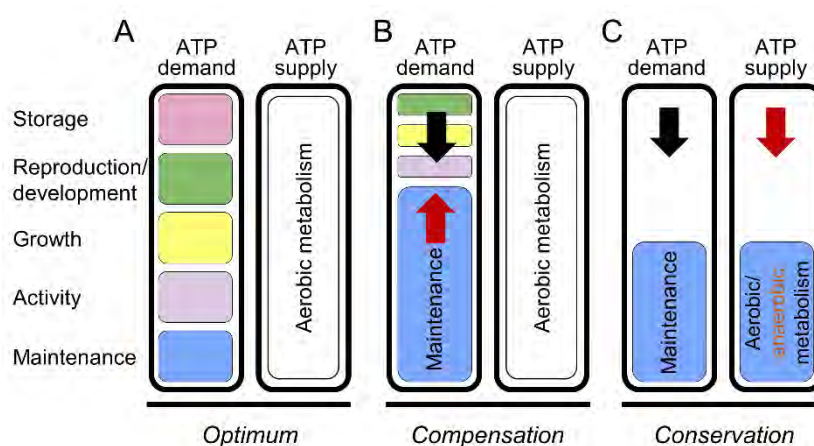


Figure 3. Concept de tolérance énergétique face au stress. En condition non stressante, la production d'ATP par le métabolisme aérobique est suffisante pour subvenir aux besoins énergétiques liés à la maintenance (e.g. renouvellement des protéines, immunité, défenses antioxydantes), à l'activité (i.e. comportement), la croissance, la reproduction. Dans ce cas, l'énergie produite en excès pourra être stockée pour une utilisation ultérieure (i.e. réserves énergétiques) (A). En condition de stress modéré, les besoins énergétiques liés à la maintenance augmentent afin de couvrir la demande induite par la réponse au stress (e.g. augmentation des défenses immunitaires, antioxydantes, réparation des dommages), et ce, au détriment d'autres fonctions, (e.g. croissance, reproduction, réserves). Ce qui résulte en une stratégie de compensation (B). En condition de stress extrême ou de stress multiples, l'augmentation de la demande énergétique et/ou l'altération des processus métaboliques sont tels qu'ils dépassent la production d'énergie du métabolisme aérobique. Le métabolisme anaérobie est alors activé en soutien sur une courte période mais un arrêt du métabolisme (i.e. dépression métabolique) s'ensuit (e.g. inhibition de la réponse au stress). C'est une stratégie de conservation (C) qui induit des dommages irréversibles et impacte la survie sur le long terme.

Du point de vue de l'étude du comportement, et donc à l'échelle individuelle, la réponse au stress est définie différemment (Box 1), selon le type de stress encouru et la demande énergétique (i.e. charge allostatique) qu'il induit. L'individu exposé peut tenter d'éviter ce facteur de stress si possible (réponse de type fuite ou « flight ») ou bien restera dans la zone d'exposition (réponse de type « fight ») (Cannon, 1932). Par exemple, en présence d'un prédateur, l'individu exposé pourra tenter de fuir ou bien de se confronter au prédateur (Wingfield, 2003). Dans le cas où l'individu est exposé de manière chronique ou bien que sa charge allostatique est élevée, il peut exprimer les

comportements typiques de la mise en place de la stratégie de compensation (i.e. réallocation d'énergie) : réduction de l'activité, de l'exploration, ce qui permet d'économiser l'énergie disponible pour la réponse au stress, induisant ainsi une réduction de la charge allostatique. Dans le cadre de l'exposition à un stress immunitaire, déclenché par l'infection par un pathogène, l'inhibition de l'activité et d'autres traits liés au comportement des individus est connue comme la « sickness behaviour », et de la même manière permet de rediriger l'énergie allouée aux comportements de routine vers la réponse immunitaire (Dantzer, 2004; Johnson, 2002).

A une échelle de temps plus longue, et du point de vue de l'évolution, la réponse au stress peut être considérée comme adaptative si elle assure la survie (e.g. réallocation d'énergie en cas de stress ponctuel et modéré) des individus ainsi que la transmission de leurs caractéristiques génétiques (i.e. génotype). Cependant, la réponse au stress peut aussi se caractériser par la réduction des performances de l'individu exposé (e.g. survie et reproduction en cas de stress chronique et/ou élevé) (Sibly and Calow, 1989). Les facteurs de stress peuvent donc être considérés comme des facteurs de sélection importants susceptibles d'induire de la divergence entre populations selon le niveau d'exposition (Hoffmann and Hercus, 2000). Ces divergences de traits entre populations peuvent alors être issues de la plasticité phénotypique (i.e. expression de phénotypes différents à partir du même génotype) ou de la variabilité génétique, mise en place via la sélection des individus ayant la meilleure fitness dans un environnement donné.

L'exposition à un facteur de stress a donc des répercussions à différentes échelles d'organisation biologique et de temps. Récemment une vision intégrée de la réponse au stress a été proposée par Schulte (2014). La réponse au stress est définie comme « une suite complexe d'ajustements biochimiques, physiologiques et comportementaux se manifestant suite à l'exposition à un facteur de stress. Ces ajustements permettent de minimiser les effets délétères de l'exposition, mais selon leur coût (i.e. charge allostatique), les performances individuelles peuvent être affectées ». Cette définition intègre donc la notion de coût énergétique et ses effets potentiels sur les performances individuelles selon le type de stress, la durée et l'intensité d'exposition, tout en prenant en compte les conséquences des facteurs de stress sur les performances et la fitness des

organismes. C'est donc cette définition qui sera retenue dans la suite de ce projet de thèse.

2. Facteurs de stress et exposition multiple

2.1. FACTEURS DE STRESS

En Europe, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2008/105/CE) impose le suivi et l'amélioration de la qualité des masses d'eau, dont les eaux superficielles continentales. Entre 2004 et 2009, environ 30% des cours d'eau européens seulement atteignaient les objectifs fixés par la Directive Européenne (Grizzetti et al., 2017). En cause, la présence de nombreuses pressions, **facteurs de stress**, qui réduisent la qualité des habitats et impactent les organismes aquatiques. Parmi ces facteurs de stress, la **contamination chimique** des cours d'eau par des substances organiques et inorganiques peut être considérée comme étant l'un des facteurs de stress les plus prépondérants actuellement (Fig. 4) (Sabater et al., 2019).

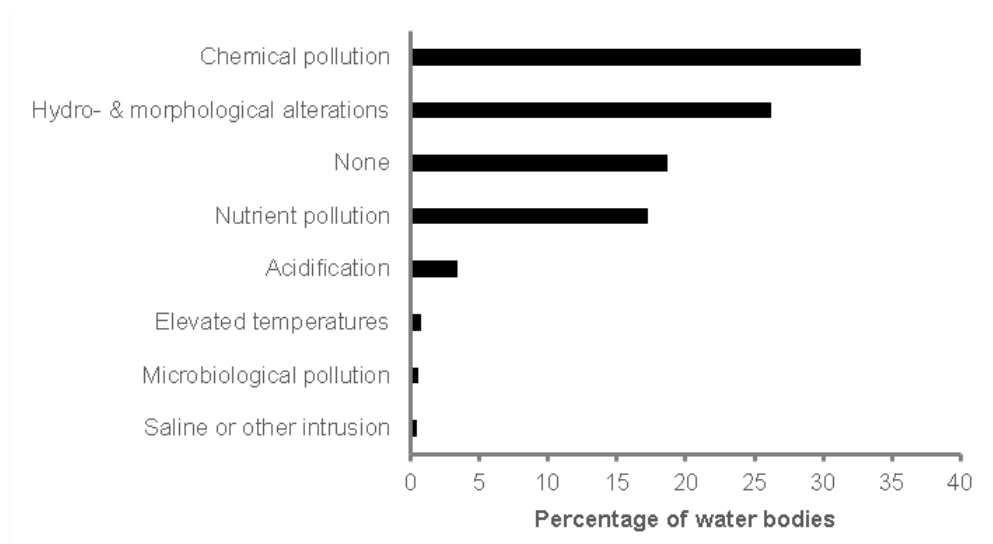


Figure 4. Occurrence des grands types de pression détectés dans les cours d'eau européens, (n=168556, plusieurs types de pressions peuvent être attribués à un même cours d'eau). Données issues de la base de donnée Européenne WISE-WFD pour l'année 2016 (<https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/wise-wfd-3#tab-european-data>), adapté de Sabater et al., 2019.

En particulier, **les métaux** (éléments traces métalliques et métalloïdes - ETMs), sont des ressources minérales exploitées par l'homme depuis des millénaires (Nriagu, 1996; Tylecote, 1987) et sont considérés comme la plus ancienne source de

contamination environnementale (Macklin et al., 1997; Pyatt et al., 2005). Du fait de leur **rémanence**, ces **contaminants inorganiques** continuent encore aujourd’hui de présenter un risque pour les êtres-vivants, même lorsqu’ils ont été émis il y a plusieurs centaines d’années (Mariet et al., 2017). Par exemple, le plomb (Pb) et le cadmium (Cd) relargués au cours des activités minières et sidérurgiques qui ont eu lieu au cours de l’histoire, restent encore actuellement biodisponibles et induisent des effets délétères chez les poissons exposés (Monna et al., 2011). En Europe, malgré les progrès réalisés en matière de contrôle de la contamination en métaux (Li et al., 2019) les émissions atmosphériques (Callender, 2014; Nriagu, 1996) et **les rejets dans les eaux superficielles** (Fig. 5 A), liés en particulier aux activités industrielles (extraction, exploitation, chimie) ainsi qu’au traitement des déchets (Fig. 5 B), continuent de contaminer de nombreux écosystèmes et de représenter un risque pour la faune aquatique, en particulier les poissons (Hopkins et al., 2004; Qu et al., 2014; Rašković et al., 2018).

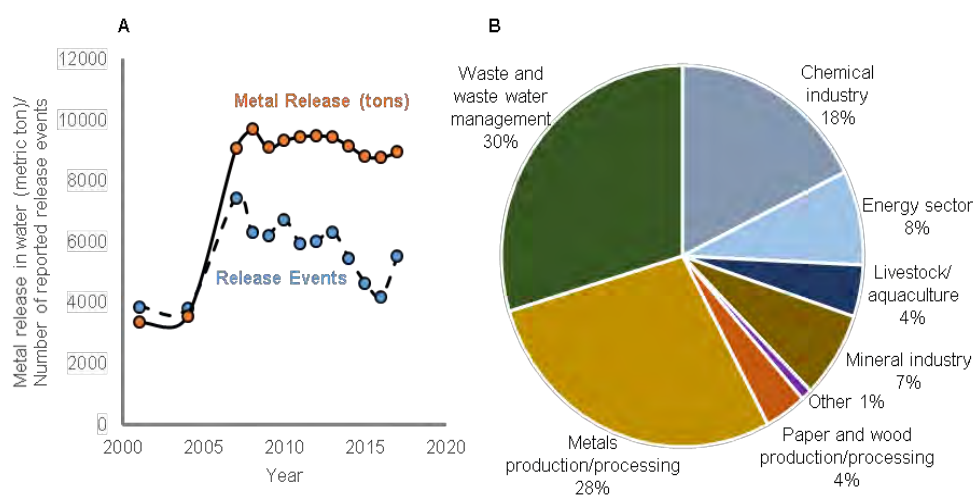


Figure 5. Evolution de la quantité (en tonnes/an) et du nombre de rejets de métaux déclarés (A) et répartition des rejets dans les eaux superficielles par secteur d’activités entre 2001 et 2017. Données issues du registre européen sur les rejets et le transfert des polluants (E-PRTR, <https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/member-states-reporting-art-7-under-the-european-pollutant-release-and-transfer-register-e-prtr-regulation-18>).

De plus, sous l'effet du réchauffement climatique, le **réchauffement des masses d'eau** est lui aussi un facteur de stress prépondérant pour les organismes aquatiques, en particulier pour les ectothermes, dont la physiologie est fortement influencée par la température du milieu (Brett, 1971; Cossins and Bowler, 1987). D'après l'étude de Sabater (2019), il s'avère que le nombre de cours d'eau suivis présentant un réchauffement significatif est inférieur à 1%, ce qui représente malgré tout plus de 1200 cours d'eau à l'échelle européenne. De plus, la fréquence et l'intensité des événements extrêmes de réchauffement et les températures moyennes des cours d'eau ont déjà augmenté au cours des dernières décennies (Isaak et al., 2012; Mantua et al., 2010). Au vu des prédictions, cette tendance est amenée à s'accroître dans les années à venir, en particulier en Europe (Fig. 6, IPCC, 2014; van Vliet et al., 2013).

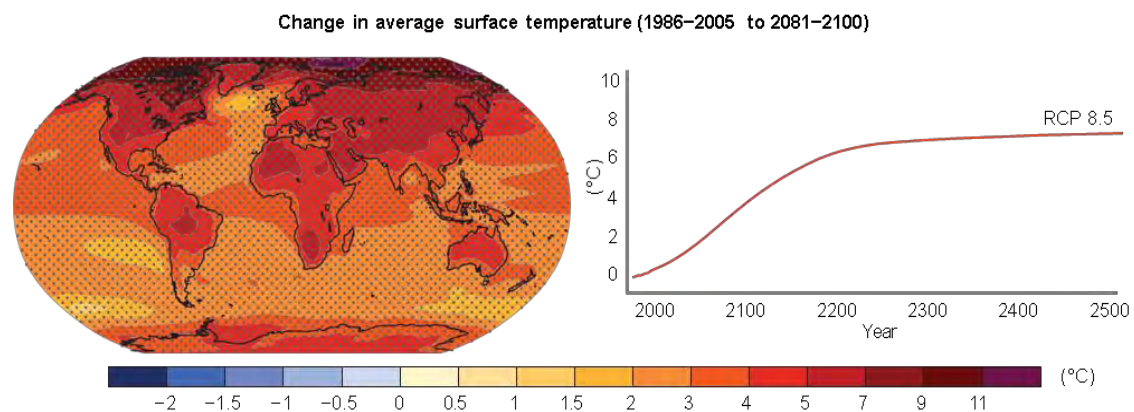
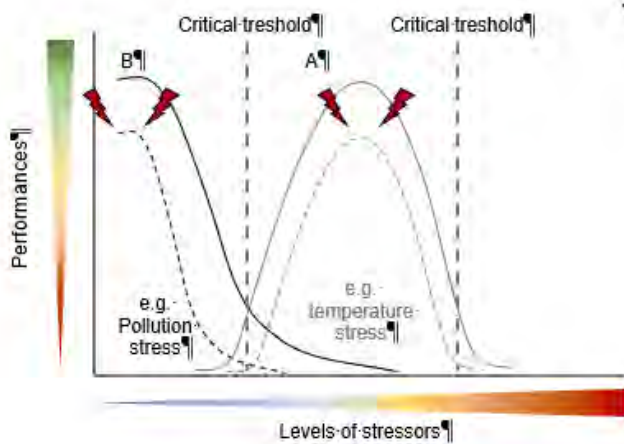


Figure 6. Changements relatifs moyens de la température de l'air basée sur des projections multi modèles pour la période 2081 - 2100 par rapport à 1986 – 2005 (scénario RCP 8.5, le plus pessimiste). Adapté de IPCC, 2014.

Par ailleurs, une augmentation des températures des eaux superficielles peut avoir des conséquences importantes pour les poissons, en fonction de l'étendue de leur gamme de tolérance thermique (Box 2, exemple stress thermique) (Mantua et al., 2010; Whitney et al., 2016). Par exemple, l'augmentation des températures entre 1978 et 2001 coïncide avec la réduction des effectifs de truite fario (*Salmo trutta fario*) observée sur le plateau suisse (Hari et al., 2006). Cependant, les auteurs de cette étude indiquent que d'autres facteurs concomitants à l'augmentation des températures, tels que la présence de pathogènes, pourraient aussi jouer un rôle prépondérant dans le déclin de ces populations de truite (Hari et al., 2006).

Box 2. Tolérance thermique :



Performances d'un individu en fonction du niveau ou du nombre de stress auquel(s) il est exposé, pour une exposition à un stress thermique (A, trait plein gris) ou des polluants (B, trait plein noir). En cas d'exposition à un second stress (e.g. contaminants et température) et donc sous stress multiples (éclairs rouges) la tolérance au stress peut être fortement réduite (traits pointillés).

La tolérance au stress peut affecter la **performance** des individus de différentes façons en fonction du type, de l'intensité et du nombre de facteurs de stress. Dans le cadre de la réponse à un stress thermique, la capacité d'un organisme à supporter une gamme de température, est appelée « gamme de tolérance thermique » et suit une fonction gaussienne (A). Dans le cadre de l'exposition à un polluant, les performances de l'individu sont réduites selon une fonction dose-réponse (B). Dans le cas d'une **exposition combinée**, par exemple à des contaminants et une augmentation de température, l'augmentation de la **demande énergétique** (i.e. maintenance, défenses) peut réduire la tolérance des individus face aux stress (A et B, traits pointillés).

NB: La tolérance au stress peut varier entre espèces, populations et individus.

Les stress biotiques tels que l'introduction de **pathogènes** allochtones ne sont que très peu pris en compte en tant que facteurs de stress alors qu'ils sont connus pour affecter les écosystèmes et leurs composantes (Preston et al., 2016). Le milieu aquatique est particulièrement propice au développement de pathogènes car de nombreux parasites dépendent en partie ou en totalité de l'eau afin de compléter leur cycle de vie (Marcogliese, 2008). En relation avec les activités humaines, notamment le commerce, le déplacement d'espèces et le changement climatique, le nombre de cas recensés de nouvelles infections a fortement augmenté chez les espèces aquatiques d'eau douce au cours des dernières décennies (Adlard et al., 2015). Ce constat est particulièrement fort chez les poissons (Fig. 7, Johnson and Paull, 2011; Reid et al., 2019) pour lesquels, cette augmentation drastique peut avoir des conséquences préjudiciables pour le maintien des populations (Bakke et al., 2007; Krkošek et al., 2007).

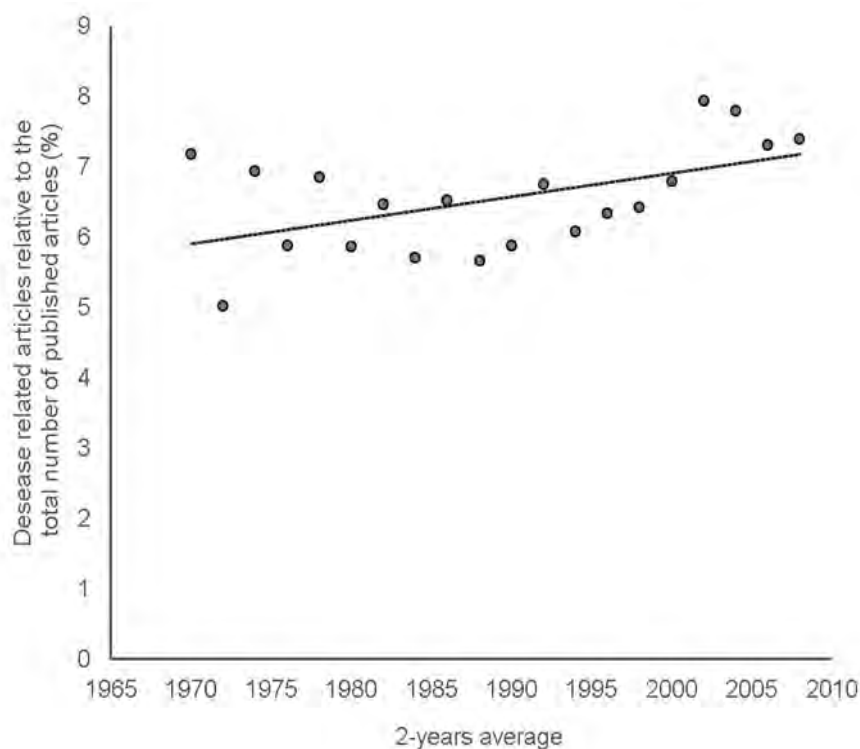


Figure 7. Evolution du nombre de publications portant sur les maladies infectieuses chez les poissons d'eau douce corrigée par l'effort de recherche (publication total) et l'autocorrélation temporelle entre 1970 et 2009 (en pourcentage). Chaque point est moyenné sur une période de 2 ans. $R^2_{adj} = 0.13$, $P = 0.021$. La méthode de correction utilisée permet de circonvenir à l'augmentation concomitante du nombre d'infection recensée et de l'intérêt croissant pour cette problématique. Adapté de Johnson and Paull, 2011.

Par exemple, la Maladie Proliférative du Rein (MRP ou PKD « Proliferative Kidney Disease »), probablement originaire d'Amérique du Nord et qui se serait propagée vers l'Europe, est la cause d'épisodes de mortalité sévères chez les salmonidés, en aquaculture comme pour les populations sauvages (Henderson and Okamura, 2004; Okamura et al., 2011; Sterud et al., 2007). Actuellement, l'expansion géographique ainsi que l'intensité et la fréquence croissante des pics de mortalité recensés chez les populations de poissons sauvages en lien avec la MRP seraient étroitement liés à l'augmentation des températures de l'eau (Carraro et al., 2016; Tops et al., 2006). Cette **altération des régimes thermiques** aurait pour effet de modifier à la fois la prolifération du **parasite** (e.g. augmentation de la production de spores et allongement de la période d'infectivité Tops et al., 2009) et d'**altérer le système immunitaire** de leur hôte (Bailey et al., 2017). Un autre exemple est celui des gyrodactyles (*Gyrodactylus salaris*) dont la prolifération sur le territoire norvégien au cours des années 1970 a entraîné le déclin des populations de saumons (*Salmo salar*) sauvages et d'élevage (Bakke et al., 2007). La dispersion de ce parasite hautement pathogène représente d'ailleurs encore aujourd'hui une cause de préoccupation pour la **conservation des populations** de salmonidés dans le bassin de la mer du Nord. Les parasites sont donc des facteurs de stress biotique importants, qui doivent être étudiés dans un contexte de stress multiples.

2.2. STRESS MULTIPLES

Historiquement, les effets des stress sur les organismes ont été étudiés de manière isolée (Folt et al., 1999). Cependant, dans le milieu naturel, les poissons sauvages sont souvent exposés à une **multitude de facteurs de stress** de manière combinée, tels que la **contamination, la température, le parasitisme** (Breitburg et al., 1998; Folt et al., 1999). Actuellement il apparaît que plus de 40% des cours d'eau européens sont impactés par la présence de 2 à 3 facteurs de stress (Fig. 8). Ainsi, les deux dernières décennies ont vu l'émergence de nombreuses études visant à évaluer les **effets combinés** des stress sur les organismes, en vue de se rapprocher des conditions naturelles et d'améliorer notre compréhension des phénomènes actuels (i.e. crise de la biodiversité) (Anacleto et al., 2018; Bowen et al., 2006; Bruder et al., 2017; Christensen

et al., 2006; Gandar et al., 2017; Heath et al., 1994; Jackson et al., 2016; Lange et al., 2018; Liess et al., 2016; Mantyka-Pringle et al., 2014; Nöges et al., 2016; Petitjean et al., 2019a; Schinegger et al., 2016; Teichert et al., 2016; Townsend et al., 2008).

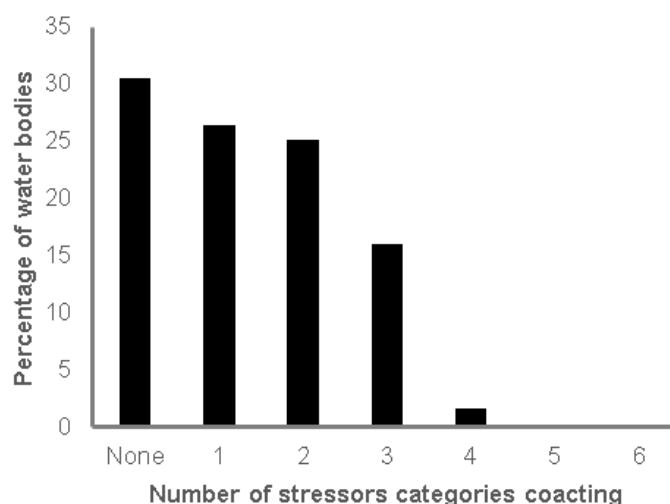


Figure 8. Occurrence (en pourcentage) de la présence de stress individuels ou multiples (>1) sur les cours d'eau européens (n=103250). « None » correspond aux cours d'eaux où aucune des pressions suivies n'a été recensée. La liste des pressions considérées ici n'étant pas exhaustive, le nombre de cours d'eau non impactés par les facteurs de stress est susceptible d'être sous-évalué. Cette liste tient compte des pressions rapportées sur la figure 4. Données issues de la base de donnée Européenne WISE-WFD pour l'année 2016 (<https://www.eea.europa.eu/data-and-maps/data/wise-wfd-3#tab-european-data>). Adapté de Sabater et al., 2019.

Etant donnée la grande diversité de facteurs de stress susceptibles d'interagir et la **variabilité de réponses** entre écosystèmes, populations et individus, il est encore, à l'heure actuelle, difficile de prédire les effets des **stress combinés** (Crain et al., 2008). En effet, selon les stress considérés et les caractéristiques environnementales, les effets des **facteurs de stress** peuvent être modulés de multiples façons en fonction de leur séquence, mode d'action, intensité, durée (Billick and Case, 1994; Breitburg et al., 1998).

Tout d'abord, les facteurs de stress peuvent **interagir directement dans le milieu**. Par exemple, la température et la contamination peuvent modifier le cycle de vie des parasites et donc la dynamique d'infection de leurs hôtes (Bakke et al., 2007; Barber et al., 2016; Karvonen et al., 2010; Macnab and Barber, 2012; Pietrock and Marcogliese, 2003). De plus, un facteur de stress peut aussi **affecter la réponse physiologique d'un organisme face un facteur de stress secondaire**.

Par exemple, la température et la contamination peuvent altérer la physiologie (e.g. immunité) des poissons et donc modifier leur susceptibilité aux parasites (Dittmar et al., 2014; Paul et al., 2014; Sheath et al., 2016; Sures, 2006). Ainsi les facteurs de stress peuvent affecter **l'état de santé** des poissons de diverses manières, soit directe ou indirecte. En ce sens, un cadre conceptuel a été développé afin de caractériser le type d'**interaction** observé et tenter de prédire ses effets (Fig. 9) (Côté et al., 2016; Crain et al., 2008; Folt et al., 1999). Dans le cas où deux facteurs de stress A et B ont des effets indépendants (i.e. pas d'interaction), 3 sous-catégories peuvent être observées : des effets de dominance (i.e. l'effet du facteur de stress B prend le pas sur l'effet de A), des effets multiplicatifs (i.e. l'effet cumulé de A et de B est supérieur à celui du stress le plus impactant mais reste inférieur au phénomène d'additivité) ou des **effets additifs** (i.e. les effets de A et de B s'additionnent) (Fig. 9). Au contraire, lorsque les facteurs A et B **interagissent**, deux cas de figure sont possibles : un **effet antagoniste** (i.e. l'effet des deux stress combinés est inférieur à la somme de leur effet individuel) ou un **effet synergique** (i.e. l'effet des deux stress combinés est supérieur à la somme de leur effet individuel) (Fig. 9).

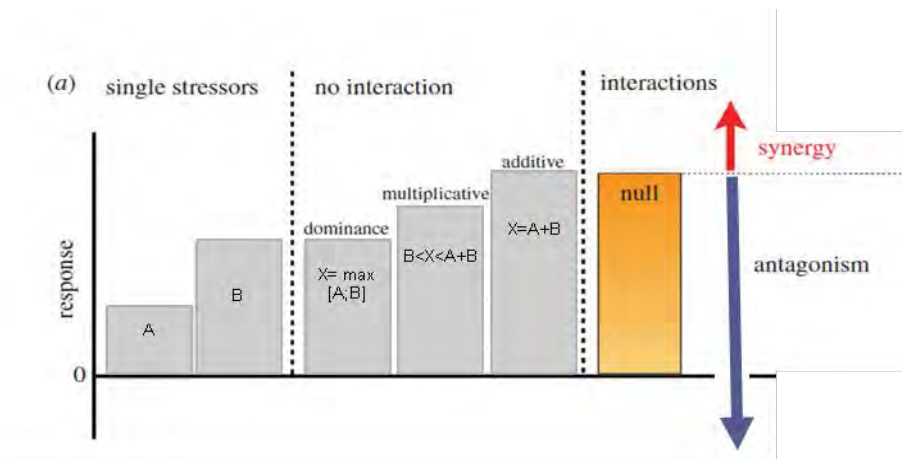


Figure 9. Type d'effets induits par les interactions entre deux facteurs de stress A et B, X correspond à l'effet de l'exposition multiple ; la barre orange correspond à l'effet additif attendu lors de l'exposition combinée à A et B. Dans le cas où l'effet combiné observé est supérieur à l'effet additif attendu, l'interaction est dite synergique, dans le cas contraire, elle est dite antagoniste. Adapté de Côté et al., 2016.

Ce cadre conceptuel permet de déterminer le type d'interaction entre facteurs de stress et les effets négatifs potentiels qui en découlent. Récemment, plusieurs propositions d'implémentation de ce concept ont été faites (Brook et al., 2008; Piggott et al., 2015),

cependant la suite de ce manuscrit se basera sur la vision classique des effets interactifs explicités par Folt et al. (1999) et Crain et al. (2008).

3. Effets multi-échelles

La réponse induite par l'exposition à un ou plusieurs facteurs de stress se décline au travers de plusieurs échelles d'organisation (Ricklefs and Wikelski, 2002). Depuis une vingtaine d'années, de nombreux auteurs plaident pour une utilisation d'approches multi-échelles et donc interdisciplinaires afin de mieux appréhender la **cascade d'effets** induite par l'exposition aux facteurs de stress et d'améliorer les méthodes de **conservation des populations de poissons** (Carey, 2005; Cooke et al., 2013; Horodysky et al., 2015; Wikelski and Cooke, 2006). En effet, l'utilisation d'approches complémentaires empruntées à la **physiologie animale** et à l'**écologie** permet de mieux intégrer les effets observés des individus aux populations. Cette approche intégrée permet d'améliorer notre compréhension des effets des stress pour le maintien des populations de poissons (Horodysky et al., 2015).

Dans un contexte de multi-exposition, le concept de **stratégie métabolique dans le cadre de la tolérance au stress** est particulièrement intéressant afin d'évaluer la dépense énergétique lié à la durée, l'intensité et les **interactions entre facteurs** de stress et leur conséquences aux **échelles d'organisation** supérieures (Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012). En effet, selon ce concept (Fig. 10), l'énergie peut être allouée aux **fonctions de maintenance** (e.g. renouvellement des protéines, détoxification, défenses, réparation des dommages cellulaires, Fig. 10, « standard energy power » en bleu), aux fonctions de routine (e.g. comportement de locomotion, de nourrissage, Fig. 10 « routine energy power ») ou à la croissance somatique ou gonadale (croissance, reproduction), liées à la fitness de l'organisme (Fig. 10, « energy surplus » en rouge). Ainsi, en conditions non stressantes (Fig. 10, à gauche), l'énergie est allouée prioritairement à la maintenance, puis aux **fonctions de routine**, et enfin, le surplus est investi dans la **croissance somatique** (i.e. augmentation de la taille du corps et des réserves énergétiques) et la croissance gonadale (i.e. investissement reproductif).

Lors de l'exposition à **un stress unique et/ou modéré**, une **stratégie de compensation** peut se mettre en place. Dans ce cas, les mécanismes de **réallocation énergétique ou compromis d'allocation** (i.e. trade-offs) permettent d'augmenter la quantité d'énergie allouée à la maintenance (e.g. détoxification, immunité, défenses antioxydantes) pour faire face au stress, et ce, au détriment des fonctions de routine (e.g. comportement) et de la croissance (Fig. 10) (Kooijman, 2010; Sokolova, 2013). Dans ce cas, la réponse au stress est adéquate et permet de limiter les dommages cellulaires et de **maintenir une bonne survie et une fitness élevée**.

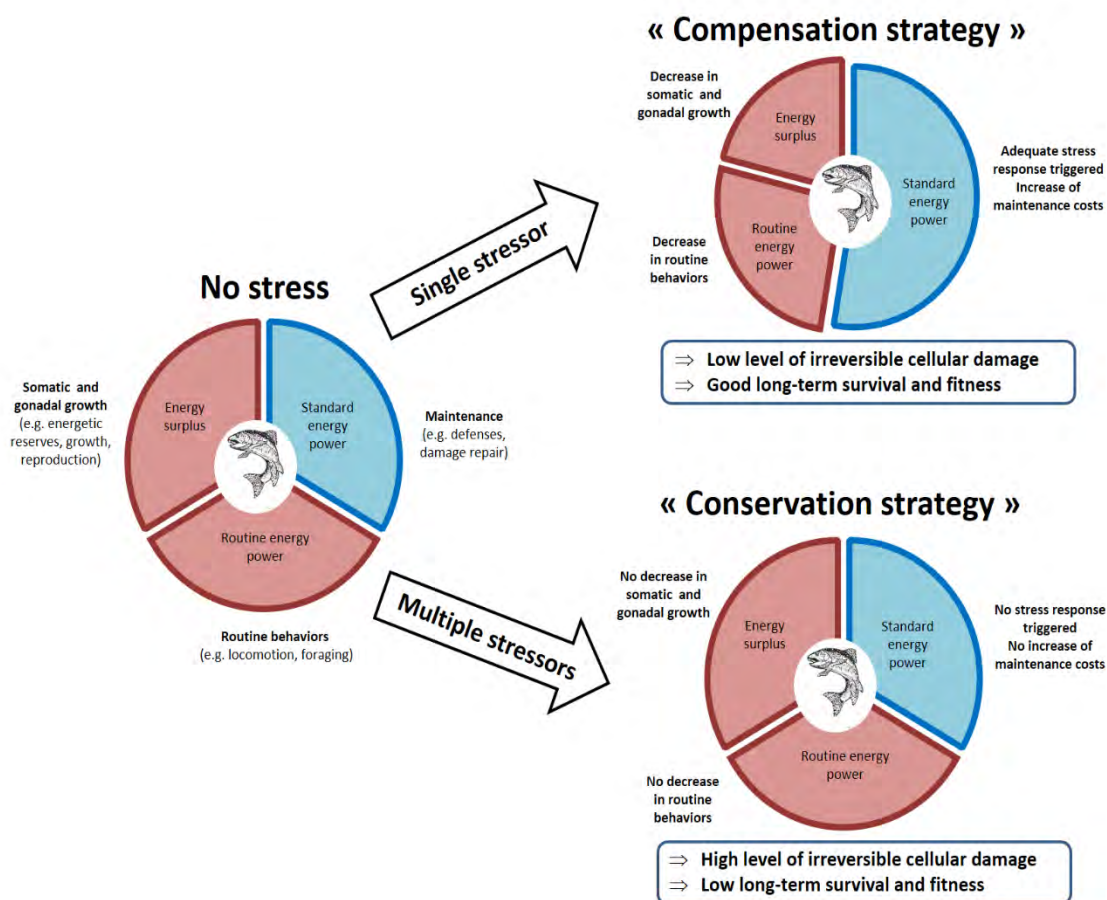


Figure 10. Représentation schématique du concept de tolérance énergétique au stress et stratégies métaboliques (Sokolova et al. 2013). Sans stress (à gauche), l'énergie est allouée à la maintenance (i.e. standard energy power, en bleu : défenses immunitaires et antioxydantes, réparation des dommages), au comportement de routine (e.g. routine energy power, en rouge : locomotion, alimentation), puis à la croissance somatique et gonadale (i.e. energy surplus, en rouge : croissance, reproduction, réserves). Sous stress modéré et/ou unique, une stratégie de « compensation » (en haut à droite) serait déclenchée et permettrait d'augmenter l'énergie allouée à la maintenance au détriment des comportements de routine et de la croissance, ce qui limite les dommages cellulaires ainsi que les effets sur la survie et la fitness à long terme. Sous stress intenses et/ou multiples en revanche, la réponse au stress serait bloquée (en bas à droite), ce qui ne modifie pas l'allocation d'énergie par rapport au contrôle (i.e. sans stress), mais au prix de dommages oxydatifs et cellulaires et un coût important en terme de survie et de fitness. Figure tirée de Petitjean et al. 2019b.

Lors d'une exposition à un **stress plus intense ou plus long, ou encore lorsque deux facteurs de stress interagissent** de manière synergique, une **stratégie de conservation** peut être observée (Petitjean et al., 2019a; Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012). Dans ce cas, la **demande énergétique liée à l'exposition aux stress est trop importante** par rapport au budget énergétique total de l'organisme, ce qui peut résulter en un **blocage de la réponse au stress** (i.e. arrêt métabolique). Dans ce cas, les mécanismes de **réallocation énergétique sont stoppés** sur le court terme au prix de dommages importants exprimés principalement à des niveaux d'organisation fins, c'est-à-dire des **dommages cellulaires** (e.g. lyses cellulaires, apoptose) et **moléculaires** (e.g. dommages oxydatifs, érosion des télomères). Dans ce cas, la **survie à long terme peut être impactée négativement** et s'accompagner d'une **diminution de la fitness** (Fig. 10) (Monaghan et al., 2009; Petitjean et al., 2019b; Sokolova, 2013).

Au cours des deux dernières décennies, l'utilisation grandissante des **approches omiques** a permis d'étudier les **mécanismes moléculaires** qui sous-tendent la **réponse au stress** (e.g. pathogènes : Reyes-Becerril et al., 2011; Rodriguez et al., 2008 ; température : Dittmar et al., 2014; Yang et al., 2016 ; contaminants : Costa et al., 2011; Craig et al., 2007). Ces études ont permis de montrer que l'**immunité, la gestion du stress oxydant, le métabolisme** et l'**apoptose cellulaire** sont des mécanismes centraux dans la réponse au stress (Kassahn et al., 2009). Nous avons donc ciblé ces traits de réponse dans le cadre de cette thèse.

3.1. REPONSE IMMUNITAIRE

Chez les poissons, le système immunitaire inné joue un rôle particulièrement important dans la lutte contre les pathogènes (Magnadóttir, 2006; Secombes and Wang, 2012). Suite à l'infection par un pathogène, une cascade de réponses permet d'éliminer les pathogènes (Fig. 11).

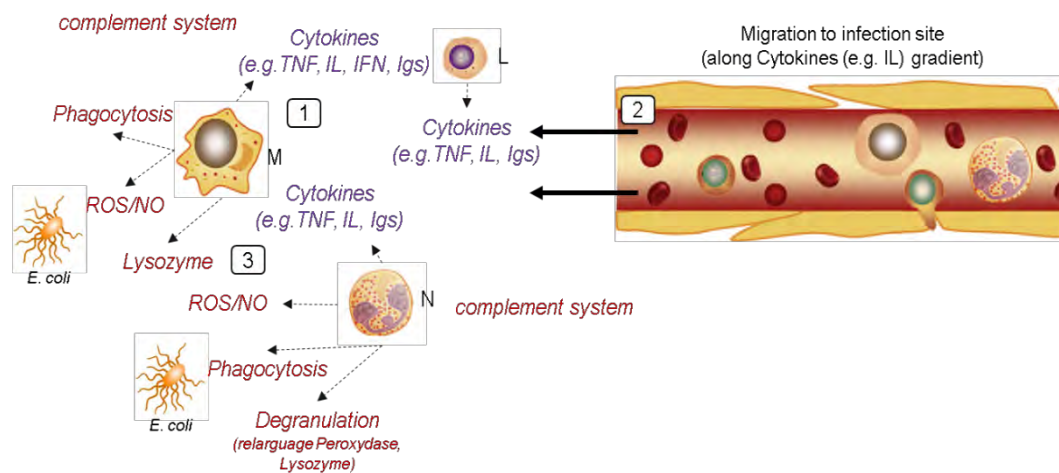


Figure 11. Schéma simplifié de la réponse immunitaire innée chez les poissons (Téléostéens). Suite à l'infection par un pathogène (e.g. une bactérie : *E. coli*), une cascade de réponses est initiée. Les monocytes/macrophages (M) et neutrophiles (N) présents ou recrutés sur le site d'infection produisent des cytokines (e.g. Interleukines IL, Interférons IFN ; Facteur de nécrose tumorale TNF) (1). Puis, la sécrétion des cytokines par les monocytes/macrophages ainsi que les neutrophiles entraînent le déclenchement de la réponse inflammatoire et induit le recrutement d'autres cellules immunitaires (e.g. monocytes (M), neutrophiles (N) et les lymphocytes B (L)) sur le site d'infection (2). Les cellules recrutées vont alors phagocyter les pathogènes, ou les détruire via la production d'enzymes lytiques (e.g. lysozyme) et d'espèces réactives à l'oxygène (i.e. peroxydase). Le système du complément joue également un rôle important chez les poissons en participant notamment à la destruction des pathogènes, à la promotion de la réponse inflammatoire et la régulation de la réponse adaptative. Adapté de Zhu et al. 2013

Tout d'abord les antigènes des pathogènes induisent le **recrutement de cellules immunitaires** (Ellis, 2001; Magnadóttir, 2006). En particulier, les monocytes/macrophages et neutrophiles constituent les premières cellules impliquées dans la réponse immunitaire. Ces cellules, présentes ou recrutées sur le site d'infection produisent des **cytokines (e.g. Interleukines IL, Interférons IFN; Facteur de nécrose tumorale TNF)** qui entraînent le déclenchement de la **réponse inflammatoire** en induisant le recrutement d'un plus grand nombre de **cellules de l'immunité (e.g. monocytes, neutrophiles et lymphocytes B)** sur le site d'infection (Havixbeck and Barreda, 2015; Secombes and Wang, 2012; Zhu et al., 2013). Les cellules recrutées sont alors impliquées dans la phagocytose ou la destruction des pathogènes via la production d'enzymes lytiques (e.g. lysozyme, myélo-peroxydase) et **d'espèces réactives à l'oxygène** (Alexander and Ingram, 1992; Quade and Roth, 1997; Rodriguez et al., 2008).

Les cytokines jouent donc un rôle prépondérant dans la mise en place et le bon déroulement de la réponse immunitaire. Ainsi, dans un contexte d'exposition au stress, l'augmentation des températures (Dittmar et al., 2014), les contaminants (Bougas et al., 2016) et les pathogènes (Gorgoglione et al., 2013; Reyes-Becerril et al., 2011), peuvent moduler l'expression des gènes liés à la production des cytokines (i.e. signalisation cellulaire) et donc perturber la mise en place ou la régulation de la réponse immunitaire. La **dérégulation de la réponse immunitaire** (i.e. inflammatoire) peut alors engendrer une **surproduction d'espèces réactives à l'oxygène** (i.e. stress oxydant) et entraîner la formation de **lésions cellulaires** par exemple dans le foie (e.g. hepatotoxicité) (Finkel and Holbrook, 2000; Halliwell, 2006; Halliwell and Gutteridge, 2015; Sasaki et al., 2002).

Ainsi, sous l'effet des **stress multiples** (i.e. température et challenge immunitaire ou contamination et challenge immunitaire), des **effets interactifs sont attendus** mais leur nature est incertaine et peut varier en fonction du type de contaminants et de sa concentration (Aliko et al., 2018; Dautremepuits et al., 2004; Khangarot and Tripathi, 1991) ou du niveau d'augmentation de la température (Dittmar et al., 2014; Martins et al., 2011). De plus, la mise en place de la **réponse immunitaire est connue pour être coûteuse en terme d'énergie**, et par conséquent est susceptible d'affecter d'autres fonctions telles que le métabolisme énergétique (King and Swanson, 2013; Lochmiller and Deerenberg, 2000; Rauw, 2012).

3.2. METABOLISME ENERGETIQUE

Le **métabolisme énergétique** joue un rôle central au cours de la vie des organismes en participant au maintien de l'homéostasie et via les mécanismes **d'allocation énergétique** vers différentes fonctions qui définissent la fitness des individus. Cependant dans le cadre de l'exposition à un facteur de stress ce métabolisme énergétique peut être perturbé (Sokolova et al., 2012). En effet, au cours de la réponse aux stress, l'activité métabolique et l'activation des gènes codant associés peuvent être impactées (e.g. par la température : Gasset et al., 2014 ; les contaminants : Gonzalez et al., 2005; Lin et al., 2011 ; et les pathogènes : Ellison et al., 2018).

En particulier, l'augmentation de la température peut entraîner une augmentation de l'activité métabolique et donc de l'acquisition d'oxygène afin de pallier l'élévation des coûts liés à la maintenance (e.g. turnover des protéines, défenses antioxydantes) (Pörtner and Farrell, 2008). Cependant, à un certain degré d'augmentation, dépendant de la **gamme de tolérance** de l'individu (Box 2), la capacité à ajuster la quantité d'oxygène entrant dans les réactions métaboliques, et donc à produire de l'énergie, peut être limitée (i.e. concept de tolérance et capacité thermique limitée par l'oxygène - OCLTT) (Pörtner, 2002). Le métabolisme anaérobie peut alors permettre de subvenir aux **besoins énergétiques** mais seulement sur une courte période. La contamination de l'eau par les ETMs peut, quant à elle, soit augmenter l'activité métabolique (Beaumont et al., 1995; Campbell et al., 2002), (e.g. compensation des coûts de détoxification des polluants), soit la réduire en lien avec la réduction de la capacité des poissons à acquérir de l'oxygène (De Boeck et al., 1995) en perturbant la production d'enzymes et protéines impliquées dans la synthèse d'hémoglobine (i.e. acide delta-aminolévulinique déshydratase) (Wood et al., 2011) ainsi que la respiration cellulaire (e.g. glycolyse, cycle de krebs, chaîne de transport des électrons) (Couture and Kumar, 2003). L'infection par des parasites, et plus généralement le challenge immunitaire qu'ils induisent, entraîne une augmentation de l'activité métabolique afin de pallier **l'augmentation de la demande énergétique** liée à la mise en place de la réponse immunitaire, connue pour être coûteuse en énergie chez de nombreux vertébrés (Bonneaud et al., 2016; Martin et al., 2003; Ots et al., 2001)

Ainsi le métabolisme énergétique peut être affecté par les différents facteurs de stress tout au long de la chaîne de réaction biochimique permettant la production d'énergie (i.e. Adénosine TriPhosphate - ATP). La cascade de réponses induite par les modifications de l'expression des gènes liés au métabolisme peut alors permettre de **compenser les coûts énergétiques** induits par la réponse au stress en stimulant l'activité des mitochondries, la **mobilisation des réserves énergétiques** (i.e. glucides, protéines et lipides) ainsi que la **réallocation énergétique entre fonctions** (i.e. maintenance, croissance, comportement) (i.e. stratégie de compensation) (Sokolova et al., 2012). Ces réponses au stress aux échelles inférieures peuvent avoir un effet sur l'échelle individuelle, par exemple la condition des individus. Ainsi, l'augmentation des températures (Gandar et al., 2017; Petitjean et al., 2019a), la contamination

(Clements and Rees, 1997) ainsi que la réponse immunitaire (Bonneaud et al., 2003; Bonneaud et al., 2016; Wang et al., 2012) entraînent généralement une mobilisation des réserves énergétiques stockées dans différents organes, induisant la réduction de leur masse relative et plus globalement une perte de masse significative chez les individus exposés (Franke et al., 2017; McNamara et al., 2013; Monaghan et al., 2009).

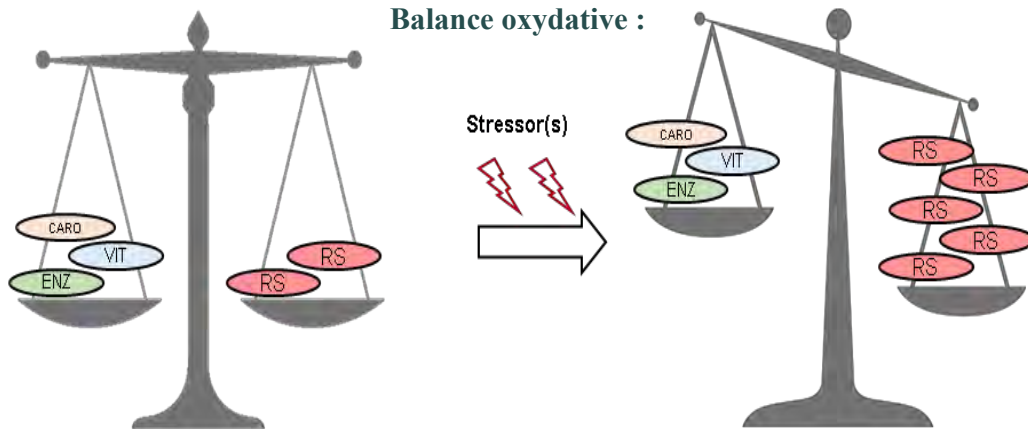
3.3. STRESS OXYDANT

L'augmentation de l'activité métabolique liée à la réponse au stress ainsi que le déclenchement de la réponse immunitaire causent la **production d'espèces réactives à l'oxygène** (Box 3) (Balaban et al., 2005; Cherry and Piantadosi, 2015; Costantini and Møller, 2009). Par ailleurs, l'exposition à des ETMs induit également une production d'espèces radicalaires et la déplétion des enzymes et molécules antioxydantes (Birnie-Gauvin et al., 2017; Lushchak, 2011; Sevcikova et al., 2011). Afin de contrebalancer la production d'espèces réactives à l'oxygène, certains gènes tels que la **catalase CAT** ou encore la **gluthathione peroxydase GPX** sont activés et produisent des **enzymes antioxydantes** (Box 3) (Do et al., 2019; Woo et al., 2009). De plus, dans le cadre de l'exposition aux ETMs, d'autres mécanismes de défense impliquant la production de **metallothionéines MTL** sont activés afin de permettre la gestion et l'excrétion des métaux (i.e. détoxification) (Knapen et al., 2004; Knapen et al., 2005). Cependant, lors de l'exposition à un stress intense ou bien à plusieurs facteurs de stress, l'équilibre entre la production d'espèces réactives à l'oxygène et d'agents antioxydants peut être perturbé. Il en résulte la production de **stress oxydant** (Box 3) susceptible d'entraver le fonctionnement des mitochondries et de la réponse immunitaire et d'induire des **dommages cellulaires** (e.g. hépatotoxicité) (Ercal et al., 2001; Finkel and Holbrook, 2000; Sasaki et al., 2002) et moléculaires, notamment à l'ADN (génotoxicité, Santos et al., 2016). Ces dommages moléculaires peuvent alors mener à l'activation de gènes impliqués dans l'**apoptose cellulaire** (e.g. Bcl-2, **caspase CASP3** Gross et al., 1999; Martinou and Youle, 2011), ce qui peut entraîner des **lésions, par exemple dans le foie** (e.g. hépatotoxicité). De plus, le stress oxydant peut provoquer le **raccourcissement des télomères** (Reichert and Stier, 2017) qui peuvent avoir des répercussions aux échelles d'organisation supérieures. Les télomères sont des répétitions de séquences

d'ADN non codant présentes à l'extrémité des chromosomes des cellules eucaryotes. Ces séquences raccourcissent à chaque division cellulaire et ce raccourcissement est accéléré par le stress oxydant, ce qui peut induire la sénescence et **l'apoptose des cellules** lorsque leur taille est trop courte (Bernadotte et al., 2016; Reichert and Stier, 2017; Watson et al., 2015). L'érosion des télomères peut participer au phénomène de **vieillesse accéléré** et est associée à une plus forte probabilité **d'extinction des populations sauvages** (Dupoué et al., 2017). Des études récentes montrent que l'augmentation de la température (Debes et al., 2016; Simide et al., 2016), l'infection par des parasites (Stauffer et al., 2017) et la présence de contaminants (Louzon et al., 2019) peuvent induire un raccourcissement significatif des télomères et potentiellement précipiter la mise en place des **mécanismes de sénescence** (Hausmann and Marchetto, 2010). Cependant plus d'études sont nécessaires afin de mieux comprendre le lien entre l'exposition aux stress et le raccourcissement de ces séquences répétées d'ADN, en particulier dans le milieu naturel et sous l'effet des stress multiples.

Au final, les **3 trois grandes voies physiologiques** décrites (i.e. immunité, métabolisme énergétique et stress oxydant) sont **interdépendantes et mobilisées dans le cadre de la réponse à de nombreux facteurs de stress**. Le déclenchement de la réponse au stress apparaît donc comme étant extrêmement **coûteux** en particulier dans le cadre d'exposition multiples (Gandar et al., 2017), ce qui peut avoir des conséquences importantes à l'**échelle individuelle**, sur la condition de l'individu ainsi que son comportement.

Box 3. Balance oxydative :



Représentation schématique simplifiée de la modification de la balance oxydative en condition d'allocation énergétique optimale (sans stress, à gauche) et au cours de la réponse au(x) stress (à droite). Molécules oxydantes (RS = reactive species), Molécules antioxydantes (ex : CARO = Caroténoïdes, VIT = Vitamines E and C, ENZ= Enzymes comme la glutathione peroxydase, la superoxyde dismutase SOD, la catalase CAT)

Les mitochondries sont impliquées dans la production d'énergie permettant le maintien de l'homéostasie cellulaire. Elles consomment 85 à 90% de l'oxygène qui parvient à la cellule (i.e. activité métabolique). Lors de la production d'énergie, les mitochondries produisent naturellement des espèces réactives (RS), en particulier à base d'oxygène (e.g. O_2^- , OH^- , H_2O_2) et dans une moindre mesure d'azote (e.g. NO). De la même manière et comme présenté précédemment, la réponse immunitaire, notamment inflammatoire induit elle aussi la production de RS. En condition non-stressante, la production de RS est contrebalancée par les activités d'enzymes antioxydantes endogènes (e.g. superoxyde dismutase: SOD, Catalase: CAT, Glutathione peroxydase: GPX) et l'apport de molécules non-enzymatiques et exogènes via l'alimentation (e.g. Vitamines E, C et caroténoïdes) qui vont prendre en charge les RS. En condition stressante, l'augmentation de la demande énergétique entraîne une augmentation de l'activité des mitochondries, qui entraîne une surproduction de RS, et crée un déséquilibre appelé « stress oxydant ». Ces RS non prises en charge peuvent alors causer des dommages importants notamment aux membranes cellulaires (lipides) et à l'ADN et se répercuter aux échelles d'organisation supérieures (Birnie-Gauvin et al., 2017; Monaghan et al., 2009; Pamplona and Costantini, 2011).

3.4. COMPORTEMENT

Le comportement (e.g. l'activité, l'exploration, la recherche de nourriture, la sociabilité), est également l'un des premiers trait ajusté lors d'une exposition à un stress (i.e. réponse « fight or flight » développée dans la partie : 1. Réponse au stress) (Wong and Candolin, 2015). Par exemple, des individus exposés à des hausses de température présentent une réduction de leur sociabilité (e.g. réduction du nombre de contact entre congénaires, de la cohésion/aggrégation du groupe) (Bartolini et al., 2015; Colchen et al., 2016; Hurst, 2007) et une augmentation de leur activité (e.g. de nage, exploratoire et de recherche de nourriture) (Biro et al., 2010; Hurst, 2007; Petitjean et al., 2019a). Ces réponses peuvent, dans certains cas, permettre aux poissons exposés de réduire la compétition entre congénères et d'augmenter leur capacité à **acquérir de la nourriture** afin de compenser les coûts liés à **l'augmentation de la demande métabolique** (Bartolini et al., 2015; Colchen et al., 2016; Johansen and Jones, 2011; Pitcher, 1986).

De la même manière, les **contaminants altèrent le comportement** exploratoire (Grunst et al., 2018; Jacquin et al., 2017), l'activité (Little and Finger, 1990) et la sociabilité (Koltes, 1985) des poissons mais cela s'avère variable en fonction du type de contaminants considéré et de sa concentration (Atchison et al., 1987; Scott and Sloman, 2004). Par exemple, des truites exposées au cuivre présentaient une réduction de leur activité de nage (Handy et al., 1999). La réduction de l'activité de nage pourrait permettre de réduire l'accumulation des contaminants et/ou d'économiser de l'énergie en faveur des stratégies de détoxification (Campbell et al., 2002) (i.e. stratégie de compensation). Cependant, ces effets peuvent aussi être liés à des **altérations du système olfactif** (Scott et al., 2003; Ward et al., 2008) ainsi que du **système nerveux** (Sloman and McNeil, 2012; Sloman et al., 2005; Weis et al., 2001). Au contraire, des crapets arlequin (*Lepomis macrochirus*) exposés à différents métaux (e.g. cadmium, chrome, zinc) présentaient une augmentation de leur activité, excepté à la concentration de cadmium la plus élevée (Ellgaard et al., 1978). Les **réponses comportementales sont donc variables** en fonction de la concentration appliquée (Scott and Sloman, 2004).

Dans le cadre de **l'infection par un pathogène**, la réponse comportementale classique se caractérise par un ensemble de modifications qui peuvent être regroupées

sous le concept de « **sickness behaviour** », associé à une **réduction de l'activité, l'exploration, la recherche de nourriture ainsi que de la sociabilité** (Bonneaud et al., 2016; Kirsten et al., 2018; Volkoff and Peter, 2004). Dans le cadre d'une infection par un pathogène, la **sickness behaviour** pourrait permettre de **réduire l'investissement énergétique** alloué aux **traits comportementaux** en faveur de la **réponse immunitaire** (Barber et al., 2000; Dantzer, 2004; Johnson, 2002). La réduction de la **sociabilité** pourrait aussi permettre de réduire la **transmission de pathogènes** entre congénères (i.e. « behavioural resistance ») (Barber et al., 2000). Ainsi, dans le milieu naturel, ces effets sur le comportement (i.e. réduction de l'activité et la sociabilité notamment) peuvent permettre de **limiter les coûts de l'exposition** mais aussi avoir des conséquences délétères sur les individus en réduisant leurs chances d'accès à la reproduction ou à survivre en cas d'attaque de prédateur par exemple (Atchison et al., 1987; Barber et al., 2000; Landeau and Terborgh, 1986).

3.5. EFFETS ATTENDUS DES STRESS MULTIPLES AUX DIFFERENTES ECHELLES

Les **réponses physiologiques et comportementales** aux **stress simples** sur les différents traits décrits ci-dessus sont relativement bien connues chez les poissons ; en revanche les réponses aux stress multiples sont bien moins connues. D'après la littérature, il apparaît que les trois facteurs de stress (i.e. température, contamination aux ETMs et parasitisme) étudiés dans cette thèse affectent les **mêmes voies physiologiques** (i.e. immunité, métabolisme et gestion du stress oxydant) ainsi que le comportement des individus. Comme présenté dans les parties précédentes, le métabolisme énergétique est central afin d'expliquer la réponse des organismes aux facteurs de stress. Sous stress multiples, nous nous attendons à une forte **augmentation** de la demande énergétique, en lien avec les **fonctions de maintenance** (e.g. défenses immunitaires, antioxydantes notamment), et qui pourrait potentiellement dépasser la **capacité énergétique** de l'individu, résultant en une **stratégie métabolique de conservation**.

En d'autres termes, notre **hypothèse de travail** est que les **stress multiples** provoqueraient un blocage de l'activité métabolique aérobie (i.e. **stratégie de conservation**) et une inhibition potentielle des réponses physiologiques de stress (i.e. faible investissement dans les défenses immunitaires et antioxydantes). Ainsi sous l'effet des stress multiples (ici température ou contamination × challenge immunitaire), des **effets antagonistes** sont attendus au niveau des traits liés à la production et la mobilisation d'énergie du métabolisme. Ces effets antagonistes pourraient mener à une inhibition potentielle des **défenses immunitaires, antioxydantes et des modifications comportementales**. De plus, si chacun des facteurs de stress tend à augmenter la production de stress oxydant, il est attendu que sous expositions multiples, la production de **stress oxydant** augmente de manière **additive** voire **synergique**.

En résumé, les modifications physiologiques provoquées par les stress multiples devraient se répercuter aux différentes échelles d'organisation biologique, des molécules à l'individu (Fig. 12). Nous faisons l'hypothèse que les stress multiples pourraient avoir des conséquences importantes sur les traits liés à la performance des individus (i.e. fitness), en particulier la croissance, la reproduction et la survie, à l'échelle individuelle. En effet, selon l'hypothèse d'une stratégie de conservation sous stress multiples, nous nous attendons à une augmentation des dommages cellulaires et à l'ADN, accompagnée d'une diminution de la survie et de la fitness. Dans les populations sauvages, cela pourrait impacter négativement la persistance des populations et exercer une forte pression de sélection (Hendry, 2016), qui pourrait potentiellement sélectionner certains phénotypes et génotypes et mener à de la divergence entre populations plus ou moins exposées le long d'un gradient de stress multiples (Bourret et al., 2008; Cable and van Oosterhout, 2007; Crozier and Hutchings, 2014) (Fig 12).

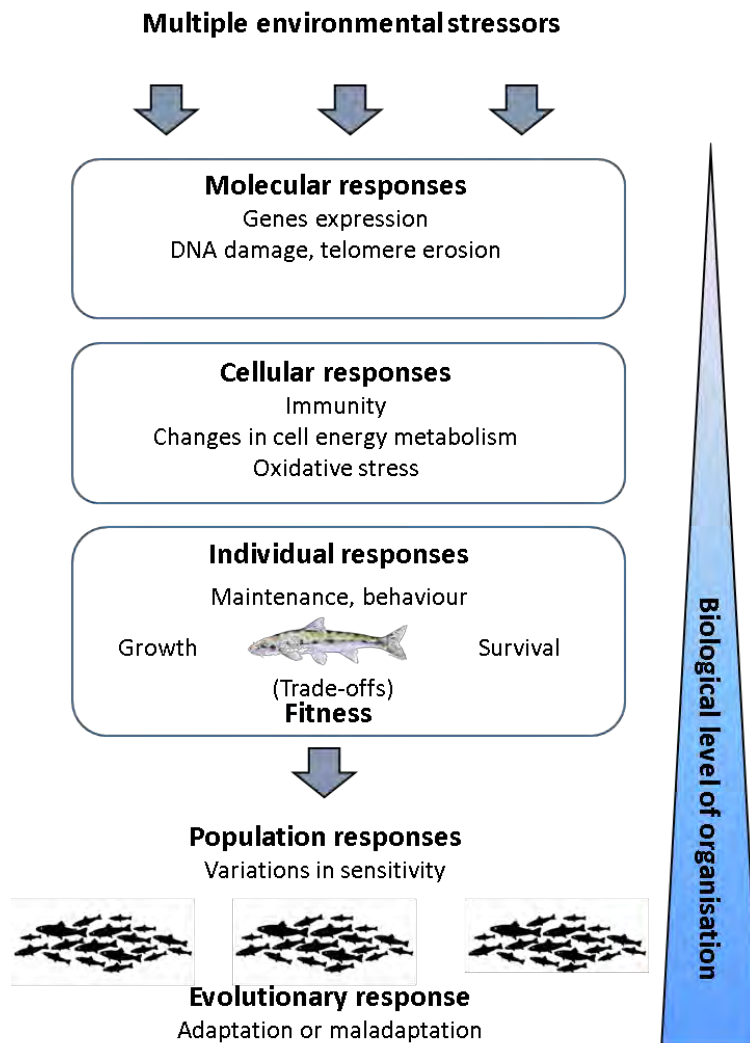


Figure 12. Schéma conceptuel de la réponse aux stress multiples de l'échelle moléculaire à l'échelle populationnelle.

4. Variabilité entre populations

Ces dernières années, un nombre croissant d'études s'est intéressé à la variabilité de réponses entre populations de poissons plus ou moins exposées à des parasites (Scharsack and Kalbe, 2014), à l'augmentation de la température (Fangue, 2006) ou à la contamination (Whitehead et al., 2017). Ces études sur la **divergence entre populations** ayant évolué dans différents contextes environnementaux, apparaissent comme étant particulièrement importantes afin d'améliorer les méthodes de conservation (Hamilton et al., 2016; Horodysky et al., 2015). Dans un contexte d'exposition aux contaminants, ces problématiques ont ouvert la voie à une nouvelle discipline émergente, à savoir : « **l'écotoxicologie évolutive** » (Bourret et al., 2008; Brady et al., 2017a; Brady et al., 2017b; M. Oziolor et al., 2016).

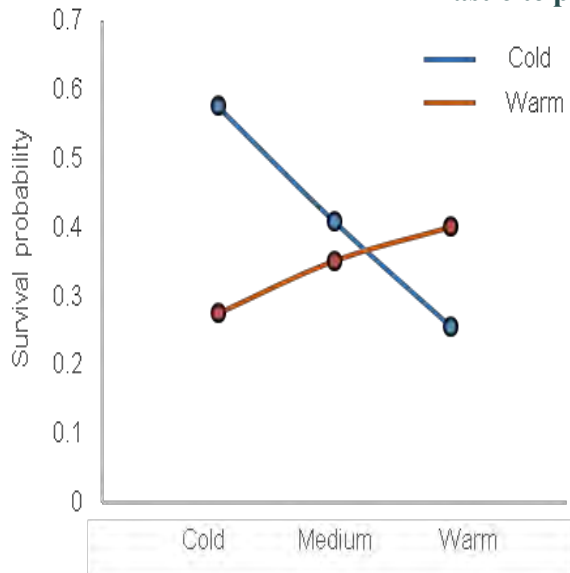
Deux mécanismes importants sont mis en jeu lors de l'adaptation aux stress environnementaux. Premièrement, la **sélection naturelle** peut sélectionner des génotypes particuliers conférant une meilleure fitness aux individus. Par exemple, il a récemment été démontré que certaines populations de choquemort (*Fundulus heteroclitus*) présentaient une tolérance aux contaminants organiques (i.e. PolyChloroBiphényle – PCB, Hydrocarbure Aromatique Polycyclique – HAP, dioxines) en lien avec la sélection de plusieurs gènes (i.e. aryl hydrocarbon receptor pathway- AHR) qui régulent la toxicité et la métabolisation des composés xénobiotiques (Whitehead et al., 2017). Cependant, les processus de sélection naturelle sont généralement observés sur des échelles de temps assez longues et sur plusieurs générations. Sur une échelle de temps plus courte, la **plasticité phénotypique** joue un rôle important dans la persistance des populations face aux modifications de leur environnement (Hendry et al., 2008). Dans ce cas, à partir d'un même génotype, différents phénotypes s'expriment en fonction de l'environnement (Bradshaw, 1965; Hendry, 2016). La plasticité phénotypique (Box 4) est un phénomène crucial dans des environnements fluctuants et stressants et permet aux individus d'ajuster leurs traits et performances en fonction des contraintes environnementales, avec des effets importants sur leur fitness (Haugen and Vøllestad, 2000; Meyers and Bull, 2002). Ainsi, la plasticité phénotypique peut s'exprimer à toutes les **échelles d'organisation**

biologique, de l'expression des gènes (McCairns and Bernatchez, 2010), jusqu'au comportement des individus (Jacquin et al., 2017) en passant par leur physiologie (Dhillon and Schulte, 2011; Johnston and Temple, 2002).

Dans certains cas, la **plasticité phénotypique** peut s'avérer être **adaptative**, lorsqu'elle confère un avantage en termes de fitness aux individus qui l'expriment dans un environnement particulier (Box 4). Elle peut alors être le reflet d'une **adaptation locale** des populations à leur environnement (Kawecki and Ebert, 2004). Cependant la plasticité phénotypique peut aussi être considérée comme **maladaptative** lorsqu'elle réduit la fitness des individus (Box 4). Bien que considéré comme peu courant par rapport au nombre de cas reportés d'adaptation, le phénomène de **maladaptation** pourrait être plus fréquent qu'il n'y paraît, en particulier dans un contexte où les **pressions anthropiques** sont importantes, et tout particulièrement sous contamination ou sous **stress multiples** (Brady et al., 2019). En effet, l'exposition à certains stress anthropiques (e.g. contamination) peut être soudaine et/ou totalement nouvelle pour les populations sauvages. Dans ce cas, les théories évolutives prédisent que le processus de **sélection naturelle** n'a pas le temps de sélectionner des **phénotypes optimaux** pour cet environnement, pouvant potentiellement résulter en une **maladaptation** des individus (i.e. fitness réduite, Brady et al., 2019). Ce phénomène de maladaptation pourrait alors impacter négativement la **persistance des populations** (Fig. 12). Cependant, ces phénomènes évolutifs sont encore très mal connus, en particulier sous stress multiples. Il est donc essentiel d'améliorer les connaissances sur l'occurrence de ces **processus évolutifs**, et plus généralement sur la variabilité phénotypique entre populations sauvages, afin de mieux comprendre et prédire l'impact des stress actuels et futurs sur les trajectoires évolutives des populations sauvages.

Box 4.

Plasticité phénotypique :



Taux de survie de juvéniles d'ombre commun (*Thymallus thymallus*) provenant de sites froids (points et courbe bleus) et chauds (points et courbe oranges) exposés à des températures froides, intermédiaires et chaudes (jardin commun). Adapté de Haugen and Vøllestad, 2000.

La plasticité phénotypique correspond à l'expression des gènes d'un individu en fonction de l'environnement.

La plasticité phénotypique peut être la résultante d'adaptation génétique d'une population (i.e. sélection de génotypes plus ou moins plastiques) et/ou d'interactions gènes x environnement) (Hendry, 2016). La plasticité phénotypique permet dans certains cas de maintenir les performances individuelles (i.e. survie, croissance, reproduction), en particulier face à un stress. L'amplitude de variation du phénotype est aussi appelée norme de réaction. Des populations ayant évolué dans des conditions environnementales différentes peuvent alors présenter des normes de réactions variables, ce qui peut résulter en une **adaptation locale** des populations, c'est-à-dire une meilleure fitness des individus dans leur environnement local par rapport à un nouvel environnement (Hendry, 2016). Les expériences de translocations réciproques entre milieux permettent de tester ces questions (Kawecki and Ebert, 2004). Par exemple, Haugen and Vøllestad (2000) ont démontré que des juvéniles d'ombres provenant d'un lac froid sont plus aptes à survivre en milieu froid qu'en milieu chaud et inversement (figure ci-dessus). Ici la divergence des populations induite par les processus évolutifs (i.e. adaptation locale) tend à optimiser la fitness d'une population dans son milieu, on parle alors de plasticité adaptative. Cependant, dans un contexte de changements environnementaux rapides, ces processus de divergence peuvent mener à la **maladaptation** des populations, par exemple, dans un contexte d'une augmentation de l'occurrence d'événements climatiques extrêmes (e.g. canicule), de contamination nouvelle, ou de stress multiples.

De façon intéressante, les phénomènes évolutifs peuvent interagir de manière complexe et mener à des réponses inattendues en cas de stress multiples. Quelques études récentes se sont intéressées à la plasticité phénotypique dans un contexte d'expositions multiples (Hopkins et al., 2017; Hua et al., 2017; Jansen et al., 2011; Lavergne et al., 2015; Pédrón et al., 2017; Zhang et al., 2018). Dans certains cas, l'adaptation des populations à un facteur de stress particulier peut conférer un avantage contre un autre facteur de stress (i.e. **co-adaptation**). Par exemple, il a été démontré que des daphnies (*Daphnia Magna*) résistantes à la contamination pouvaient présenter une plus forte résistance à une augmentation de la température, sans doute en lien avec des ajustements physiologiques (e.g. ajustement de l'activité métabolique) (Zhang et al., 2018). Au contraire, l'acquisition d'une résistance à un facteur de stress peut entraver la réponse des populations à un autre facteur de stress et donc mener à de la **maladaptation**. Par exemple, l'acquisition d'une résistance à un pesticide chez une population de daphnies peut augmenter la susceptibilité des individus à des parasites, potentiellement en lien avec la mise en place de compromis énergétiques et/ou d'effets neurotoxiques (e.g. inhibition acétylcholinestérase) (Jansen et al., 2011). La plasticité peut donc présenter un **coût et des limites** en fonction de l'intensité et du nombre de facteurs de stress (Hendry, 2016). Le caractère adaptatif de la plasticité phénotypique s'avère donc être contexte dépendant.

L'un des défis majeurs des années à venir semble donc être l'amélioration des connaissances fondamentales sur les **capacités d'adaptation des populations sauvages sous l'influence des stress multiples**. Ceci devrait permettre une meilleure prédiction de la trajectoire évolutive des populations exposées aux activités humaines afin d'améliorer les méthodes de conservation des populations de poissons sauvages.

5. Objectifs de la thèse

Malgré le corpus grandissant d'études s'intéressant aux stress multiples, les résultats de la littérature sont très variables en fonction du contexte environnemental ainsi que du niveau d'organisation biologique étudié. De plus, la réponse aux stress peut varier selon l'histoire évolutive des populations. En effet, certaines populations peuvent acquérir des formes de résistance à un ou plusieurs facteurs de stress (i.e. co-adaptation) tandis que pour d'autres, l'acquisition d'une résistance peut affecter leur sensibilité à un autre facteur de stress (i.e. maladaptation).

Dans cette thèse, je me suis donc attaché à prendre en compte ces facteurs de variabilité (i.e. interactions entre stress, échelles d'organisation, histoire évolutive) qui représentent des verrous scientifiques majeurs pour améliorer la compréhension et la prédictibilité des effets des stress multiples sur les poissons d'eau douce. Ce projet a été divisé en deux questions principales :

- I) Comment les combinaisons de facteurs de stress influencent-elles l'état de santé des poissons à différentes échelles biologiques ?
- II) Comment l'histoire évolutive de populations peut-elle affecter leur sensibilité au stress dans un contexte de stress multiples ?

Pour aborder ces questions, j'ai utilisé le goujon (*Gobio occitaniae*) comme espèce modèle, car il présente une grande variabilité phénotypique. Sa large répartition au sein d'une gamme de cours d'eau contrastés en termes de température, de contaminations métalliques et de pressions parasitaires, l'amène à être un sujet d'étude adapté. De plus, le goujon a une durée de vie relativement courte (4 à 5 ans) par rapport aux échelles de variations temporelles de ces facteurs environnementaux, ce qui en fait un modèle de choix pour étudier la divergence des populations face aux facteurs de stress.

Ce travail vise donc à évaluer les effets combinés de facteurs de stress abiotique (i.e. augmentation de température ou contamination) et biotique (i.e. parasitisme) sur l'état de santé des goujons *via* une approche multi-échelles (de l'échelle moléculaire à l'échelle des populations).

Afin de répondre à ces deux questions, mon travail de thèse a été divisé en 4 étapes opérationnelles :

I.A) Caractériser les interactions entre facteurs de stress le long d'un gradient de perturbations sur le terrain (*insitu*) et en conditions contrôlées (laboratoire).

I.B) Evaluer les conséquences de l'exposition multiple à différentes échelles biologiques le long d'un gradient de perturbations (*insitu*) et en conditions contrôlées (laboratoire).

II.A) Comparer la plasticité des réponses entre populations exposées à des facteurs de stress combinés en conditions contrôlées (laboratoire).

II.B) Comparer la plasticité des réponses entre populations lors de translocations réciproques : approche de terrain visant à évaluer l'adaptation locale des populations aux stress (*insitu*)

La combinaison de ces approches permet de tester le rôle de ces facteurs de stress simples et combinés en conditions contrôlées, mais aussi dans des conditions s'approchant de la réalité, en milieu naturel.

6. Références

Adlard, R. D., Miller, T. L. and Smit, N. J. (2015). The butterfly effect: parasite diversity, environment, and emerging disease in aquatic wildlife. *Trends Parasitol.* 31, 160–166.

Alexander, J. B. and Ingram, G. A. (1992). Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 249–279.

- Aliko, V., Qirjo, M., Sula, E., Morina, V. and Faggio, C. (2018). Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. *Fish Shellfish Immunol.* 76, 101–109.
- Anacleto, P., Figueiredo, C., Baptista, M., Maulvault, A. L., Camacho, C., Pousão-Ferreira, P., Valente, L. M. P., Marques, A. and Rosa, R. (2018). Fish energy budget under ocean warming and flame retardant exposure. *Environ. Res.* 164, 186–196.
- Atchison, G. J., Henry, M. G. and Sandheinrich, M. B. (1987). Effects of metals on fish behavior: a review. *Environ. Biol. Fishes* 18, 11–25.
- Bailey, C., Segner, H., Casanova-Nakayama, A. and Wahli, T. (2017). Who needs the hotspot? The effect of temperature on the fish host immune response to *Tetracapsuloides bryosalmonae* the causative agent of proliferative kidney disease. *Fish Shellfish Immunol.* 63, 424–437.
- Bailey, S.W. (2004). Climate change and decreasing herbicide persistence. *Pest Management Science* 60, 158–162.
- Baillon, L., Pierron, F., Pannetier, P., Normandeau, E., Couture, P., Labadie, P., Budzinski, H., Lambert, P., Bernatchez, L. and Baudrimont, M. (2016). Gene transcription profiling in wild and laboratory-exposed eels: Effect of captivity and in situ chronic exposure to pollution. *Sci. Total Environ.* 571, 92–102.
- Bakke, T. A., Cable, J. and Harris, P. D. (2007). The Biology of Gyrodactylid Monogeneans: The “Russian-Doll Killers.” In *Advances in Parasitology*, pp. 161–460. Elsevier.
- Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483–495.
- Barber, I., Hoare, D. and Krause, J. (2000). Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 131–165.
- Barber, I., Berkhout, B. W. and Ismail, Z. (2016). Thermal Change and the Dynamics of Multi-Host Parasite Life Cycles in Aquatic Ecosystems. *Integr. Comp. Biol.* 56, 561–572.
- Bartolini, T., Butail, S. and Porfiri, M. (2015). Temperature influences sociality and activity of freshwater fish. *Environ. Biol. Fishes* 98, 825–832.
- Barton, B. A. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525.
- Beaumont, M. W., Butler, P. J. and Taylor, E. W. (1995). Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to sub-lethal copper concentrations in soft acidic water and its effect upon sustained swimming performance. *Aquat. Toxicol.* 33, 45–63.
- Bernadotte, A., Mikhelson, V. M. and Spivak, I. M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging* 8, 3.
- Billick, I. and Case, T. J. (1994). Higher Order Interactions in Ecological Communities: What Are They and How Can They be Detected? *Ecology* 75, 1529–1543.

- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J. and Willmore, W. G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish Fish.* 18, 928–942.
- Biro, P. A., Beckmann, C. and Stamps, J. A. (2010). Small within-day increases in temperature affects boldness and alters personality in coral reef fish. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 277, 71.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B. and Sorci, G. (2003). Assessing the Cost of Mounting an Immune Response. *Am. Nat.* 161, 367–379.
- Bonneaud, C., Wilson, R. S. and Seebacher, F. (2016). Immune-challenged fish up-regulate their metabolic scope to support locomotion. *PLoS One* 11, e0166028.
- Bougas, B., Normandeau, E., Grasset, J., Defo, M. A., Campbell, P. G. C., Couture, P. and Bernatchez, L. (2016). Transcriptional response of yellow perch to changes in ambient metal concentrations-A reciprocal field transplantation experiment. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 173, 132–142.
- Bourret, V., Couture, P., Campbell, P. G. C. and Bernatchez, L. (2008). Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 86, 76–90.
- Bowen, L., Werner, I. and Johnson, M. L. (2006). Physiological and Behavioral Effects of Zinc and Temperature on Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Hydrobiologia* 559, 161–168.
- Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants. In *Advances in Genetics* (ed. Caspari, E. W.) and Thoday, J. M.), pp. 115–155. Academic Press.
- Brady, S. P., Monosson, E., Matson, C. W. and Bickham, J. W. (2017a). Evolutionary toxicology: Toward a unified understanding of life's response to toxic chemicals. *Evol. Appl.* 10, 745–751.
- Brady, S. P., Richardson, J. L. and Kunz, B. K. (2017b). Incorporating evolutionary insights to improve ecotoxicology for freshwater species. *Evol. Appl.* 10, 829–838.
- Brady, S. P., Bolnick, D. I., Angert, A. L., Gonzalez, A., Barrett, R. D. H., Crispo, E., Derry, A. M., Eckert, C. G., Fraser, D. J., Fussmann, G. F., et al. (2019). Causes of maladaptation. *Evol. Appl.* 12, 1229–1242.
- Breitburg, D. L., Baxter, J. W., Hatfield, C. A., Howarth, R. W., Jones, C. G., Lovett, G. M. and Wigand, C. (1998). Understanding Effects of Multiple Stressors: Ideas and Challenges. In *Successes, Limitations, and Frontiers in Ecosystem Science* (ed. Pace, M. L.) and Groffman, P. M.), pp. 416–431. New York, NY: Springer New York.
- Brett, J. R. (1971). Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Am. Zool.* 11, 99–113.

- Brook, B. W., Sodhi, N. S. and Bradshaw, C. J. A. (2008). Synergies among extinction drivers under global change. *Trends Ecol. Evol.* 23, 453–460.
- Bruder, A., Salis, R. K., Jones, P. E. and Matthaei, C. D. (2017). Biotic interactions modify multiple-stressor effects on juvenile brown trout in an experimental stream food web. *Glob. Change Biol.* 23, 3882–3894.
- Brunner, F. S., Anaya-Rojas, J. M., Matthews, B. and Eizaguirre, C. (2017). Experimental evidence that parasites drive eco-evolutionary feedbacks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 3678–3683.
- Buchmann, K. and Lindenstrøm, T. (2002). Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int. J. Parasitol.* 32, 309–319.
- Cable, J. and van Oosterhout, C. (2007). The impact of parasites on the life history evolution of guppies (*Poecilia reticulata*): The effects of host size on parasite virulence. *Int. J. Parasitol.* 37, 1449–1458.
- Cable, J., Barber, I., Boag, B., Ellison, A. R., Morgan, E. R., Murray, K., Pascoe, E. L., Sait, S. M., Wilson, A. J. and Booth, M. (2017). Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160088.
- Callender, E. (2014). Heavy Metals in the Environment – Historical Trends. In *Treatise on Geochemistry*, pp. 59–89. Elsevier.
- Campbell, H. A., Handy, R. D. and Sims, D. W. (2002). Increased metabolic cost of swimming and consequent alterations to circadian activity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to dietary copper. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 768–777.
- Cannon, W. B. (1932). *The wisdom of the body*. New York: W.W. Norton & Company, Inc.
- Carey, C. (2005). How physiological methods and concepts can be useful in conservation biology. *Integr. Comp. Biol.* 45, 4–11.
- Carpenter, S. R., Stanley, E. H. and Vander Zanden, M. J. (2011). State of the World's Freshwater Ecosystems: Physical, Chemical, and Biological Changes. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 36, 75–99.
- Carraro, L., Mari, L., Hartikainen, H., Strepparava, N., Wahli, T., Jokela, J., Gatto, M., Rinaldo, A. and Bertuzzo, E. (2016). An epidemiological model for proliferative kidney disease in salmonid populations. *Parasit. Vectors* 9,.
- Cherry, A. D. and Piantadosi, C. A. (2015). Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Its Intersection with Inflammatory Responses. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 965–976.
- Christensen, M. R., Graham, M. D., Vinebrooke, R. D., Findlay, D. L., Paterson, M. J. and Turner, M. A. (2006). Multiple anthropogenic stressors cause ecological surprises in boreal lakes. *Glob. Change Biol.* 12, 2316–2322.

- Clements, W. H. and Rees, D. E. (1997). Effects of Heavy Metals on Prey Abundance, Feeding Habits, and Metal Uptake of Brown Trout in the Arkansas River, Colorado. *Trans. Am. Fish. Soc.* 126, 774–785.
- Colchen, T., Teletchea, F., Fontaine, P. and Pasquet, A. (2016). Temperature modifies activity, inter-individual relationships and group structure in fish. *Curr. Zool.* zow048.
- Cooke, S. J., Sack, L., Franklin, C. E., Farrell, A. P., Beardall, J., Wikelski, M. and Chown, S. L. (2013). What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. *Conserv. Physiol.* 1,.
- Cossins, A. R. and Bowler, K. (1987). *Temperature Biology of Animals*. Dordrecht: Springer Netherlands.
- Costa, P. M., Miguel, C., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T. à. and Costa, M. H. (2011). Transcriptomic analyses in a benthic fish exposed to contaminated estuarine sediments through laboratory and in situ bioassays. *Ecotoxicology* 20, 1749–1764.
- Costantini, D. and Møller, A. P. (2009). Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 153, 339–344.
- Côté, I. M., Darling, E. S. and Brown, C. J. (2016). Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20152592.
- Couture, P. and Kumar, P. (2003). Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Aquat. Toxicol.* 64, 107–120.
- Craig, P. M., Wood, C. M. and McClelland, G. B. (2007). Oxidative stress response and gene expression with acute copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*). *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293, R1882–R1892.
- Crain, C. M., Kroeker, K. and Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* 11, 1304–1315.
- Crozier, L. G. and Hutchings, J. A. (2014). Plastic and evolutionary responses to climate change in fish. *Evol. Appl.* 7, 68–87.
- Crutzen, P. J. (2006). The “anthropocene.” In *Earth system science in the anthropocene*, pp. 13–18. Springer.
- D. Vinebrooke, R., L. Cottingham, K., Norberg, M. S., Jon, I. Dodson, S., C. Maberly, S. and Sommer, U. (2004). Impacts of multiple stressors on biodiversity and ecosystem functioning: the role of species co-tolerance. *Oikos* 104, 451–457.
- Dantzer, R. (2004). Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 399–411.
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacios, S. and Vernet, G. (2004). Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp

(*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (*Cestoda*). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 68, 325–338.

De Boeck, G., De Smet, H. and Blust, R. (1995). The effect of sublethal levels of copper on oxygen consumption and ammonia excretion in the common carp, *Cyprinus carpio*. *Aquat. Toxicol.* 32, 127–141.

Debes, P. V., Visse, M., Panda, B., Ilmonen, P. and Vasemägi, A. (2016). Is telomere length a molecular marker of past thermal stress in wild fish? *Mol. Ecol.* 25, 5412–5424.

Dhillon, R. S. and Schulte, P. M. (2011). Intraspecific variation in the thermal plasticity of mitochondria in killifish. *J. Exp. Biol.* 214, 3639–3648.

Dittmar, J., Janssen, H., Kuske, A., Kurtz, J. and Scharsack, J. P. (2014). Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *J. Anim. Ecol.* 83, 744–757.

Do, T. D., Thi Mai, N., Duy Khoa, T. N., Abol-Munafi, A. B., Liew, H. J., Kim, C.-B. and Wong, L. L. (2019). Molecular Characterization and Gene Expression of Glutathione Peroxidase 1 in *Tor tambroides* Exposed to Temperature Stress. *Evol. Bioinforma.* 15, 1176934319853580.

Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., et al. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81, 163.

Dupoué, A., Rutschmann, A., Le Galliard, J. F., Clobert, J., Angelier, F., Marciau, C., Ruault, S., Miles, D. and Meylan, S. (2017). Shorter telomeres precede population extinction in wild lizards. *Sci. Rep.* 7, 16976.

Ellgaard, E. G., Tusa, J. E. and Malizia, A. A. (1978). Locomotor activity of the bluegill *Lepomis macrochirus*: hyperactivity induced by sublethal concentrations of cadmium, chromium and zinc. *J. Fish Biol.* 12, 19–23.

Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria.

Ellison, A. R., Uren Webster, T. M., Rey, O., Garcia de Leaniz, C., Consuegra, S., Orozco-terWengel, P. and Cable, J. (2018). Transcriptomic response to parasite infection in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) depends on rearing density. *BMC Genomics* 19, 723.

Ercal, N., Gurer-Orhan, H. and Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 529–539.

Fangue, N. A. (2006). Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 209, 2859–2872.

Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.

- Folt, C. L., Chen, C. Y., Moore, M. V. and Burnaford, J. (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. Oceanogr.* 44, 864–877.
- Franke, F., Armitage, S. A. O., Kutzer, M. A. M., Kurtz, J. and Scharsack, J. P. (2017). Environmental temperature variation influences fitness trade-offs and tolerance in a fish-tapeworm association. *Parasit. Vectors* 10.
- Fry, F. E. J. (1947). *Effects of the environment on animal activity*. Toronto: Univ. of Toronto Press.
- Gandar, A., Jean, S., Canal, J., Marty-Gasset, N., Gilbert, F. and Laffaille, P. (2016). Multistress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3184–3194.
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., Gress, L., Mormède, P., Tapie, N., Budzinski, H., et al. (2017). Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 188, 60–72.
- Gonzalez, P., Dominique, Y., Massabuau, J. C., Boudou, A. and Bourdineaud, J. P. (2005). Comparative Effects of Dietary Methylmercury on Gene Expression in Liver, Skeletal Muscle, and Brain of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* 39, 3972–3980.
- Gorgoglione, B., Wang, T., Secombes, C. J. and Holland, J. W. (2013). Immune gene expression profiling of Proliferative Kidney Disease in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reveals a dominance of anti-inflammatory, antibody and T helper cell-like activities. *Vet. Res.* 44, 55.
- Grasset, J., Bougas, B., Campbell, P. G. C., Bernatchez, L. and Couture, P. (2014). Temperature, oxygen, and diet modulate gene transcription and metabolic capacities in yellow perch. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 71, 1635–1641.
- Grasset, J., Ollivier, É., Bougas, B., Yannic, G., Campbell, P. G. C., Bernatchez, L. and Couture, P. (2016). Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* 177, 324–332.
- Grizzetti, B., Pistocchi, A., Liqueste, C., Udias, A., Bouraoui, F. and van de Bund, W. (2017). Human pressures and ecological status of European rivers. *Sci. Rep.* 7,.
- Gross, A., McDonnell, J. M. and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 13, 1899–1911.
- Grunst, A. S., Grunst, M. L., Thys, B., Raap, T., Daem, N., Pinxten, R. and Eens, M. (2018). Variation in personality traits across a metal pollution gradient in a free-living songbird. *Sci. Total Environ.* 630, 668–678.
- Halliwell, B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends Biochem. Sci.* 31, 509–515.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. 5. Ed. Oxford: Oxford University Press.

- Hamilton, P. B., Cowx, I. G., Oleksiak, M. F., Griffiths, A. M., Grahn, M., Stevens, J. R., Carvalho, G. R., Nicol, E. and Tyler, C. R. (2016). Population-level consequences for wild fish exposed to sublethal concentrations of chemicals – a critical review. *Fish Fish.* 17, 545–566.
- Handy, R. D., Sims, D. W., Giles, A., Campbell, H. A. and Musonda, M. M. (1999). Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat. Toxicol.* 47, 23–41.
- Hari, R. E., Livingstone, D. M., Siber, R., Burkhardt-Holm, P. and Güttinger, H. (2006). Consequences of climatic change for water temperature and brown trout populations in Alpine rivers and streams. *Glob. Change Biol.*
- Harrison, I., Abell, R., Darwall, W., Thieme, M. L., Tickner, D. and Timboe, I. (2018). The freshwater biodiversity crisis. *Science* 362, 1369–1369.
- Hatcher, M. J., Dick, J. T. and Dunn, A. M. (2012). Diverse effects of parasites in ecosystems: linking interdependent processes. *Front. Ecol. Environ.* 10, 186–194.
- Haugen, T. O. and Vøllestad, L. A. (2000). Population differences in early life-history traits in grayling. *J. Evol. Biol.* 13, 897–905.
- Hausmann, M. F. and Marchetto, N. M. (2010). Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution. *Curr. Zool.* 56,.
- Havixbeck, J. and Barreda, D. (2015). Neutrophil Development, Migration, and Function in Teleost Fish. *Biology* 4, 715–734.
- Heath, S., Bennett, W. A., Kennedy, J. and Beitinger, T. L. (1994). Heat and cold tolerance of the fathead minnow, *Pimephales promelas*, exposed to the synthetic pyrethroid cyfluthrin. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 51, 437–440.
- Henderson, M. and Okamura, B. (2004). The phylogeography of salmonid proliferative kidney disease in Europe and North America. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271, 1729–1736.
- Hendry, A. P. (2016). *Eco-evolutionary Dynamics*. Princeton University Press.
- Hendry, A. P., Farrugia, T. J. and Kinnison, M. T. (2008). Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Mol. Ecol.* 17, 20–29.
- Henry, M. G. and Atchison, G. J. (1986). Behavioral Changes in Social Groups of Bluegills Exposed to Copper. *Trans. Am. Fish. Soc.* 115, 590–595.
- Hoffmann, A. A. and Hercus, M. J. (2000). Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience* 50, 217–226.
- Hopkins, W. ., Staub, B. ., Snodgrass, J. ., Taylor, B. ., DeBiase, A. ., Roe, J. ., Jackson, B. and Congdon, J. . (2004). Responses of benthic fish exposed to contaminants in outdoor microcosms—examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* 68, 1–12.

- Hopkins, G. R., French, S. S. and Brodie, E. D. (2017). Interacting stressors and the potential for adaptation in a changing world: responses of populations and individuals. *R. Soc. Open Sci.* 4, 161057.
- Horodysky, A. Z., Cooke, S. J. and Brill, R. W. (2015). Physiology in the service of fisheries science: Why thinking mechanistically matters. *Rev. Fish Biol. Fish.* 25, 425–447.
- Hua, J., Wuerthner, V. P., Jones, D. K., Mattes, B., Cothran, R. D., Relyea, R. A. and Hoverman, J. T. (2017). Evolved pesticide tolerance influences susceptibility to parasites in amphibians. *Evol. Appl.*
- Hurst, T. P. (2007). Thermal effects on behavior of juvenile walleye pollock (*Theragra chalcogramma*): implications for energetics and food web models. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 64, 449–457.
- IPCC (2014). Climate change 2014: synthesis report. (ed. Pachauri, R. K.), Mayer, L.), and Intergovernmental Panel on Climate Change) Geneva, Switzerland: Intergovernmental Panel on Climate Change.
- Isaak, D. J., Wollrab, S., Horan, D. and Chandler, G. (2012). Climate change effects on stream and river temperatures across the northwest U.S. from 1980–2009 and implications for salmonid fishes. *Clim. Change* 113, 499–524.
- Jackson, M. C., Loewen, C. J. G., Vinebrooke, R. D. and Chimimba, C. T. (2016). Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Glob. Change Biol.* 22, 180–189.
- Jacquin, L., Dybwad, C., Rolshausen, G., Hendry, A. P. and Reader, S. M. (2017). Evolutionary and immediate effects of crude-oil pollution: depression of exploratory behaviour across populations of Trinidadian guppies. *Anim. Cogn.* 20, 97–108.
- Jansen, M., Stoks, R., Coors, A., van Doorslaer, W. and de Meester, L. (2011). Collateral damage: rapid exposure-induced evolution of pesticide resistance leads to increased susceptibility to parasites: evolutionary costs of resistance. *Evolution* 65, 2681–2691.
- Jena, S. D., Behera, M., Dandapat, J. and Mohanty, N. (2009). Non-enzymatic antioxidant status and modulation of lipid peroxidation in the muscles of *Labeo rohita* by sub lethal exposure of CuSO₄. *Vet. Res. Commun.* 33, 421–429.
- Johansen, J. L. and Jones, G. P. (2011). Increasing ocean temperature reduces the metabolic performance and swimming ability of coral reef damselfishes: TEMPERATURE EFFECTS ON REEF FISH PERFORMANCE. *Glob. Change Biol.* 17, 2971–2979.
- Johnson, R. W. (2002). The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 443–450.
- Johnson, P. T. J. and Paull, S. H. (2011). The ecology and emergence of diseases in fresh waters: Freshwater diseases. *Freshw. Biol.* 56, 638–657.

- Johnston, I. A. and Temple, G. K. (2002). Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. *J. Exp. Biol.* 205, 2305–2322.
- Karvonen, A., Rintamäki, P., Jokela, J. and Valtonen, E. T. (2010). Increasing water temperature and disease risks in aquatic systems: Climate change increases the risk of some, but not all, diseases. *Int. J. Parasitol.* 40, 1483–1488.
- Kassahn, K. S., Crozier, R. H., Pörtner, H. O. and Caley, M. J. (2009). Animal performance and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological organisation. *Biol. Rev.* 84, 277–292.
- Kawecki, T. J. and Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7, 1225–1241.
- Khangarot, B. S. and Tripathi, D. M. (1991). Changes in humoral and cell-mediated immune responses and in skin and respiratory surfaces of catfish, *Saccobranchus fossilis*, following copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 22, 291–308.
- Khangarot, B. S., Rathore, R. S. and Tripathi, D. M. (1999). Effects of chromium on humoral and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in a freshwater catfish, *Saccobranchus fossilis* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43, 11–20.
- King, M. O. and Swanson, D. L. (2013). Activation of the immune system incurs energetic costs but has no effect on the thermogenic performance of house sparrows during acute cold challenge. *J. Exp. Biol.* 216, 2097–2102.
- Kirsten, K., Fior, D., Kreutz, L. C. and Barcellos, L. J. G. (2018). First description of behavior and immune system relationship in fish. *Sci. Rep.* 8,.
- Knapen, D., Bervoets, L., Verheyen, E. and Blust, R. (2004). Resistance to water pollution in natural gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. *Aquat. Toxicol.* 67, 155–165.
- Knapen, D., Redeker, E. S., Inácio, I., De Coen, W., Verheyen, E. and Blust, R. (2005). New metallothionein mRNAs in *Gobio gobio* reveal at least three gene duplication events in cyprinid metallothionein evolution. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 140, 347–355.
- Koltes, K. H. (1985). Effects of Sublethal Copper Concentrations on the Structure and Activity of Atlantic Silverside Schools. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114, 413–422.
- Kooijman, S. A. L. M. (2010). *Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation*. Cambridge University Press.
- Krkošek, M., Ford, J. S., Morton, A., Lele, S., Myers, R. A. and Lewis, M. A. (2007). Declining Wild Salmon Populations in Relation to Parasites from Farm Salmon. *Science* 318, 1772–1775.
- Landeau, L., Terborgh, J. (1986). Oddity and the ‘confusion effect’ in predation. *Animal Behaviour* 34, 1372–1380.

- Lange, K., Bruder, A., Matthaei, C. D., Brodersen, J. and Paterson, R. A. (2018). Multiple-stressor effects on freshwater fish: Importance of taxonomy and life stage. *Fish Fish.* 19, 974–983.
- Lavergne, E., Pedron, N., Calves, I., Claireaux, G., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Le Bayon, N., Cahu, C. and Laroche, J. (2015). Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar. Pollut. Bull.* 95, 658–664.
- Li, Y., Zhou, Q., Ren, B., Luo, J., Yuan, J., Ding, X., Bian, H. and Yao, X. (2019). Trends and Health Risks of Dissolved Heavy Metal Pollution in Global River and Lake Water from 1970 to 2017. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 251* (ed. de Voogt, P.), pp. 1–24. Cham: Springer International Publishing.
- Liess, M., Foit, K., Knillmann, S., Schäfer, R. B. and Liess, H.-D. (2016). Predicting the synergy of multiple stress effects. *Sci. Rep.* 6,.
- Lin, Y.-S., Tsai, S.-C., Lin, H.-C., Hsiao, C.-D. and Wu, S. M. (2011). Changes of glycogen metabolism in the gills and hepatic tissue of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) during short-term Cd exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 154, 296–304.
- Little, E. E. and Finger, S. E. (1990). Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13–19.
- Lochmiller, R. L. and Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88, 87–98.
- Louzon, M., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Pauget, B. and de Vaufleury, A. (2019). Telomere dynamic in humans and animals: Review and perspectives in environmental toxicology. *Environ. Int.* 131, 105025.
- Lugo, R. S., Nathalí, G., Villalobos de B, L. B. and Mairin, L. (2006). Immunological response of the freshwater fish *Colossoma macropomum* as a biomarker of copper exposure. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77, 925–930.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- M. Oziolor, E., De Schampelaere, K. and Matson, C. W. (2016). Evolutionary toxicology: Meta-analysis of evolutionary events in response to chemical stressors. *Ecotoxicology* 25, 1858–1866.
- MacDougall-Shackleton, S. A., Bonier, F., Romero, L. M. and Moore, I. T. (2019). Glucocorticoids and “Stress” Are Not Synonymous. *Integr. Org. Biol.* 1,.
- Macklin, M., Hudson-Edwards, K. and Dawson, E. J. (1997). The significance of pollution from historic metal mining in the Pennine ore fields on river contaminant fluxes to the North Sea. *Sci. Total Environ.* 194–195, 391–397.
- Macnab, V. and Barber, I. (2012). Some (worms) like it hot: fish parasites grow faster in warmer water, and alter host thermal preferences. *Glob. Change Biol.* 18, 1540–1548.

- Magnadóttir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151.
- Mantua, N., Tohver, I. and Hamlet, A. (2010). Climate change impacts on streamflow extremes and summertime stream temperature and their possible consequences for freshwater salmon habitat in Washington State. *Clim. Change* 102, 187–223.
- Mantyka-Pringle, C. S., Martin, T. G., Moffatt, D. B., Linke, S. and Rhodes, J. R. (2014). Understanding and predicting the combined effects of climate change and land-use change on freshwater macroinvertebrates and fish. *J. Appl. Ecol.* 51, 572–581.
- Marcogliese, D. J. (2008). The impact of climate change on the parasites and infectious diseases of aquatic animals. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 27, 467–484.
- Mariet, A.-L., Sarret, G., Bégeot, C., Walter-Simonnet, A.-V. and Gimbert, F. (2017). Lead Highly Available in Soils Centuries after Metallurgical Activities. *J. Environ. Qual.* 46, 1236–1242.
- Martin, L. B., Scheuerlein, A. and Wikelski, M. (2003). Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 153–158.
- Martinou, J.-C. and Youle, R. J. (2011). Mitochondria in Apoptosis: Bcl-2 family Members and Mitochondrial Dynamics. *Dev. Cell* 21, 92–101.
- Martins, M. L., Xu, D. H., Shoemaker, C. A. and Klesius, P. H. (2011). Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 774–780.
- McCairns, R. J. S. and Bernatchez, L. (2010). Adaptive divergence between freshwater and marine sticklebacks: insights into the role of phenotypic plasticity from an integrated analysis of candidate gene expression. *Evol. Int. J. Org. Evol.* 64, 1029–1047.
- McEwen, B. S. and Wingfield, J. C. (2010). What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm. Behav.* 57, 105–111.
- McNamara, K. B., van Lieshout, E., Jones, T. M. and Simmons, L. W. (2013). Age-dependent trade-offs between immunity and male, but not female, reproduction. *J. Anim. Ecol.* 82, 235–244.
- McNeill, J. R. (2000). *Something new under the sun*. W. W. Norton & Company, Inc. New York - London: W. W. Norton & Company, Inc.
- Meyers, L. A. and Bull, J. J. (2002). Fighting change with change: adaptive variation in an uncertain world. *Trends Ecol. Evol.* 17, 551–557.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B. and Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* 12, 75–92.
- Monna, F., Camizuli, E., Revelli, P., Biville, C., Thomas, C., Losno, R., Scheifler, R., Bruguier, O., Baron, S., Chateau, C., et al. (2011). Wild Brown Trout Affected by

Historical Mining in the Cévennes National Park, France. *Environ. Sci. Technol.* 45, 6823–6830.

Nöges, P., Argillier, C., Borja, Á., Garmendia, J. M., Hanganu, J., Kodeš, V., Pletterbauer, F., Sagouis, A. and Birk, S. (2016). Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. *Sci. Total Environ.* 540, 43–52.

Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D. (2009). The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environment International* 35, 971–986.

Nriagu, J. O. (1996). A History of Global Metal Pollution. *Science* 272, 223–224.

Okamura, B., Hartikainen, H., Schmidt-Posthaus, H. and Wahli, T. (2011). Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease: PKD as an emerging disease of salmonid fish. *Freshw. Biol.* 56, 735–753.

Ormerod, S. J., Dobson, M., Hildrew, A. G. and Townsend, C. R. (2010). Multiple stressors in freshwater ecosystems. *Freshw. Biol.* 55, 1–4.

Ots, I., Kerimov, A. B., Ivankina, E. V., Ilyina, T. A. and Hõrak, P. (2001). Immune Challenge Affects Basal Metabolic Activity in Wintering Great Tits. *Proc. Biol. Sci.* 268, 1175–1181.

Paul, N., Chakraborty, S. and Sengupta, M. (2014). Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*. *Aquat. Toxicol.* 152, 105–112.

Pédrón, N., Le Du, J., Charrier, G., Zambonino-Infante, J.-L., Le Bayon, N., Vasconcelos, R. P., Fonseca, V. F., Le Grand, F. and Laroche, J. (2017). Contrasting patterns of energy metabolism in northern vs southern peripheral European flounder populations exposed to temperature rising and hypoxia. *Mar. Environ. Res.*

Petitjean, Q., Jean, S., Côte, J., Lamarins, A., Lefranc, M., Santos, R., Perrault, A., Laffaille, P. and Jacquin, L. (2019a). Combined effects of temperature increase and immune challenge in two wild gudgeon populations. *Fish Physiol. Biochem.*

Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P. and Jacquin, L. (2019b). Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Sci. Total Environ.* 684, 371–380.

Pietroock, M. and Marcogliese, D. J. (2003). Free-living endohelminth stages: at the mercy of environmental conditions. *Trends Parasitol.* 19, 293–299.

Piggott, J. J., Townsend, C. R. and Matthaei, C. D. (2015). Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecol. Evol.* 5, 1538–1547.

Pistole, D. H., Peles, J. D. and Taylor, K. (2008). Influence of metal concentrations, percent salinity, and length of exposure on the metabolic rate of fathead minnows

(*Pimephales promelas*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 148, 48–52.

Pitcher, T. J. ed. (1986). *The Behaviour of Teleost Fishes*. Boston, MA: Springer US.

Pörtner, H. O. (2002). Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 132, 739–761.

Pörtner, H. O. and Farrell, A. P. (2008). Physiology and Climate Change. *Science* 322, 690–692.

Preston, D. L., Mischler, J. A., Townsend, A. R. and Johnson, P. T. J. (2016). Disease Ecology Meets Ecosystem Science. *Ecosystems* 19, 737–748.

Pyatt, F. B., Pyatt, A. J., Walker, C., Sheen, T. and Grattan, J. P. (2005). The heavy metal content of skeletons from an ancient metalliferous polluted area in southern Jordan with particular reference to bioaccumulation and human health. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 295–300.

Qu, R., Feng, M., Wang, X., Qin, L., Wang, C., Wang, Z. and Wang, L. (2014). Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat. Toxicol.* 150, 9–16.

Quade, M. J. and Roth, J. A. (1997). A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 239–248.

Ransberry, V. E., Morash, A. J., Blewett, T. A., Wood, C. M. and McClelland, G. B. (2015). Oxidative stress and metabolic responses to copper in freshwater- and seawater-acclimated killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 161, 242–252.

Rašković, B., Poleksić, V., Skorić, S., Jovičić, K., Spasić, S., Hegediš, A., Vasić, N. and Lenhardt, M. (2018). Effects of mine tailing and mixed contamination on metals, trace elements accumulation and histopathology of the chub (*Squalius cephalus*) tissues: Evidence from three differently contaminated sites in Serbia. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 153, 238–247.

Rauw, W. M. (2012). Immune response from a resource allocation perspective. *Front. Genet.* 3,.

Rebl, A. and Goldammer, T. (2018). Under control: The innate immunity of fish from the inhibitors' perspective. *Fish Shellfish Immunol.* 77, 328–349.

Reichert, S. and Stier, A. (2017). Does oxidative stress shorten telomeres in vivo? A review. *Biol. Lett.* 13, 20170463.

Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., et al. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol. Rev.* 94, 849–873.

- Reyes-Becerril, M., López-Medina, T., Ascencio-Valle, F. and Esteban, M. Á. (2011). Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.*
- Ricklefs, R.E., Miller, G.L. (2005). *Écologie*. De Boeck Supérieur.
- Ricklefs, R. E. and Wikelski, M. (2002). The physiology/life-history nexus. *Trends Ecol. Evol.* 17, 462–468.
- Rodriguez, I., Novoa, B. and Figueras, A. (2008). Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 239–249.
- Roméo, null, Bennani, null, Gnassia-Barelli, null, Lafaurie, null and Girard, null (2000). Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 48, 185–194.
- Sabater, S., Elosegi, A. and Ludwig, R. (2019). Defining Multiple Stressor Implications. In *Multiple Stressors in River Ecosystems*, pp. 1–22. Elsevier.
- Sanchez, W., Palluel, O., Meunier, L., Coquery, M., Porcher, J.-M. and Ait-Aissa, S. (2005). Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback : relationship with hepatic metal levels. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 177–183.
- Santos, R., Aude, J., Olivier, P., Mélissa, P.-L., Aurélien, B., Christophe, B., Jean Marc, P., Sylvie, B., Alain, D. and Wilfried, S. (2016). Characterization of a genotoxicity biomarker in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): Biotic variability and integration in a battery of biomarkers for environmental monitoring: Genotoxicity Biomarker In Three-Spined Stickleback *G. aculeatus*. *Environ. Toxicol.* 31, 415–426.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M. and Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.
- Sasaki, Y., Maita, M. and Okamoto, N. (2002). Rainbow trout neutrophils are responsible for non-specific cytotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 243–252.
- Scharsack, J. P. and Kalbe, M. (2014). Differences in susceptibility and immune responses of three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) from lake and river ecotypes to sequential infections with the eye fluke *Diplostomum pseudospathaceum*. *Parasit. Vectors* 7, 109.
- Schinegger, R., Palt, M., Segurado, P. and Schmutz, S. (2016). Untangling the effects of multiple human stressors and their impacts on fish assemblages in European running waters. *Sci. Total Environ.* 573, 1079–1088.
- Schmitz, M., Douxfils, J., Mandiki, S. N. M., Morana, C., Baekelandt, S. and Kestemont, P. (2016). Chronic hyperosmotic stress interferes with immune homeostasis in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*, S.) and leads to excessive inflammatory response during bacterial infection. *Fish Shellfish Immunol.* 55, 550–558.

- Schulte, P. M. (2014). What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J. Exp. Biol.* 217, 23–34.
- Scott, G. R. and Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392.
- Scott, G. R., Sloman, K. A., Rouleau, C. and Wood, C. M. (2003). Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 206, 1779–1790.
- Secombes, C. J. and Wang, T. (2012). The innate and adaptive immune system of fish. *Infect. Dis. Aquac. Prev. Control* 3–68.
- Segner, H., Schmitt-Jansen, M. and Sabater, S. (2014). Assessing the Impact of Multiple Stressors on Aquatic Biota: The Receptor's Side Matters. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7690–7696.
- Selye, H. (1956). *The stress of life*. New York: McGraw-Hill.
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A. and Svobodova, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Vet Med* 56, 537–546.
- Sheath, D. J., Andreou, D. and Britton, J. R. (2016). Interactions of warming and exposure affect susceptibility to parasite infection in a temperate fish species. *Parasitology* 143, 1340–1346.
- Sheldon, B. C. and Verhulst, S. (1996). Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11, 317–321.
- Sibly, R. M. and Calow, P. (1989). A life-cycle theory of responses to stress. *Biol. J. Linn. Soc.* 37, 101–116.
- Simide, R., Angelier, F., Gaillard, S. and Stier, A. (2016). Age and Heat Stress as Determinants of Telomere Length in a Long-Lived Fish, the Siberian Sturgeon. *Physiol. Biochem. Zool.* 89, 441–447.
- Sloman, K. A. and McNeil, P. L. (2012). Using physiology and behaviour to understand the responses of fish early life stages to toxicants. *J. Fish Biol.* 81, 2175–2198.
- Sloman, K. A., Lepage, O., Rogers, J. T., Wood, C. M. and Winberg, S. (2005). Socially-mediated differences in brain monoamines in rainbow trout: effects of trace metal contaminants. *Aquat. Toxicol.* 71, 237–247.
- Sokolova, I. M. (2013). Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53, 597–608.
- Sokolova, I. M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G. and Sukhotin, A. A. (2012). Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15.

- Stauffer, J., Bruneaux, M., Panda, B., Visse, M., Vasemägi, A. and Ilmonen, P. (2017). Telomere length and antioxidant defense associate with parasite-induced retarded growth in wild brown trout. *Oecologia* 185, 365–374.
- Sterud, E., Forseth, T., Ugedal, O., Poppe, T., Jørgensen, A., Bruheim, T., Fjeldstad, H. and Mo, T. (2007). Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Dis. Aquat. Organ.* 77, 191–198.
- Strayer, D. L. and Dudgeon, D. (2010). Freshwater biodiversity conservation: recent progress and future challenges. *J. North Am. Benthol. Soc.* 29, 344–358.
- Sures, B. (2006). How parasitism and pollution affect the physiological homeostasis of aquatic hosts. *J. Helminthol.* 80, 151–157.
- Teichert, N., Borja, A., Chust, G., Uriarte, A. and Lepage, M. (2016). Restoring fish ecological quality in estuaries: Implication of interactive and cumulative effects among anthropogenic stressors. *Sci. Total Environ.* 542, 383–393.
- Tops, S., Lockwood, W. and Okamura, B. (2006). Temperature-driven proliferation of *Tetracapsuloides bryosalmonae* in bryozoan hosts portends salmonid declines. *Dis. Aquat. Organ.* 70, 227–236.
- Tops, S., Hartikainen, H.-L. and Okamura, B. (2009). The effects of infection by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) and temperature on *Fredericella sultana* (Bryozoa). *Int. J. Parasitol.* 39, 1003–1010.
- Townsend, C. R., Uhlmann, S. S. and Matthaei, C. D. (2008). Individual and combined responses of stream ecosystems to multiple stressors. *J. Appl. Ecol.* 45, 1810–1819.
- Tylecote, R. F. (1987). *The Early history of metallurgy in Europe*. Addison-Wesley Longman, Limited.
- Uribe, C., Folch, H., Enríquez, R. and Moran, G. (2011). Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet. Med. (Praha)* 56, 486–503.
- van Vliet, M. T. H., Franssen, W. H. P., Yearsley, J. R., Ludwig, F., Haddeland, I., Lettenmaier, D. P. and Kabat, P. (2013). Global river discharge and water temperature under climate change. *Glob. Environ. Change* 23, 450–464.
- Volkoff, H. and Peter, R. E. (2004). Effects of lipopolysaccharide treatment on feeding of goldfish: role of appetite-regulating peptides. *Brain Res.* 998, 139–147.
- Wang, X., Wang, L., Yao, C., Qiu, L., Zhang, H., Zhi, Z. and Song, L. (2012). Alternation of immune parameters and cellular energy allocation of *Chlamys farreri* under ammonia-N exposure and *Vibrio anguillarum* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 741–749.
- Ward, A. J. ., Duff, A. J., Horsfall, J. S. and Currie, S. (2008). Scents and scents-ability: pollution disrupts chemical social recognition and shoaling in fish. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 101–105.

- Watson, H., Bolton, M. and Monaghan, P. (2015). Variation in early-life telomere dynamics in a long-lived bird: links to environmental conditions and survival. *J. Exp. Biol.* 218, 668–674.
- Weis, J. S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C. and Weis, P. (2001). Effects of contaminants on behavior: biochemical mechanisms and ecological consequences: killifish from a contaminated site are slow to capture prey and escape predators; altered neurotransmitters and thyroid may be responsible for this behavior, which may produce population changes in the fish and their major prey, the grass shrimp. *AIBS Bull.* 51, 209–217.
- Whitehead, A., Clark, B. W., Reid, N. M., Hahn, M. E. and Nacci, D. (2017). When evolution is the solution to pollution: Key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evol. Appl.* 10, 762–783.
- Whitney, J. E., Al-Chokhachy, R., Bunnell, D. B., Caldwell, C. A., Cooke, S. J., Eliason, E. J., Rogers, M., Lynch, A. J. and Paukert, C. P. (2016). Physiological Basis of Climate Change Impacts on North American Inland Fishes. *Fisheries* 41, 332–345.
- Wikelski, M. and Cooke, S. J. (2006). Conservation physiology. *Trends Ecol. Evol.* 21, 38–46.
- Wingfield, J. C. (2003). Control of behavioural strategies for capricious environments. *Anim. Behav.* 66, 807–816.
- Wong, B. B. M. and Candolin, U. (2015). Behavioral responses to changing environments. *Behav. Ecol.* 26, 665–673.
- Woo, S., Yum, S., Park, H.-S., Lee, T.-K. and Ryu, J.-C. (2009). Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 149, 289–299.
- Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J. (2011). *Homeostasis and Toxicology of Non-essential Metals*. Academic Press.
- Yang, Y., Yu, H., Li, H., Wang, A. and Yu, H. (2016). Effect of high temperature on immune response of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) by transcriptome analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 58, 89–95.
- Zelikoff, J. T., Bowser, D., Squibb, K. S. and Frenkel, K. (1995). Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. *J. Toxicol. Environ. Health Part Curr. Issues* 45, 235–248.
- Zhang, C., Jansen, M., Meester, L. D. and Stoks, R. (2018). Thermal evolution offsets the elevated toxicity of a contaminant under warming: A resurrection study in *Daphnia magna*. *Evol. Appl.* 11, 1425–1436.
- Zhu, L., Nie, L., Zhu, G., Xiang, L. and Shao, J. (2013). Advances in research of fish immune-relevant genes: A comparative overview of innate and adaptive immunity in teleosts. *Dev. Comp. Immunol.* 39, 39–62.



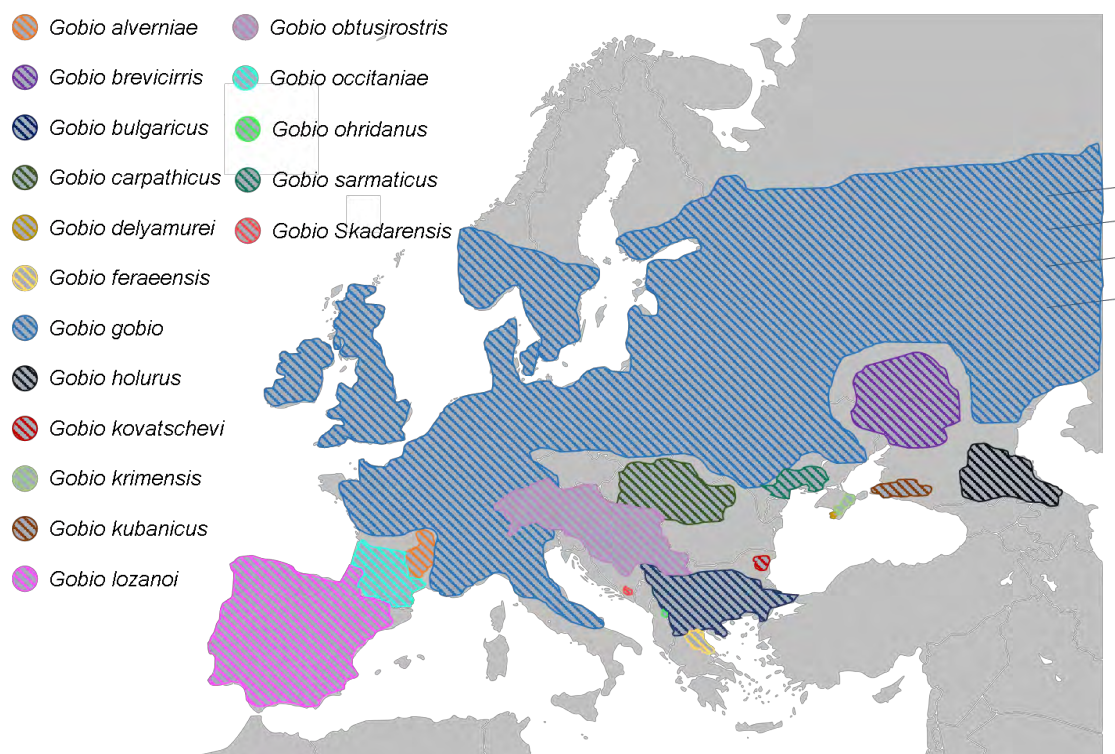
CHAPITRE 2

MATERIEL & METHODES

1. Cadre méthodologique

1.1. MODELE BIOLOGIQUE

Le goujon occitan (*Gobio occitaniae*), est un poisson benthique qui appartient au genre *Gobio* et la sous-famille des Gobioninae (goujons), l'une des sous-familles les plus représentées au sein de la famille des Cyprinidae, en particulier en Europe (Tang et al., 2011). En effet, la sous-famille des Gobioninae compte plus de 130 espèces, dont 20 appartiennent au genre *Gobio* et sont majoritairement et largement présentes en Europe (Fig 13) (Nelson et al., 2016; Szlachciak and Ząbkiewicz, 2008). L'utilisation d'une espèce provenant du genre *Gobio* en tant que modèle d'étude revêt un intérêt particulier puisque ses représentants sont présents dans une large partie de l'Europe.



Les espèces appartenant à la sous-famille des *Gobioninae* sont connues pour présenter un style de vie benthique, un corps cylindrique allongé fusiforme, une bouche

infère protractile, une paire de barbillons et des nageoires pectorales latéralement étendues (Kottelat and Freyhof, 2007) (Fig 14).

Ce projet se déroulant dans le Sud-Ouest de la France (bassin versant de la Garonne), l'espèce choisie est *Gobio occitaniae* (Fig. 14). Au sein des *Gobioninae* et du genre *Gobio*, le goujon occitan se distingue des autres espèces européennes de par la présence d'une zone inter-orbitale plate, la longueur de sa tête (26-30% longueur standard du corps), la présence d'écailles en position ventrale se poursuivant jusqu'aux nageoires pectorales ainsi que le diamètre des yeux importants (pour d'autres critères d'identification voir Keith et al., 2011; Kottelat and Freyhof, 2007; Kottelat and Persat, 2005). Cette espèce d'eau courante est présente sur une large gamme de cours d'eau (de la zone à ombre à la zone à brème) et se nourrit essentiellement d'invertébrés aquatiques et de végétaux trouvés sur ou dans le substrat. Tout comme le Goujon commun (*Gobio gobio*), le goujon occitan aurait une durée de vie approximative de 4 à 5 ans et atteindrait sa maturité sexuelle à partir de sa deuxième année de vie.



Figure 14. Le goujon occitan présente les caractéristiques morphologiques de la sous famille des *Gobioninae* : corps cylindriques allongé, une bouche infère (A), une paire de barbillons (B) et des nageoires pectorales latéralement étendues (C).

L'utilisation du goujon comme modèle biologique est particulièrement intéressante dans le cadre de ce projet de recherche doctorale sur les conséquences aux stress multiples (i.e. température, contamination et parasitisme).

En effet, les goujons sont aussi connus pour présenter une gamme de tolérance thermique relativement large (Fig. 15). La borne inférieure de température optimale du goujon commun, espèce très proche du goujon occitan, est de l'ordre de 5 à 7°C alors

que la borne supérieure, induisant des effets potentiellement létaux, est atteinte entre 27 et 30°C (Tissot and Souchon, 2010).

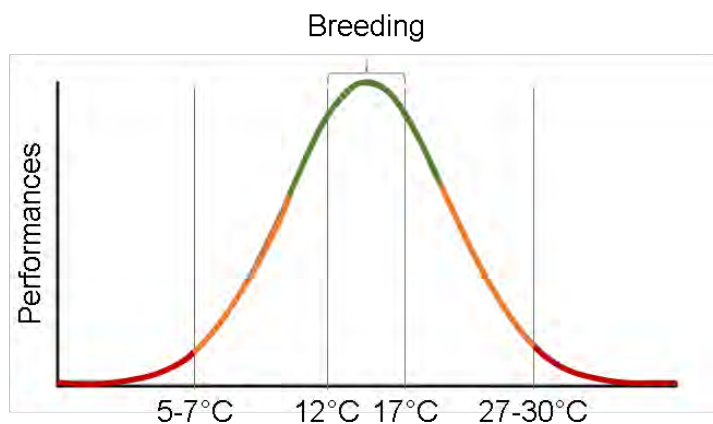


Figure 15. Gamme de tolérance thermique du Goujon (*Gobio gobio*). Adapté de Tissot and Souchon (2010). Les couleurs verte, orange et rouge indiquent les gammes de température optimale, sub-optimale et létale, respectivement

En outre, de par son mode de vie benthique et le fait qu'il se nourrisse d'invertébrés aquatiques benthiques, le goujon est particulièrement exposé aux contaminants via la colonne d'eau, les sédiments et le transfert trophique. Ainsi, plusieurs études ont rapporté la présence de goujons dans de nombreux cours d'eau contaminés aux éléments traces métalliques (ETMs) (Bervoets and Blust, 2003; Fallar et al., 2003; Knapen et al., 2004; Van Campenhout et al., 2003). De plus, le goujon est connu pour être l'hôte de nombreux parasites (Pecínková et al., 2005; Pecínková et al., 2005; Taylor and Hoole, 1989), y compris d'ectoparasites du genre *Gyrodactylus* (Blažek et al., 2008; Gelnar, 1987), largement représenté dans la zone étudiée (Loot et al., 2007). Enfin, les goujons sont des espèces relativement sédentaires (Keith et al., 2011; Stott et al., 1963) et sont ainsi exposés aux conditions d'un même milieu durant toute leur vie.

Au sein des espèces regroupées dans le genre *Gobio*, il existe une forte variabilité phénotypique (Bănărescu and Bless, 1999; Szlachciak and Ząbkiewicz, 2008). En effet, plusieurs auteurs ont déjà rapporté de fortes variations en terme de

physiologie et de morphologie entre des populations de goujons exposées ou non à des contaminants (Knapen et al., 2004; Shinn et al., 2015). De plus sa durée de vie est relativement courte (4-5 ans) par rapport aux échelles temporelles intégrant les variations de facteurs environnementaux (e.g. contaminations chroniques sur plusieurs dizaines d'années), ce qui suggère que des mécanismes d'adaptation locale et de divergence face aux conditions de stress peuvent avoir lieu. Le goujon apparaît donc comme un modèle idéal en vue de travailler sur la variabilité de réponse aux stress entre différentes populations.

De plus, plusieurs auteurs ont déjà étudié le cycle de vie de ce dernier, en aquarium (Kestemont, 1989; Kestemont and Awaïss, 1989; Kestemont et al., 1991) et ont réalisé des test d'exposition à des contaminants (Flammarion et al., 1998; Marcelle and Thome, 1983) et des parasites (Gelnar, 1987). Les conditions de maintenance et d'exposition des goujons en laboratoire sont donc relativement bien connues, ce qui permet de combiner des approches de terrain et en laboratoire.

1.2. TYPES D'APPROCHES UTILISEES

Afin de répondre aux questions posées dans le cadre de ce projet de recherche (Fig. 16), j'ai utilisé 3 approches complémentaires, une étude transversale visant à mettre en évidence les interactions potentielles entre trois gradients de stress (i.e. contamination ETMs, température et pression de parasitisme) et leurs liens potentiels avec l'état de santé des poissons (Chapitre 3). L'utilisation de ce type d'approche revêt un intérêt particulier puisqu'elle tient compte de la variabilité de réponse entre populations de poissons et permet de se rapprocher au plus près des conditions environnementales du milieu. Cependant, en raison de la multitude de facteurs potentiellement confondants, ce type d'approche ne permet pas de tester les liens de causalité entre l'exposition aux facteurs de stress et les réponses mesurées chez les poissons. Pour cette raison, j'ai par la suite utilisé 3 approches expérimentales (Chapitres 4, 5 et 6) en vue de i) déterminer le coût de la réponse immunitaire en lien avec une attaque parasitaire chez le goujon (Chapitre 4); ii) identifier les liens causaux entre l'exposition aux facteurs de stress, combinés ou non, et leurs effets sur l'état de santé des poissons (Chapitre 5 et 6); et iii) identifier les niveaux d'organisation biologique pour lesquels les réponses aux stress

sont les plus marquées et les plus variables entre différentes populations d'une même espèce (Chapitre 5 et 6). L'intérêt des approches expérimentales en conditions contrôlées vient de la possibilité d'isoler les facteurs de stress à tester en vue d'identifier des liens de causalité entre l'exposition à ce facteur isolé et la réponse mesurée chez les poissons. Cependant, ce type d'approches et les réponses mesurées sont peu représentatives des conditions du milieu. C'est pourquoi, en phase finale, j'ai utilisé une approche de translocation réciproque (caging). Ce type d'approche en conditions semi-naturelles permet de se rapprocher au plus près des conditions environnementales et de tester l'implication de l'adaptation locale dans la variabilité de réponses entre populations (Kawecki and Ebert, 2004) (voir Chapitre 7, section 5.2 - Adaptation locale : expérience de translocation). Cependant, en raison des forts aléas (e.g. crue, embâcle, détérioration du matériel) la durée d'exposition est limitée dans le cadre des approches de translocations réciproques. Chacune de ces approches comporte des points forts et des points faibles, leurs utilisations de manière combinée permettent donc de tester les liens de causalité entre exposition aux stress multiples tout en se tenant au plus près des conditions du milieu. Dans le cas où les patterns de réponses observées présenteraient une forte variabilité inter-populationnelle, l'emploi d'une approche de translocation réciproque permettra de mettre en évidence des phénomènes d'adaptation locale.

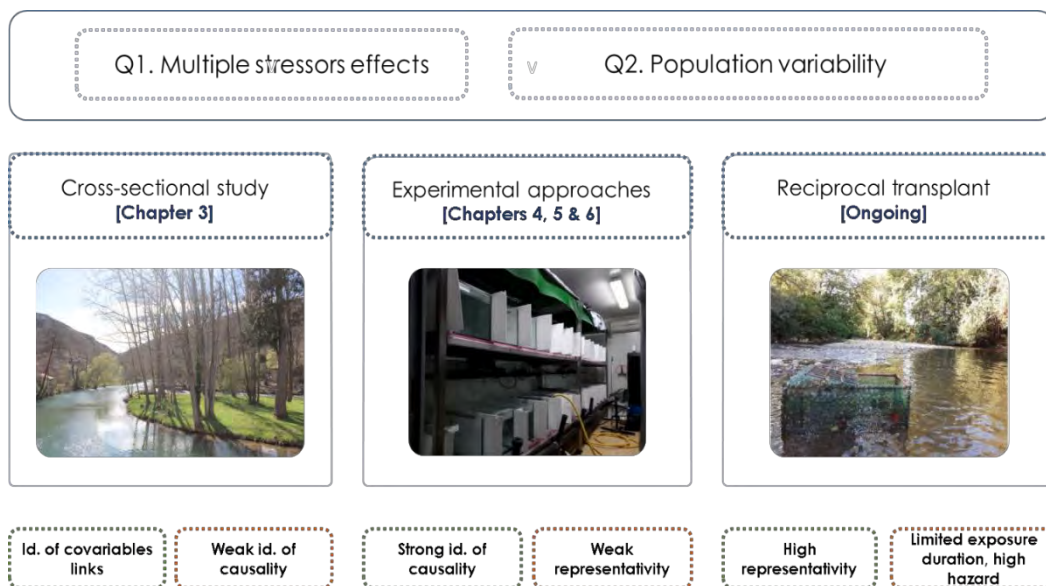


Figure 16. Récapitulatif des 2 questions de recherche ainsi que des 3 grands types d'approches utilisées dans le cadre de ce projet doctoral. Les principaux points forts (encadré vert) et faibles (encadré orange) de chaque approche sont indiqués dans les encadrés colorés.

1.3. SITES D'ETUDE ET POPULATIONS ECHANTILLONNEES

Ainsi, au cours de ce projet de recherche doctorale, les effets de trois facteurs de stress (i.e. température, contamination aux ETMs et parasitisme) ont été étudiés dans le cadre d'études en laboratoire, mais aussi *in situ*. Pour ce faire, 16 sites d'études dans le bassin versant de la Garonne ont été sélectionnés sur la base de la présence du goujon occitan (après enquête auprès des agents de l'ONEMA et des fédérations départementales de pêche et de protection des milieux aquatiques) ainsi que de l'existence de données physico-chimiques (i.e. chronique de température de l'eau, contamination aux ETMs dans la colonne d'eau) issues de la base de données régionale de l'Agence de l'Eau Adour-Garonne (SIE, 2016).

Pour calculer les gradients de température sur les sites d'études, les températures saisonnières moyennes (mesurée de manière mensuelle, dans la colonne d'eau) ainsi que leurs coefficients de variation respectifs ont été calculés pour chaque site d'étude durant 4 ans (Juillet 2012 à Juillet 2016). Cette période a été choisie afin de couvrir approximativement la période de vie des goujons qui ont été échantillonnés au cours de la première campagne d'échantillonnage incluse dans ce projet (Chapitre 3, Mai - Juin 2016) (Table 1).

Table 1. Température moyenne et écart type (sd), minimum, maximum et coefficient de variation mesurée dans la colonne d'eau sur une période de 4 ans (Juillet 2012 à Juillet 2016, sur chaque site d'étude, les températures ont été mesurées sur une base mensuelle). Les sites d'étude sont ordonnés selon le gradient de température défini à l'aide d'un axe d'ACP représentant les température moyennes par site et par saison (voir Fig. 17).

Study sites	Temp. gradient	Water temperature (°C) between July 2012 and July 2016															
		Fall				Winter				Spring				Summer			
		Mean ± Sd	Min / Max	CV	n	Mean ± Sd	Min / Max	CV	n	Mean ± Sd	Min / Max	CV	n	Mean ± Sd	Min / Max	CV	n
GIVAB	-3.5	14.4 ± 2.1	10.3 / 19.2	4.3	12	7.1 ± 2	3.5 / 10.6	8.4	11	9 ± 2.3	5.7 / 12.8	8.6	9	14.2 ± 2.8	10.2 / 18.9	6.5	9
CELFIG	-1.7	16.5 ± 3.4	8.8 / 23.8	4.8	22	6.1 ± 2.5	1.8 / 8.9	12.2	11	9.5 ± 2.1	5.2 / 13.4	5.8	14	17.6 ± 3.9	10.9 / 23.8	5.8	15
GARCAZ	-1.7	16.9 ± 3	12.8 / 23.9	5.0	12	7.8 ± 1.7	5.3 / 10	6.6	11	9.7 ± 1.8	7 / 12.1	6.1	9	16 ± 3.9	10.5 / 22.4	8.1	9
ARIMAS	-1.3	15.3 ± 1.9	12 / 19	8.6	12	8.2 ± 1.2	6.3 / 9.8	5.3	8	9.7 ± 1.8	7.6 / 12.8	6.3	9	15.4 ± 2.1	11.1 / 17.2	4.5	9
GARMAR	-1.2	18.3 ± 3.7	11.7 / 25.2	3.4	12	8.1 ± 2.1	5 / 11.1	7.8	11	10.1 ± 1.8	7.6 / 12.4	6	9	16.4 ± 4.4	11.2 / 25.2	9	9
VOLPLA	-1.2	16.3 ± 3.1	11.6 / 23	5.4	12	7.6 ± 2.1	4.5 / 10	9.9	8	10.2 ± 2.1	7.7 / 13.1	6.9	9	17.6 ± 3.2	12.6 / 22.5	6	9
VENSAL	-1.1	16 ± 2.3	12 / 19.3	4.5	10	7.4 ± 1.6	4 / 9	6.7	11	10.8 ± 2.5	9 / 16	7.9	9	16.1 ± 2.8	12 / 20	5.9	9
CAUSAL	-0.4	16.4 ± 1.6	12.4 / 18	7.9	10	11.1 ± 3.5	8 / 15.7	15.8	4	9.7 ± 3	6 / 15.3	10.9	8	15.7 ± 1.3	13.6 / 17.6	2.9	8
RIOU	-0.3	18.1 ± 1.5	16.2 / 19.8	4.2	4	9.2 ± 2.5	6.1 / 13.9	10.4	7	9.4 ± 0.9	8.4 / 10.8	3.4	8	16.7 ± 3.1	13 / 22.2	6.3	9
GARBLA	0.2	18.2 ± 2.7	13 / 21	6.9	10	9.1 ± 1.2	7 / 10	5	7	10.3 ± 2.1	8 / 13	6.8	9	17.8 ± 4.3	12 / 24	8.1	9
GARPOR	0.2	18.4 ± 3.7	12.1 / 25.7	5.1	16	8.2 ± 2.1	5.3 / 12.6	6.7	15	10 ± 1.7	7.6 / 12.7	5	12	17.9 ± 3.9	11.8 / 24.9	5.3	17
CELCAB	0.4	17.5 ± 3.6	9.2 / 25	4.3	27	7.8 ± 2.2	3.2 / 10.7	8.6	11	10.8 ± 2.1	7 / 14.5	5	14	18.2 ± 4.6	6.9 / 26	6.3	16
GARBOU	0.6	19.1 ± 3.9	13 / 27	2.9	12	8.8 ± 3.1	5 / 14	10.5	11	11 ± 2.2	8 / 15	6.8	9	19 ± 4.2	14 / 26	7.4	9
AUSEI	2.3	18.9 ± 2.7	13 / 25	6.3	15	8.6 ± 2.8	4 / 14.2	8.3	15	11.1 ± 2.5	8 / 15	6.5	12	21 ± 3.7	15 / 27	4.3	17
SAVGRE	2.3	19.1 ± 2.7	13 / 24	3.6	15	9 ± 2.6	6 / 14	7.5	15	11.2 ± 3	8 / 18	7.9	12	19.9 ± 3	15 / 25	3.6	17
SAUPOR	3.7	19.3 ± 2.2	15 / 23	3.3	12	10.6 ± 2.1	8 / 14	5.8	11	12.9 ± 2.3	10 / 16	5.8	9	19.2 ± 3.4	15 / 25	5.7	9

Les températures saisonnières moyennes ainsi que les coefficients de variation ont ensuite été placés dans une analyse en composantes principales (ACP, Fig. 17) afin d'en retirer deux variables synthétiques correspondant aux deux premiers axes de l'analyse (axe 1 : 35.7, axe 2 : 30.1). Les deux premiers axes représentent les températures moyennes et la variation des températures, respectivement pour chaque site d'étude.

Ainsi, plus la valeur donnée par l'axe 1 est élevée, plus le site d'étude est considéré comme présentant les températures les plus chaudes parmi les sites sélectionnés. De la même façon, plus la valeur donnée par l'axe 2 est élevée, plus le site d'étude présente des températures variables parmi les sites sélectionnés. Dans la plupart des chapitres, seul l'axe 1 (température moyenne) a été retenu dans les modèles statistiques.

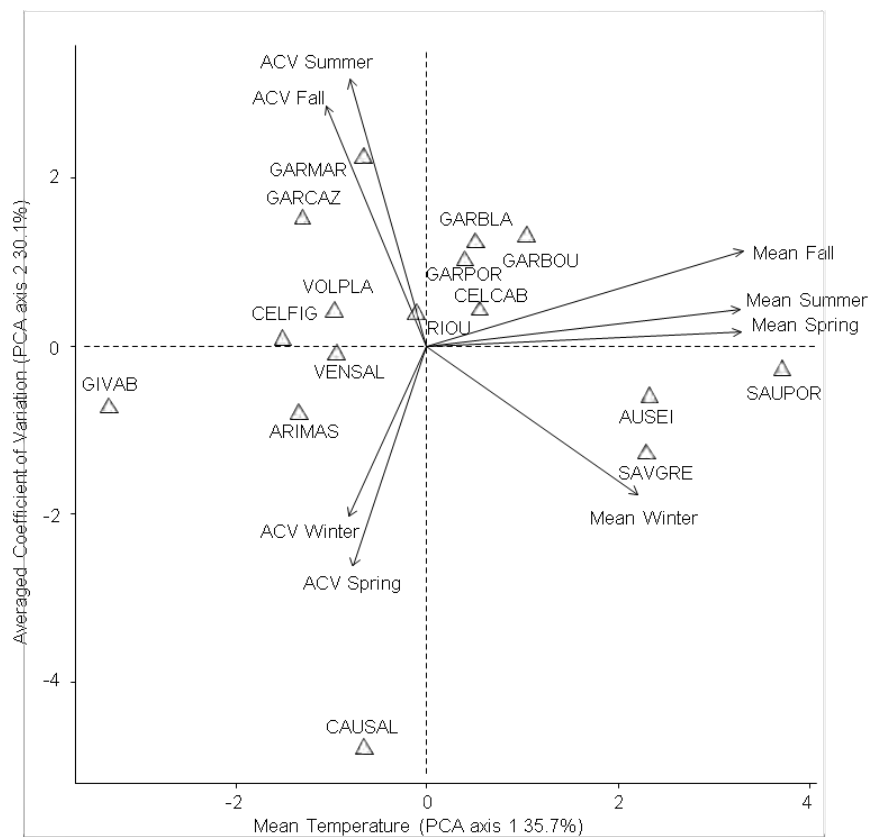


Figure 17. Analyse en composantes principales (ACP), visant à classer les 16 sites d'études sélectionnés (ARIMAS, AUSEI, CAUSAL, CELCAB, CELFIG, GARBLA, GARBOU, GARCAZ, GARMAR, GARPOR, GIVAB, RIOU, SAUPOR, SAVGRE, VENSAL, VOLPLA) le long d'un gradient de température de l'eau moyenne (Axe 1) et d'un gradient de variabilité de température (Axe 2)

Pour calculer un indice de toxicité aux ETMs, une 17^{ième} population provenant d'un étang de pisciculture a été ajoutée (Les Viviez de Haute Corrèze, VHC, Le Bourg, 19340 Courteix, France) (population nommée FARM). Cette dernière population a été utilisée uniquement dans le cadre des expérimentations menées en conditions contrôlées (Chapitre 6). Pour ce faire, les concentrations en ETMs (i.e. aluminium-Al, arsenic-As, cobalt-Co, plomb-Pb, zinc-Zn, nickel-Ni, cadmium-Cd, chromium-Cr, and cuivre-Cu) mesurées dans la colonne d'eau sur la même période de 4 ans que précédemment (i.e. Juin 2012 – Juin 2016) ont été extraites de la base de données de l'Agence de l'eau Adour-Garonne (SIE, 2016). Concernant la population de pisciculture, des analyses complémentaires ont été effectuées sur des prélèvements d'eau (n=4) échantillonnés dans les étangs de pisciculture (i.e. concentrations obtenues par spectrométrie de masse –ICP-MS- sur eau filtrée à 0.45 µM, acidifiée, voir Chapitre 6 pour plus de détails). Les concentrations moyennes pour chaque élément et chaque site d'étude ont ensuite été calculées afin d'être intégrées dans le calcul d'une unité toxique (i.e. Toxic unit) en accord avec la littérature (de Castro-Català et al., 2016; Kuzmanović et al., 2016; Sprague, 1970). De manière succincte, le calcul de l'unité toxique représente une mesure intégrative qui permet d'évaluer la toxicité d'un mélange de contaminants pour un organisme donné. Dans le cadre de ce projet de recherche doctorale, l'unité toxique permet de classer les sites d'études selon un gradient de toxicité. Cette unité toxique est calculée pour chaque site comme suit :

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

Avec, C_i qui correspond à la concentration moyenne d'un des ETMs considéré mesurée dans la colonne d'eau, LC_{50} qui correspond à la concentration du contaminant considéré induisant 50% de mortalité dans une population de poissons modèles (ici, *Pimephales promelas*) (données issues de la base de donnée ECOTOX USEPA, 2008). Ainsi plus la valeur de l'unité toxique attribuée au site d'étude est élevée, plus le risque toxique pour les poissons vivant dans ce site est élevé (Fig. 18). Les valeurs de concentrations moyennes relevées sur chacun des sites d'études sont recensées dans la Table 2.

D'autres indices de toxicité ont été calculés sur la base de la présence de pesticides et d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) mais les données issues de la base de données utilisée étant trop parcellaires, ces deux gradients n'étaient pas représentatifs et ne permettaient pas de discriminer les sites d'études sélectionnés.

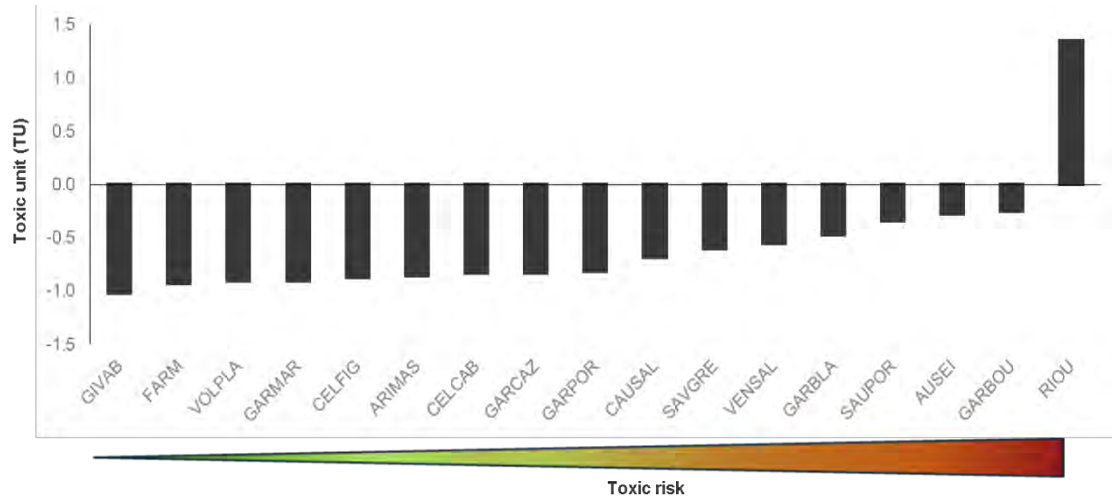


Figure 18. Gradient d'unité toxique le long des 17 sites d'études (16 dans le bassin versant de la Garonne et 1 provenant d'étang de pisciculture). Plus la valeur d'unité toxique est élevée, plus le risque de toxicité est élevé pour les populations de poissons du site considéré.

Table 2. Nombres de mesures disponibles (n), concentrations moyennes ($\mu\text{g. L}^{-1}$) et écart-type (Sd) pour les 9 ETMs suivis dans le cadre de ce projet de thèse et pour chacun des sites d'étude entre 2012 et 2016. Les valeurs de concentrations indiquées en rouge sont supérieures aux normes de qualité environnementale (AA-QS définis par l'union Européenne (Directive n°2013/39/UE). Les cellules de couleur rouge indiquent les valeurs de concentration supérieures aux concentrations létales pour 50% des poissons inclus dans un test écotoxicologique utilisant *Pimephales promelas* comme espèce modèle.

Study sites	Metal	Al	As	Cd	Cr	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
ARIMAS	n	NA	18	18	18	NA	18	18	17	19
	Mean Concentration \pm Sd	NA	1.06 \pm 0.41	0.05 \pm 0.06	1.09 \pm 0.43	NA	1.49 \pm 1.31	1.61 \pm 1.3	1.29 \pm 0.47	4.54 \pm 2.35
AUSEI	n	4	16	18	16	4	16	18	18	16
	Mean Concentration \pm Sd	59.75 \pm 26.49	2.78 \pm 1.45	0.05 \pm 0.03	1.06 \pm 0.25	1 \pm 0	6.47 \pm 12.74	1.17 \pm 0.38	1.11 \pm 0.47	28.55 \pm 27.46
CAUSAL	n	NA	6	12	6	NA	6	12	12	6
	Mean Concentration \pm Sd	NA	1.17 \pm 0.41	0.1 \pm 0.09	1.1 \pm 1.14	NA	1.53 \pm 0.95	0.83 \pm 0.45	1.42 \pm 0.9	5.67 \pm 3.27
CELCAB	n	6	28	30	28	18	28	30	30	28
	Mean Concentration \pm Sd	18.77 \pm 13.88	2.74 \pm 1.17	0.05 \pm 0.02	0.81 \pm 1	0.08 \pm 0.08	0.99 \pm 0.92	0.71 \pm 0.4	0.25 \pm 0.35	5.73 \pm 5.27
CELFIG	n	4	17	19	17	18	17	19	19	17
	Mean Concentration \pm Sd	45.4 \pm 8.78	3.17 \pm 1.49	0.05 \pm 0.02	0.43 \pm 0.15	0.07 \pm 0.03	0.92 \pm 1.08	0.54 \pm 0.15	0.22 \pm 0.34	4.44 \pm 1.27
FARM	n	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	Mean Concentration \pm Sd	38.72 \pm 1.89	0.8 \pm 0.04	0.01 \pm 0	0.19 \pm 0.02	0.09 \pm 0	2.05 \pm 0.96	0.28 \pm 0.01	0.09 \pm 0.04	5.95 \pm 2.83
GARBLA	n	NA	1	1	1	NA	1	1	1	1
	Mean Concentration \pm Sd	NA	14.56 \pm NA	0.14 \pm NA	0.86 \pm NA	NA	11.58 \pm NA	7.42 \pm NA	0.08 \pm NA	7.55 \pm NA
GARBOU	n	4	28	30	28	10	28	30	30	28
	Mean Concentration \pm Sd	22.75 \pm 2.5	1.52 \pm 0.53	0.28 \pm 1.1	1 \pm 0.26	0.52 \pm 0.41	1.72 \pm 1.79	1.12 \pm 0.56	1.4 \pm 1.67	17.8 \pm 31.56
GARCAZ	n	4	27	29	27	18	27	29	29	27
	Mean Concentration \pm Sd	20 \pm 0	1.36 \pm 0.57	0.05 \pm 0.03	1.07 \pm 0.27	0.38 \pm 0.34	1.42 \pm 1.47	1.41 \pm 1.09	1.17 \pm 0.38	4.99 \pm 1.96
GARMAR	n	4	27	29	27	18	27	29	29	27
	Mean Concentration \pm Sd	20 \pm 0	1.5 \pm 0.53	0.04 \pm 0.03	1.07 \pm 0.27	0.38 \pm 0.34	1.06 \pm 0.21	1.39 \pm 1.06	1.18 \pm 0.39	4.25 \pm 0.49
GARPOR	n	6	28	33	28	20	28	33	33	28
	Mean Concentration \pm Sd	16.67 \pm 5.16	1.7 \pm 1.54	0.05 \pm 0.04	1.06 \pm 0.28	0.47 \pm 0.49	1.42 \pm 1.94	2.24 \pm 4.27	1.15 \pm 0.44	5.36 \pm 3.7
GIVAB	n	NA	25	25	25	14	25	25	25	25
	Mean Concentration \pm Sd	NA	1.32 \pm 0.31	0.04 \pm 0.02	1.03 \pm 0.1	0.31 \pm 0.22	1.28 \pm 0.46	1.18 \pm 0.27	1 \pm 0	2.6 \pm 1.22
RIOU	n	4	4	6	4	6	4	6	6	4
	Mean Concentration \pm Sd	31.93 \pm 2.96	3.05 \pm 0.38	13.15 \pm 8.87	1.02 \pm 1.28	0.7 \pm 0.26	2.57 \pm 1.84	16.2 \pm 13.36	1.67 \pm 2.41	628.5 \pm 521.27
SAUPOR	n	4	22	24	22	18	22	24	24	22
	Mean Concentration \pm Sd	27 \pm 5.77	1.41 \pm 0.59	0.04 \pm 0.03	1 \pm 0	0.59 \pm 0.69	1.25 \pm 0.34	1 \pm 0	1 \pm 0	27.6 \pm 23.96
SAVGRE	n	NA	25	25	25	8	25	25	25	25
	Mean Concentration \pm Sd	NA	1.64 \pm 0.57	0.05 \pm 0.08	1 \pm 0	0.3 \pm 0.28	1.32 \pm 0.51	1.04 \pm 0.2	1.04 \pm 0.2	12.68 \pm 14.37
VENSAL	n	4	25	27	25	10	25	27	27	25
	Mean Concentration \pm Sd	20 \pm 0	4.64 \pm 4.95	0.06 \pm 0.06	1 \pm 0	0.6 \pm 0.36	1.36 \pm 0.56	1.04 \pm 0.19	1 \pm 0	13.59 \pm 13.07
VOLPLA	n	NA	18	18	18	NA	18	18	18	18
	Mean Concentration \pm Sd	NA	1.09 \pm 0.34	0.04 \pm 0.03	1.17 \pm 0.59	NA	1.22 \pm 1.13	1.62 \pm 1.39	1.22 \pm 0.55	4.47 \pm 1.51
REFERENCES VALUES	AA-QS	NA	1.37	0.25	NA	0.3	1.6	4	1.2	7.8
	CL50 <i>Pimephales promelas</i>	4250	9900	1	39000	3400	135	3100	110	70

Un troisième gradient a ensuite été calculé afin de caractériser la pression de parasitisme inhérente à chaque site d'étude. Ce gradient correspond à la prévalence moyenne de parasites recensée pour chacun des sites d'études au cours de l'échantillonnage des poissons (i.e. pourcentage de poissons infectés par au moins 1 parasite). En effet, au cours de l'échantillonnage qui s'est déroulé dans le cadre de l'étude transversale (Chapitre 3), un inventaire des macroparasites internes et externes a été réalisé sur une trentaine de poissons par site (après euthanasie). La majorité des parasites recensés étant apparentée au genre *Gyrodactylus*, l'indice de pression parasitaire tient compte uniquement de la prévalence recensée pour ce genre, le plus fréquemment rencontré. Les gyrodactyles sont des vers monogènes, ectoparasites et vivipares se fixant préférentiellement sur le corps et les nageoires des poissons (Fig. 19 A). Ils se nourrissent principalement du mucus et des tissus de leur hôte (Fig. 19 B et C) (Bakke et al., 2007).



Figure 19. Photos représentant l'infection d'un poisson par *Gyrodactylus salaris*. A) représente la nageoire caudale d'un salmonidé (*Salmo salar*) présentant une charge relativement importante en parasite. B) Vue de l'infection en microscopie électronique. C) les flèches indiquent les lésions causées par les gyrodactyles à l'épiderme de l'hôte. Adapté de Bakke et al. (2007)

Les gyrodactyles sont connus pour infecter leur hôte via la colonne d'eau (i.e. parasite à forme libre) mais aussi pour se propager d'un hôte à l'autre par contacts sociaux (Richards et al., 2010). Bien que dans le cadre de ce projet de recherche l'intensité de l'infection aux gyrodactyles (i.e. nombre de parasite moyen recensé par hôte) ne dépasse pas 14 parasites par individu, l'intensité de l'infection par les gyrodactyles peut atteindre des valeurs relativement hautes (> 100 parasites par individus) (Van Oosterhout et al., 2006). Ainsi, ce parasite peut affecter significativement le comportement de nage des individus en induisant des lésions importantes aux nageoires dans le cas de fortes charges parasitaires. Il peut alors déclencher une suite de réponses immunitaires locales et systémiques coûteuses chez

son hôte (Fraser and Neff, 2009; Lindenstrøm et al., 2004) et potentiellement affecter la survie de son hôte (Bakke et al., 2007).

Ainsi, trois valeurs correspondant aux trois gradients de stress (i.e. thermique, toxique et de parasitisme) ont été assignées à chacun des sites d'études. La localisation des sites d'études ainsi que les valeurs attribuées pour chaque gradient de stress ont été reportées sur la cartographie suivante (Fig. 20) ainsi que dans la Table 3. Ces valeurs ont surtout été utilisées dans le cadre du Chapitre 3, afin de mettre en lien les réponses aux stress avec la physiologie et l'état de santé des poissons le long des trois gradients de stress préalablement définis.

Dans le but d'étudier la variabilité intraspécifique de réponse aux différents facteurs de stress présentés précédemment, il était nécessaire de vérifier que les 17 populations échantillonnées appartenaient bien à la même espèce : *Gobio Occitaniae*. Pour cela, l'ADN génomique d'un échantillon d'individus (entre 6 et 58 individus par population) a été extrait aux sels (protocole adapté de Aljanabi and Martinez, 1997) à partir d'échantillons de nageoires pelviennes. Les populations de poissons échantillonnées ont ensuite été comparés à une population de Goujon commun (*Gobio gobio*, 524 individus) provenant du bassin de la Loire et qui a précédemment été étudiée par Prunier et al. (2018). La comparaison des distances génétiques entre ces différentes populations a été réalisée à l'aide de 10 microsatellites (BL153, Gob15, Gob16, Gob22, LC293, Ca1, CypG24, Gob12, Gob28, Lsou5) précédemment développés par Grenier et al. (2013). Une analyse discriminante a ensuite permis de distinguer les 17 populations étudiées dans le cadre de ce travail de thèse et la population provenant du bassin de la Loire (Fig. 21). Cette analyse indique que les populations échantillonnées ici sont bien distinctes de la population de goujon commun (*Gobio gobio*) provenant du bassin de la Loire (test de permutation : $p < 0.001$), confirmant ainsi l'appartenance des 17 populations étudiées à l'espèce *Gobio occitanie* (Fig. 21).

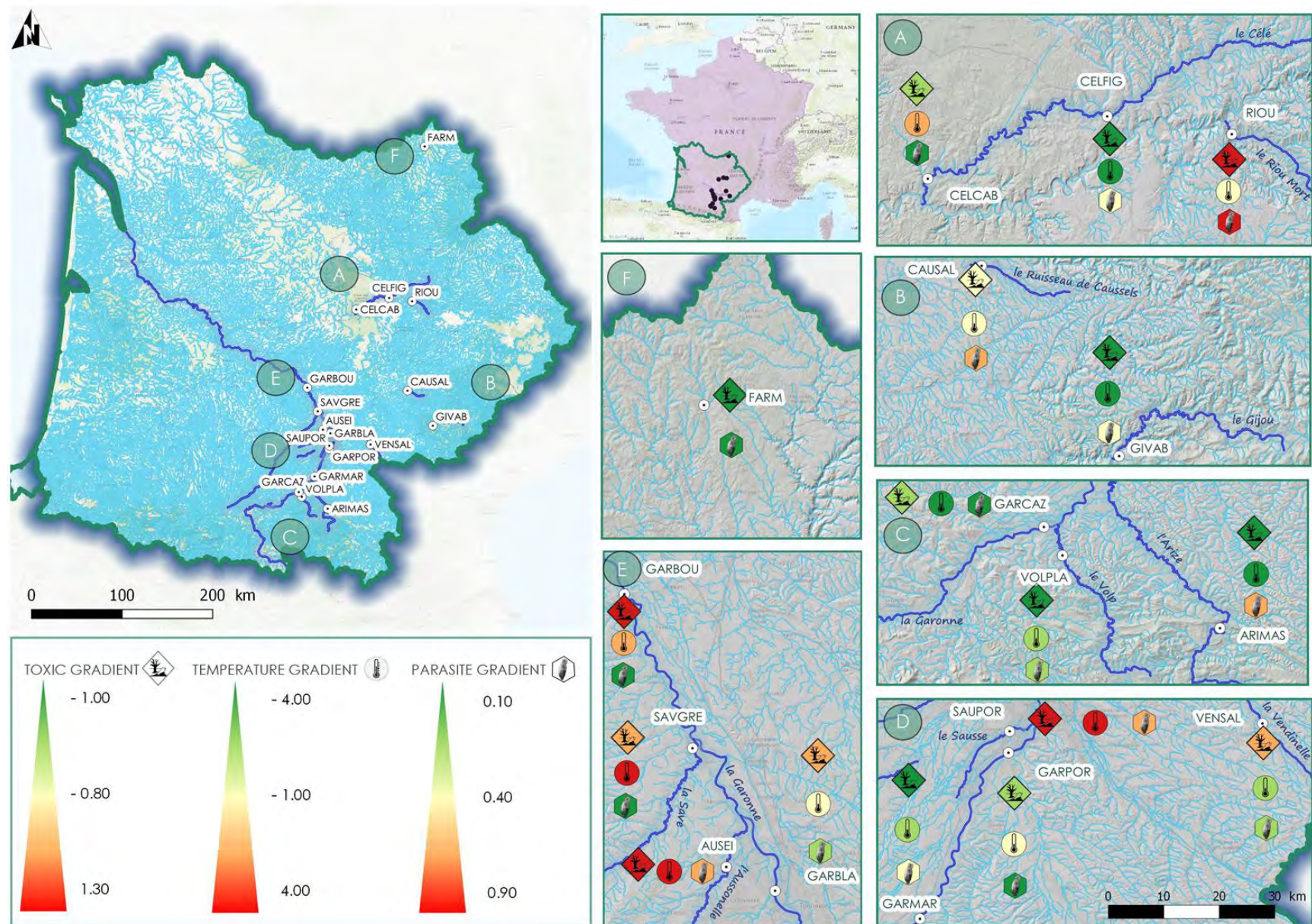


Figure 20. Localisation des sites d'études et des populations échantillonnées dans le bassin versant de la Garonne (en haut à gauche). Les lettres A, B, C, D, E et F indiquent les zones sur lesquelles les zoom (à droite) ont été réalisés. A droite, chaque nom de site est accompagné d'un trio de pictogramme représentant le niveau de chaque facteur de stress étudiés. Le cercle correspond au gradient de température moyenne annuelle (axe 1 de l'ACP regroupant les température saisonnières). Le triangle correspond au risque toxique (i.e. Toxic unit) lié au concentrations en ETMs. L'hexagone correspond à la prévalence en gyrodactyles). Chacun des gradients de stress sont représentés du vert (stress faible) au rouge (stress fort).

Table 3. Localisation (coordonnées X et Y, Lambert 93) et valeurs attribuées à chacun des sites d'études pour chacun des 3 gradients de stress (i.e. température, contamination et parasitisme).

Sites	Stream name	X	Y	Temp. GRADIENT	TU GRADIENT	Parasite GRADIENT
GIVAB	Le Gijou	652983	6287090	-3.5	-1.0	0.5
FARM	Etang	648272	6505516	NA	-0.9	0.1
VOLPLA	Le Volp	546845	6231930	-1.2	-0.9	0.4
GARMAR	La Garonne	557517	6248020	-1.2	-0.9	0.5
CELFIG	le Célé	619393	6388240	-1.7	-0.9	0.5
ARIMAS	L'Arize	567492	6221890	-1.3	-0.9	0.7
CELCAB	le Célé	593305	6379640	0.4	-0.8	0.1
GARCAZ	La Garonne	544488	6235740	-1.7	-0.8	0.1
GARPOR	La Garonne	569591	6269450	0.2	-0.8	0.1
CAUSAL	Le Caussels	633072	6315030	-0.4	-0.7	0.6
SAVGRE	La Save	561198	6299830	2.3	-0.6	0.1
VENSAL	La Vendinelle	602916	6272670	-1.1	-0.6	0.3
GARBLA	La Garonne	570981	6282179	0.2	-0.5	0.4
SAUPOR	La Saudrune	569799	6272239	3.7	-0.3	0.7
GARBOU	La Garonne	553270	6318800	0.6	-0.3	0.2
AUSEI	L'Aussonnelle	565033	6285220	2.3	-0.2	0.7
RIOU	Le Riou Mort	637385	6385460	-0.3	1.3	0.9

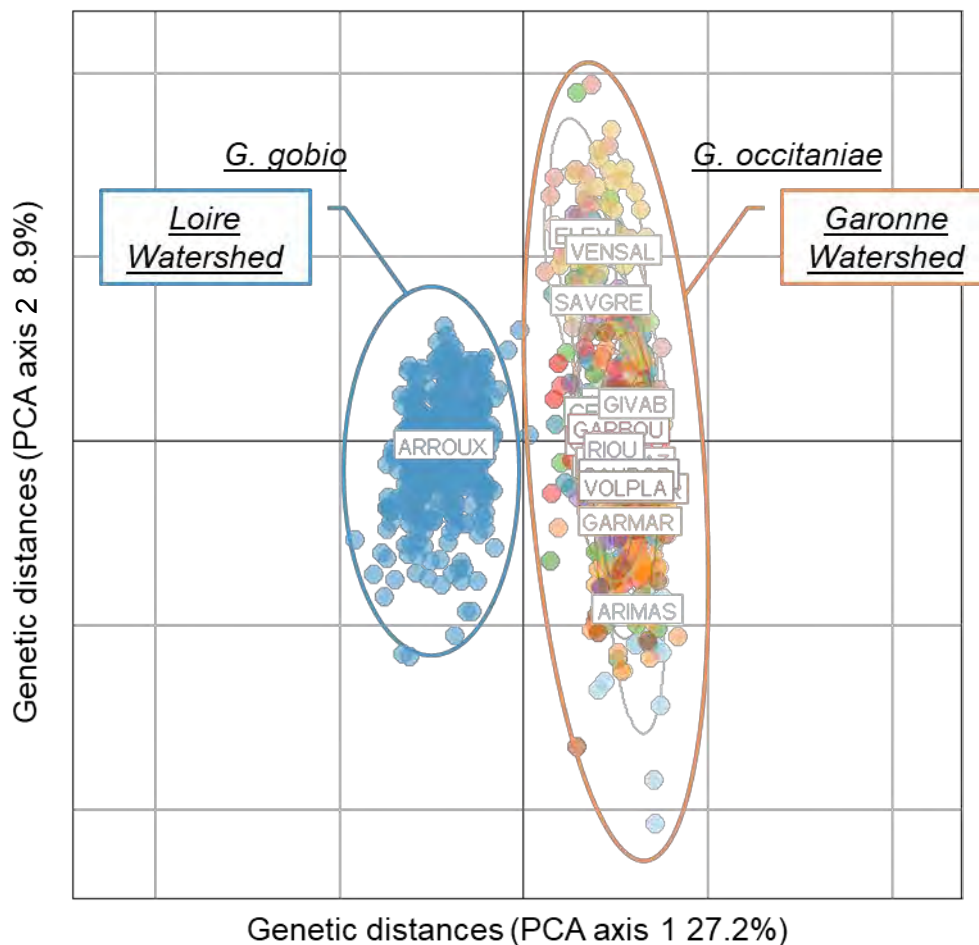


Figure 21. Analyse discriminante des distances génétiques entre les 17 populations de goujons occitans (*Gobio occitaniae*) étudiées dans le cadre de cette thèse (ellipse orange, à droite) comparés à une population de goujon commun (*Gobio Gobio*) provenant du bassin de la Loire (ellipse bleue, à gauche) et précédemment étudiée par Prunier et al. (2018). Les populations ont été discriminées sur la base de l'analyse 10 microsatellites (BL153, Gob15, Gob16, Gob22, LC293, Ca1, CypG24, Gob12, Gob28, Lsou5). Ici, l'analyse confirme bien que les populations étudiées dans le cadre de cette thèse appartiennent à la même espèce : *Gobio occitaniae*. Test de permutation : $p\text{-value} < 0.001$.

2. Design expérimentaux

2.1. ECHANTILLONNAGE ET MAINTIEN EN CAPTIVITE

Au cours de ce projet de recherche doctorale, les goujons ont été échantillonnés par pêche électrique (à l'aide d'un EFKO-FEG 1500) en accord avec la législation en vigueur et les autorités administratives. Dans le cadre des expérimentations en conditions contrôlées en laboratoire, certaines populations ont été choisies sur la base

de la caractérisation des gradients de stress présentée précédemment. Ainsi, pour l'expérimentation visant à évaluer les effets de l'interaction entre l'augmentation des températures et un challenge immunitaire (Chapitre 5), deux populations provenant de sites contrastés en terme de température moyenne ont été sélectionnées : AUSEI et CAUSAL. De la même manière, pour l'expérimentation visant à évaluer les effets de l'interaction entre l'exposition aux ETMs et un challenge immunitaire, quatre populations provenant de sites contrastés en termes de contamination aux ETMs (i.e. voir unité toxique) ont été sélectionnées : ARIMAS et CELFIG et AUSEI et RIOU (Chapitre 6). Une cinquième population (FARM) considérée comme une population de référence (i.e. peu contaminée et peu parasitée) provenant de pisciculture a été ajoutée aux expérimentations du Chapitre 6.

De retour au laboratoire, les goujons utilisés dans le cadre des expérimentations en aquarium ont été déparasités par baignade avec une solution de Praziquantel (Vetofish, France, pureté : 1000 mg.g⁻¹; concentration : 3 mg.L⁻¹), ceci afin de standardiser leur statut immunitaire. Les poissons ont été conservés en stabulation durant 30 jours pour permettre leur acclimatation progressive aux conditions de captivité. Le dispositif de stabulation correspondait à 5 bacs de 200 L contenant du gravier et des abris afin de réduire le stress (1 population par bac). Chacun des bacs était équipé d'une pompe à oxygène, de filtres mécaniques ainsi que des résistances chauffantes munies d'un thermostat pour contrôler la température de l'eau à 0,5°C près. Chaque semaine, la moitié de l'eau des bacs était renouvelée avec de l'eau déchlorée afin d'assurer des conditions de vie optimales.

Une fois la période de stabulation achevée, les poissons ont été conservés par groupe de 80 individus dans les bacs de 200 L afin de mener la première expérimentation visant à évaluer le coût de la réponse immunitaire et la cinétique de réponse au challenge immunitaire (Chapitre 4). Dans le cadre des expérimentations des Chapitres 5 et 6 (i.e. effets des stress multiples), les poissons concernés ont été transférés par groupe de 5 individus issus de la même population dans des aquariums de 37 L équipés de séparations opaques, d'une pompe à oxygène ainsi que d'une résistance chauffante munie d'un thermostat. La moitié de l'eau des aquariums était renouvelée tous les deux jours avec une eau déchlorée, filtrée (0,2 µm et charbon actif) et traitée par ultra-violet. En stabulation et lors des phases expérimentales, la

photopériode était maintenue sur un cycle jour/nuit de 12/12h et les poissons étaient nourris quotidiennement à l'aide de granulés vendus dans le commerce (JBL Propond Sterlet S) à hauteur de 1% de la biomasse présente dans l'aquarium ou dans le bac de stabulation. Afin d'obtenir des résultats à l'échelle de l'individu, chaque poisson était marqué individuellement à l'aide d'un code couleur produit avec des élastomères (Northwest Marine Technologies, Inc., Shaw Island, Washington) (Fig. 22).



Figure 22. Goujons occitans marqués à l'aide d'un code couleur unique

Au cours des expérimentations réalisées en laboratoire, les poissons ont été exposés aux différents traitements en suivant un design factoriel complet (Fig. 23), permettant ainsi de mesurer les réponses des poissons dans le cadre d'expositions simples (i.e. 1 seul facteur de stress) ou combinés (i.e. 2 facteurs de stress).

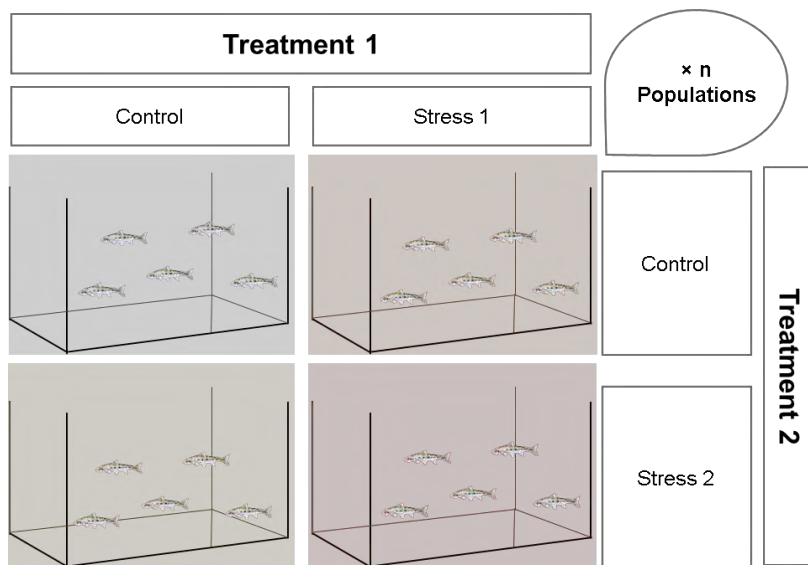


Figure 23. Design factoriel complet. L'aquarium représenté en blanc correspond au traitement control, les aquariums jaune et orange correspondent aux expositions à un seul facteur de stress et l'aquarium rouge correspond au traitement stress combinés ou multiples.

2.2. FACTEURS DE STRESS APPLIQUES EN LABORATOIRE

Afin de reproduire l'exposition aux stress dans le cadre expérimental, je me suis basé sur les données réelles mesurées dans les sites d'études, afin d'être au plus près des conditions environnementales. Dans le cadre de l'exposition à un stress thermique appliqué en laboratoire (Chapitre 5), les températures d'exposition correspondaient (i) à la température optimale de 17°C pour le groupe contrôle (Tissot and Souchon, 2010) et (ii) à la température moyenne maximale observée aux cours des périodes estivales entre 2012 et 2016, enregistrée sur le site considéré comme le plus chaud (AUSEI), soit 24°C (pour plus de détail voir Chapitre 5). De plus, chez les goujons, la température létale étant atteinte à partir de 27°C, la température de 24°C est apparue comme étant un bon compromis entre une température haute entraînant un stress et une augmentation de température réaliste (i.e. pouvant être observée dans l'environnement naturel).

Afin de se rapprocher des conditions du milieu naturel, l'exposition aux contaminants réalisée dans le Chapitre 5 s'est focalisée sur un mélange des trois ETMs les plus fréquemment mesurés et présentant les concentrations les plus importantes au sein des sites d'études sélectionnés. Ainsi, parmi les 9 ETMs suivis au cours de ce

projet, le Cd, le Cu et le Zn sont ceux qui participaient le plus au risque toxique évalué à partir du calcul de l'unité toxique (Table 4). En effet ces trois ETMs participent à eux seuls à plus de 92% de la valeur d'unité toxique attribuée à chacun des sites d'études (Table 4). Les concentrations nominales d'exposition (Cd: 14 µg. L⁻¹; Cu: 10 µg. L⁻¹ and Zn: 600 µg. L⁻¹) correspondent aux concentrations moyennes recensées sur les deux sites les plus contaminés (i.e. AUSEI et RIOU) (Table 4).

Table 4. Pourcentage de contribution de chaque ETM à la valeur d'unité toxique attribuée pour chacun des sites d'étude du bassin versant de la Garonne. Les sites sont classés par valeur d'unité toxique croissante (i.e. du moins au plus contaminé). La contribution de chaque élément à la valeur de TU (exprimée en pourcentage) et pour chaque site correspond à la proportion relative du ratio entre la concentration moyenne de l'élément considéré et sa CL50 (*Pimephales promelas*) par rapport à la somme des ratios de tous les éléments considérés pour un site d'étude donné.

Study sites	Sum of [Me]/Cl50	TU	Al	As	Cd	Cr	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
GIVAB	0.096	-1.0	NA	0.138	41.517	0.027	0.095	9.841	0.395	9.436	38.551
GARMAR	0.125	-0.9	3.773	0.121	32.067	0.022	0.09	6.295	0.359	8.6	48.673
VOLPLA	0.125	-0.9	NA	0.088	32.09	0.024	NA	7.25	0.419	8.898	51.23
CELFIG	0.133	-0.9	8.005	0.24	37.467	0.008	0.015	5.107	0.131	1.499	47.529
ARIMAS	0.138	-0.9	NA	0.077	36.16	0.02	NA	7.982	0.376	8.481	46.904
CELCAB	0.146	-0.8	3.016	0.189	34.146	0.014	0.016	5.008	0.156	1.552	55.902
GARCAZ	0.148	-0.8	3.182	0.093	33.812	0.019	0.076	7.113	0.308	7.193	48.206
GARPOR	0.153	-0.8	2.572	0.113	32.781	0.018	0.091	6.896	0.474	6.854	50.202
CAUSAL	0.206	-0.7	NA	0.057	48.625	0.014	NA	5.511	0.13	6.277	39.386
SAVGRE	0.251	-0.6	NA	0.066	19.921	0.01	0.035	3.896	0.134	3.767	72.171
VENSAL	0.279	-0.6	1.687	0.168	21.504	0.009	0.063	3.611	0.12	3.258	69.58
GARBLA	0.338	-0.5	NA	0.435	41.39	0.007	NA	25.359	0.708	0.215	31.887
SAUPOR	0.46	-0.3	1.382	0.031	8.702	0.006	0.038	2.014	0.07	1.978	85.779
AUSEI	0.531	-0.3	2.648	0.053	9.418	0.005	0.055	9.027	0.071	1.901	76.822
GARBOU	0.566	-0.2	0.946	0.027	49.487	0.005	0.027	2.252	0.064	2.249	44.943
RIOU	22.176	1.3	0.034	0.001	59.298	0	0.001	0.086	0.024	0.068	40.488
Mean contribution to the TU (%)	-	-	2.724	0.119	33.649	0.013	0.05	6.703	0.246	4.514	53.016

Afin de stimuler le système immunitaire des individus en mimant une attaque parasitaire, deux antigènes couramment utilisés ont été choisis : la phytohaemagglutinin (PHA), lectine extraite du haricot rouge (*Phaseolus vulgaris*) et un lipopolysaccharide (LPS) provenant de la paroi des bactéries Gram-négatives telles que *Escherichia coli* ou encore *Salmonella sp.* (Bowers et al., 2012; Toomey et al., 2010). L'utilisation de ces deux antigènes en mélange permet d'évaluer les réponses immunitaires à médiation cellulaire (réactions inflammatoires) ainsi que les réponses humorales. La PHA induit

des réponses immunitaires à médiation cellulaire (i.e. neutrophiles, macrophages lymphocytes), dont la mise en place est relativement rapide : 24h à 48h (Ellis, 2001), et implique généralement les lymphocytes T *via* le déclenchement de réactions chimiotactiques et mitogéniques (e.g. déclenchement de réactions inflammatoires). Le LPS implique la stimulation des réponses immunitaires humores aussi bien adaptatives qu'innées (e.g. les lymphocytes B et la formation de complexe immun), qui nécessitent 7 jours pour induire une réponse significative chez le combattant varié (*Philomachus pugnax*) (Lozano and Lank, 2004; Lozano et al., 2013), 2 jours chez le gardon (*Rutilus rutilus*) (Jolly et al., 2014) et 4 jours chez l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) (Le Guernic et al., 2016). Les concentrations conseillées pour la PHA sont de 2 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ de tampon phosphate salin (PBS), pour un rapport volume de PHA/masse fraîche des individus de 1 à 2 $\mu\text{L} \cdot \text{g}^{-1}$ de masse fraîche (MF), soit 2 à 4 $\mu\text{g PHA} \cdot \text{g}^{-1}$ MF (Ardia and Clotfelter, 2006; O'Connor et al., 2014). Pour le LPS, les concentrations sont comprises entre 0.1 $\mu\text{g LPS} \cdot \text{g}^{-1}$ MF et 9 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de MF (Bowers et al., 2012; Grindstaff et al., 2006; Le Guernic et al., 2016). Cependant ces concentrations varient d'une étude à l'autre (Otálora-Ardila et al., 2016; Toomey et al., 2010).

Au vu de cette forte variabilité entre organismes d'étude, j'ai testé les concentrations de PHA et de LPS et les temps optimaux afin d'induire une réponse immunitaire significative chez le Goujon dans le Chapitre 4. Les résultats de ce chapitre ont montré que la dose optimale à injecter afin d'induire une réponse inflammatoire et humorale significative (2 jours après injection) est de 90 μg de LPS et 90 μg de PHA contenus dans un volume de 0,01mL (voir chapitre 4 pour plus de précisions).

2.3. TRAITS MESURES

Au cours de ce projet de recherche de doctorat, plusieurs traits ont été mesurés de l'échelle moléculaire (e.g. expression de gènes) à l'échelle individuelle (e.g. comportement). Afin d'éviter toute redondance avec la description des méthodes réalisée au sein de chaque chapitre, les différents traits mesurés ont été recensés dans la figure synthétique ci-dessous (Fig. 24). Cette dernière intègre les références utiles afin

de mettre au point les différentes méthodes utilisées dans ce projet de recherche doctorale.

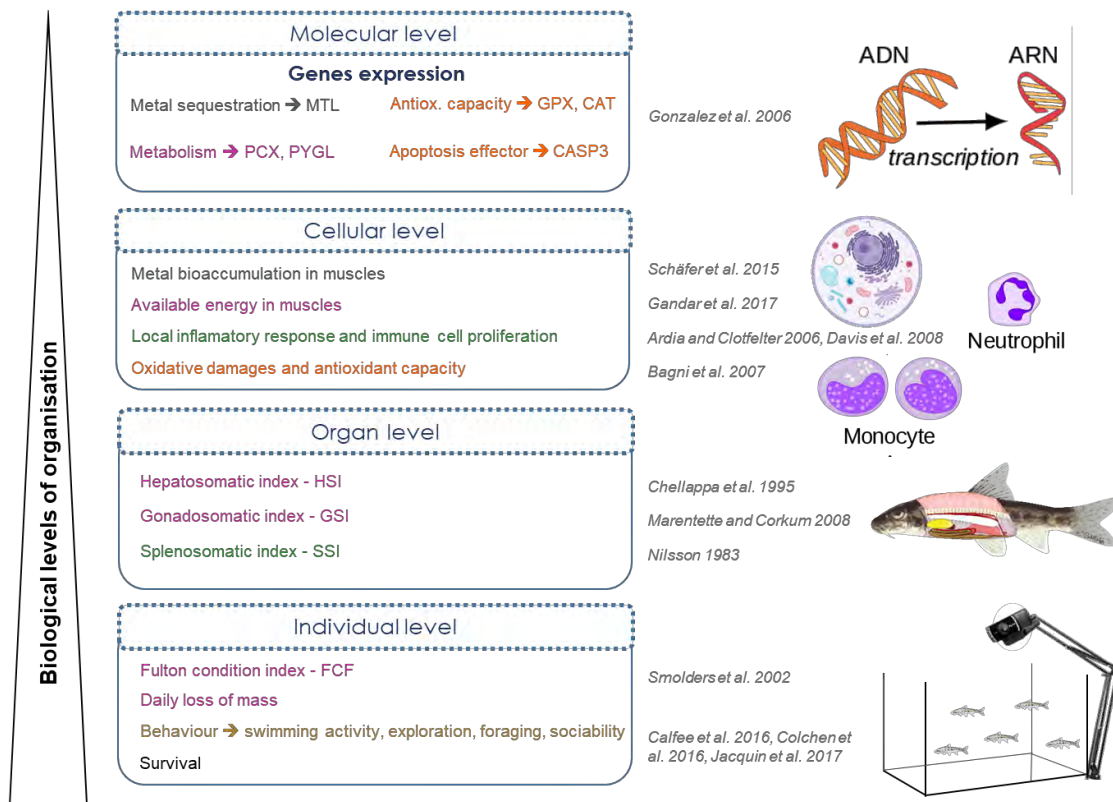


Figure 24. Synthèse des principaux traits mesurés au cours des phases expérimentales se déroulant en conditions contrôlées. Les traits sont classés par échelle d'organisation biologique et leur couleur représente la fonction ciblée : la gestion des ETMs (gris), la réponse immunitaire (vert), stress oxydant (orange), métabolisme énergétique (rose) comportement (marron) et enfin la survie (noir). MTL : Metallothionéines, GPX : Glutathione peroxydase, CAT : Catalase, PCX : Pyruvate carboxylase, PYGL : Glycogen phosphorylase, CASP3 Caspase 3.

Dans le cadre de ce projet de recherche doctorale, le choix des traits a été réalisé en accord avec les fonctions ciblées (i.e. gestion des ETMs, réponse immunitaire, stress oxydant, métabolisme et comportement) par les facteurs de stress étudiés (voir chapitre 1). Pour chaque fonction, des traits clés ont été choisis afin de mesurer la réponse des poissons face aux stress multiples.

En effet, à l'échelle moléculaire la mesure des traits s'est focalisée sur les méthodes de transcriptomique ciblée afin de caractériser les mécanismes sous-jacents impliqués dans la réponse au stress et les effets des processus adaptatifs sur la réponse au stress (Oziolor et al., 2017). Ainsi, un ensemble de gènes liés à la gestion des ETMs (i.e. MTL : Metallothionéines), la réponse immunitaire (Interféron: IFN, Facteur de nécrose

tumorale: TNF, Interleukine: 1 IL1), le stress oxydant et l'apoptose cellulaire (Superoxyde dismutase : SOD, Catalase : CAT, Glutathione peroxydase : GPX, Caspase 3 : CASP3), et le métabolisme (Pyruvate carboxylase: PCX, Glycogen phosphorylase: PYGL, Hexokinase : HK, Cytochrome-c-oxidase : COX) ont été choisis. Cependant, en raison de contraintes méthodologiques liées au fait que le génome du goujon ne soit pas séquencé, seuls les gènes présentés dans la figure 24 ont été retenus (ces résultats étant préliminaires ils n'ont pas été inclus dans ce manuscrit).

A l'échelle cellulaire, de la même manière, des traits représentant chaque fonction précédemment citée ont été choisis. En effet, la quantité d'énergie disponible est connu pour être sensible à l'exposition aux stress et donner une bonne indication de l'allocation énergétique de l'individu (De Coen and Janssen, 1997; Smolders et al., 2003). Des traits liés à l'immunité ont aussi été mesurés, en particulier la réponse inflammatoire locale (i.e. gonflement au niveau du point d'injection de l'antigène) (Ardia and Clotfelter, 2006; Tella et al., 2008) ainsi que le ratio neutrophiles/lymphocytes qui est représentatif du déclenchement de la réponse immunitaire et est susceptible à l'exposition aux stress (Davis et al., 2008; Sasaki et al., 2002; von Gersdorff Jørgensen, 2016). L'exposition aux différents facteurs de stress étant susceptible d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO), les dommages liés à la production de ERO ainsi que la capacité antioxydante (non-enzymatique) ont aussi été mesurés dans le plasma des poissons (Bagni et al., 2007; Hoogenboom et al., 2012).

A l'échelle des organes, des ratios entre la masse des organes liés à la gestion des ETMs et des réserves énergétiques (i.e. foie), au déclenchement de la réponse immunitaire (i.e. rate) ainsi qu'à la reproduction (i.e. gonades) ont été calculés afin de représenter le niveau d'investissement dans chaque fonction (Chellappa et al., 1995; Marentette and Corkum, 2008; Nilsson, 1983).

Enfin à l'échelle individuelle, la perte de masse des individus au cours des phases expérimentales ainsi que le calcul d'indice corporel (i.e. FCF) ont été réalisés afin de refléter l'état énergétique du poisson au cours des expositions. Le comportement étant une des premières réponses visibles mise en place lors de l'exposition à un stress (Wong and Candolin, 2015), plusieurs traits comportementaux ont été suivis au cours de ce

projet (i.e. activité de nage, exploration, recherche de nourriture, sociabilité). En particulier, l'activité, l'exploration ainsi que la recherche de nourriture et la sociabilité sont particulièrement affectés lors de l'exposition à des facteurs de stress (e.g. « flight or fight response », « behavioural resistance », « sickness behaviour ») (e.g. Barber et al., 2000; Jacquin et al., 2017; Kirsten et al., 2018; Koltjes, 1985). Enfin la survie des poissons sera mesurée en fin d'expérimentation.

3. Références

Aljanabi, S.M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25.

Ardia, D. R. and Clotfelter, E. D. (2006). The novel application of an immunological technique reveals the immunosuppressive effect of phytoestrogens in *Betta splendens*. *J. Fish Biol.* 68, 144–149.

Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finioia, M., Brambilla, G. and Marino, G. (2007). Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263, 52–60.

Bakke, T. A., Cable, J. and Harris, P. D. (2007). The Biology of Gyrodactylid Monogeneans: The “Russian-Doll Killers.” In *Advances in Parasitology*, pp. 161–460. Elsevier.

Bănărescu, P. and Bless, R. eds. (1999). *Cyprinidae 2, [Part] 1 [: *Rhodeus to Capoeta*]*. Wiebelsheim: AULA-Verl.

Bervoets, L. and Blust, R. (2003). Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environ. Pollut.* 126, 9–19.

Blažek, R., Jarkovský, J., Koubková, B. and Gelnar, M. (2008). Seasonal variation in parasite occurrence and microhabitat distribution of monogenean parasites of gudgeon *Gobio gobio* (L.). *Helminthologia* 45, 185–191.

Bowers, E. K., Smith, R. A., Hodges, C. J., Zimmerman, L. M., Thompson, C. F. and Sakaluk, S. K. (2012). Sex-biased terminal investment in offspring induced by maternal immune challenge in the house wren (*Troglodytes aedon*). *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 2891–2898.

Calfee, R. D., Puglis, H. J., Little, E. E., Brumbaugh, W. G. and Mebane, C. A. (2016). Quantifying Fish Swimming Behavior in Response to Acute Exposure of Aqueous Copper Using Computer Assisted Video and Digital Image Analysis. *J. Vis. Exp.*

- Chellappa, S., Huntingford, F. A., Strang, R. H. C. and Thomson, R. Y. (1995). Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J. Fish Biol.* 47, 775–787.
- Colchen, T., Teletchea, F., Fontaine, P. and Pasquet, A. (2016). Temperature modifies activity, inter-individual relationships and group structure in fish. *Curr. Zool.* zow048.
- Davis, A. K., Maney, D. L. and Maerz, J. C. (2008). The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760–772.
- De Castro-Català, N., Kuzmanovic, M., Roig, N., Sierra, J., Ginebreda, A., Barceló, D., Pérez, S., Petrovic, M., Picó, Y., Schuhmacher, M., et al. (2016). Ecotoxicity of sediments in rivers: Invertebrate community, toxicity bioassays and the toxic unit approach as complementary assessment tools. *Sci. Total Environ.* 540, 297–306.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria.
- Faller, P., Kobler, B., Peter, A., Sumpter, J. P. and Burkhardt-Holm, P. (2003). Stress status of gudgeon (*Gobio gobio*) from rivers in Switzerland with and without input of sewage treatment plant effluent. *Environ. Toxicol. Chem. Int. J.* 22, 2063–2072.
- Flammarion, P., Migeon, B., Urios, S., Morfin, P. and Garric, J. (1998). Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.* 42, 93–102.
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., Gress, L., Mormède, P., Tapie, N., Budzinski, H., et al. (2017). Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 188, 60–72.
- Gelnar, M. (1987). Experimental verification of the effect of water temperature on micropopulation growth of *Gyrodactylus katharineri* Malmberg, 1964 (Monogenea) parasitizing carp fry (*Cyprinus carpio* L.). *Folia Parasitol. (Praha)* 34, 19–23.
- Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A. and Bourdineaud, J.-P. (2006). Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Biometals Int. J. Role Met. Ions Biol. Biochem. Med.* 19, 225–235.
- Grenier, R., Costedoat, C., Chappaz, R., Dubut, V. (2013). Two multiplexed sets of 21 and 18 microsatellites for *Phoxinus phoxinus* (L.) and *Gobio gobio* (L.) developed by cross-species amplification. *Eur J Wildl Res* 59.
- Grindstaff, J. L., Hasselquist, D., Nilsson, J.-Å., Sandell, M., Smith, H. G. and Stjernman, M. (2006). Transgenerational priming of immunity: maternal exposure to a bacterial antigen enhances offspring humoral immunity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 273, 2551–2557.
- IPCC (2014). Climate change 2014: synthesis report. (ed. Pachauri, R. K.), Mayer, L.), and Intergovernmental Panel on Climate Change) Geneva, Switzerland: Intergovernmental Panel on Climate Change.

- Jacquin, L., Dybwad, C., Rolshausen, G., Hendry, A. P. and Reader, S. M. (2017). Evolutionary and immediate effects of crude-oil pollution: depression of exploratory behaviour across populations of Trinidadian guppies. *Anim. Cogn.* 20, 97–108.
- Jolly, S., Jaffal, A., Delahaut, L., Palluel, O., Porcher, J.-M., Geffard, A., Sanchez, W. and Betoulle, S. (2014). Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13103–13117.
- Keith, P., Persat, H., Feunteun, E. and Allardi, J. (2011). *Les Poissons d'eau douce de France*. Biotope. Paris, France.
- Kestemont, P. P. (1989). Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio* L. 2 Variations saisonnières dans l'histologie des testicules. *J. Appl. Ichthyol.* 5, 111–121.
- Kestemont, P. and Awaïss, A. (1989). Larval rearing of the gudgeon, *Gobio gobio* L., under optimal conditions of feeding with the rotifer, *Brachionus plicatilis* OF Müller. *Aquaculture* 83, 305–318.
- Kestemont, P. P., Van Driessche, I. and Mélard, C. (1991). Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio*, L.: 3. Maturation des gonades sous régimes thermiques ovulatoire et sub-ovulatoire. *J. Appl. Ichthyol.* 7, 205–216.
- Knapen, D., Bervoets, L., Verheyen, E. and Blust, R. (2004). Resistance to water pollution in natural gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. *Aquat. Toxicol.* 67, 155–165.
- Kottelat, M. and Freyhof, J. (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Cornol: Publ. Kottelat.
- Kottelat, M. and Persat, H. (2005). The genus *Gobio* in France, with redescription of *G. gobio* and description of two new species (Teleostei: Cyprinidae). *Cybium* 29, 211–234.
- Kuzmanović, M., López-Doval, J. C., De Castro-Català, N., Guasch, H., Petrović, M., Muñoz, I., Ginebreda, A. and Barceló, D. (2016). Ecotoxicological risk assessment of chemical pollution in four Iberian river basins and its relationship with the aquatic macroinvertebrate community status. *Sci. Total Environ.* 540, 324–333.
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Floriani, M., Turies, C., Chadili, E., Vedova, C. D., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., et al. (2016). Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25, 1478–1499.
- Loot, G., Reyjol, Y., Poulet, N., Simkova, A., Blanchet, S. and Lek, S. (2007). Effects of small weirs on fish parasite communities. *Parasitol. Res.* 101, 1265–1276.
- Lozano, G. A. and Lank, D. B. (2004). Immunocompetence and testosterone-induced condition traits in male ruffs (*Philomachus pugnax*). *Anim. Biol.* 54, 315–329.
- Lozano, G. A., Lank, D. B. and Addison, B. (2013). Immune and oxidative stress trade-offs in four classes of Ruffs (*Philomachus pugnax*) with different reproductive strategies. *Can. J. Zool.* 91, 212–218.

- Marcelle, C. and Thome, J. P. (1983). Acute toxicity and bioaccumulation of lindane in gudgeon, *Gobio gobio* (L.). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 31, 453–458.
- Marentette, J. R. and Corkum, L. D. (2008). Does the reproductive status of male round gobies (*Neogobius melanostomus*) influence their response to conspecific odours? Environ. Biol. Fishes 81, 447–455.
- Nelson, J. S., Grande, T. C. and Wilson, M. V. H. (2016). Fishes of the World: Nelson/Fishes of the World. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.
- Nilsson, S. (1983). Autonomic Nerve Function in the Vertebrates. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- O'Connor, C. M., Reddon, A. R., Marsh-Rollo, S. E., Hellmann, J. K., Ligocki, I. Y., Hamilton, I. M. and Balshine, S. (2014). A comparative study of an innate immune response in Lamprologine cichlid fishes. Naturwissenschaften 101, 839–849.
- Otálora-Ardila, A., Flores-Martínez, J. J. and Welch Jr, K. C. (2016). Metabolic cost of the activation of immune response in the fish-eating myotis (*Myotis vivesi*): the effects of inflammation and the acute phase response. PLoS One 11, e0164938.
- Pecínková, M., Matejusova, I., Koubková, B. and Gelnar, M. (2005). Classification and occurrence of abnormally developed Paradiplazoon homioion (Monogenea, Diplozoinae) parasitising gudgeon *Gobio gobio*. Dis. Aquat. Organ. 64, 63–68.
- Prunier, J.G., Dubut, V., Loot, G., Tudesque, L., Blanchet, S. (2018). The relative contribution of river network structure and anthropogenic stressors to spatial patterns of genetic diversity in two freshwater fishes: A multiple-stressors approach. Freshw Biol 63, 6–21.
- Richards, E. L., Oosterhout, C. van and Cable, J. (2010). Sex-Specific Differences in Shoaling Affect Parasite Transmission in Guppies. PLOS ONE 5, e13285.
- Schäfer, S., Buchmeier, G., Claus, E., Duester, L., Heininger, P., Körner, A., Mayer, P., Paschke, A., Rauert, C., Reifferscheid, G., et al. (2015). Bioaccumulation in aquatic systems: methodological approaches, monitoring and assessment. Environ. Sci. Eur. 27.
- Shinn, C., Blanchet, S., Loot, G., Lek, S. and Grenouillet, G. (2015). Phenotypic variation as an indicator of pesticide stress in gudgeon: Accounting for confounding factors in the wild. Sci. Total Environ. 538, 733–742.
- SIE (2016). SIEAG-database. Agence de l'eau ADOUR-GARONNE. <http://adour-garonne.eaufrance.fr/accueil>
- Smolders, R., Bervoets, L., De Boeck, G. and Blust, R. (2002). Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). Environ. Toxicol. Chem. 21, 87–93.
- Sprague, J. B. (1970). Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. Water Res. 4, 3–32.

Stott, B., Elsdon, J. W. V. and Johnston, J. A. A. (1963). Homing behaviour in gudgeon (*Gobio gobio*, (L.)). *Anim. Behav.* 11, 93–96.

Szlachciak, J. and Ząbkiewicz, D. (2008). Morphological characteristics and variation of gudgeon, *Gobio gobio* (Actinopterygii: Cyprinidae), from the Odra River drainage, Poland. *Acta Ichthyol. Piscat.* 38, 9–19.

Tang, K. L., Agnew, M. K., Chen, W.-J., Vincent Hirt, M., Raley, M. E., Sado, T., Schneider, L. M., Yang, L., Bart, H. L., He, S., et al. (2011). Phylogeny of the gudgeons (Teleostei: Cyprinidae: Gobioninae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 61, 103–124.

Taylor, M. and Hoole, D. (1989). *Ligula intestinalis* (L.)(Cestoda: Pseudophyllidea): plerocercoid-induced changes in the spleen and pronephros of roach, *Rutilus rutilus* (L.), and gudgeon, *Gobio gobio* (L.). *J. Fish Biol.* 34, 583–596.

Tissot, L. and Souchon, Y. (2010). Synthèse des tolérances thermiques des principales espèces de poissons des rivières et fleuves de plaine de l'ouest européen. *Hydroécologie Appliquée* 17, 17–76.

Toomey, M. B., Butler, M. W. and McGraw, K. J. (2010). Immune-system activation depletes retinal carotenoids in house finches (*Carpodacus mexicanus*). *J. Exp. Biol.* 213, 1709–1716.

USEPA (2008). ECOTOX 4.0 ecotoxicology database. <http://cfpub.epa.gov/ecotox>.

Van Campenhout, K., Bervoets, L. and Blust, R. (2003). Metallothionein concentrations in natural populations of gudgeon (*Gobio gobio*): relationship with metal concentrations in tissues and environment. *Environ. Toxicol. Chem. Int. J.* 22, 1548–1555.

Van Oosterhout, C., Joyce, D. A., Cummings, S. M., Blais, J., Barson, N. J., Ramnarine, I. W., Mohammed, R. S., Persad, N. and Cable, J. (2006). Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evol. Int. J. Org. Evol.* 60, 2562–2574.



CHAPITRE 3

DIRECT AND INDIRECT EFFECTS OF STRESSORS ON GUDGEON HEALTH

Résumé du chapitre

Parmi les facteurs de stress les plus couramment rencontrés dans les écosystèmes aquatiques, la contamination par les éléments trace métalliques (ETMs) ainsi que l'augmentation des températures de l'eau, font partie des facteurs les plus impactants (Sabater et al., 2019; Segner et al., 2014). Au contraire, les parasites, qui sont connus pour affecter la physiologie et plus généralement l'état de santé de leur hôte, restent peu considérés en tant que facteur de stress chez les poissons (Brunner et al., 2017; Hatcher et al., 2012; Preston et al., 2016). De plus les interactions entre ces facteurs de stress sont encore peu connues, en particulier en condition *insitu*. Comme décrit dans le chapitre 1, ces trois facteurs de stress affectent des voies physiologiques communes telles que les processus de détoxification, la réponse immunitaire et le métabolisme énergétique (Barton, 2002; Segner et al., 2014; Sokolova et al., 2012). Ils sont ainsi susceptibles d'interagir et d'affecter de façon importante la réponse des poissons à l'échelle individuelle (i.e. indices de condition, croissance). Cependant, peu d'études ont été menées sur les effets combinés de ces trois facteurs de stress chez les poissons d'eau douce sur le terrain.

Dans ce chapitre nous avons cherché à évaluer les effets directs et indirects de trois gradients de stress relevés *in situ* (i.e. contamination en éléments en trace métallique, température de l'eau, pression de parasitisme) sur l'état de santé d'une espèce de poisson d'eau douce. Au vu de la littérature, **nous avons émis l'hypothèse que les facteurs de stress et leurs interactions affecteraient l'état de santé des poissons principalement au travers d'altérations physiologiques induites par l'exposition facteurs de stress (i.e. effets indirects).**


Afin de tester cette hypothèse, 16 populations de goujons occitans (*Gobio occitaniae*) ont été échantillonnées le long de trois gradients de stress dans le bassin versant de la Garonne (i.e. contamination en éléments en trace métallique, température de l'eau, pression de parasitisme). Sur chacun des poissons échantillonnés, des mesures représentant la condition des poissons à l'échelle individuelle ont été réalisées (i.e. taux de croissance, indice de conditions, charge parasitaire, taille des télomères). Afin de caractériser les mécanismes sous-jacents, une

suite de traits physiologiques potentiellement impactés par ces facteurs de stress a été mesurée (i.e. accumulation d'ETMs, taux de réserves énergétiques dans les muscles, réponse immunitaire et lésions au foie). Afin de tester les liens entre échelles d'organisation (i.e. physiologie vs individu) le long des gradients de stress, une approche de modélisation par équation structurelle (i.e. Structural Equation Modelling SEM) a été utilisée. Cette méthode permet de quantifier les effets de plusieurs prédicteurs, ici les facteurs de stress, et de variables réponses en vue de tester des corrélations et d'inférer un réseau causal, c'est-à-dire de tester des liens de cause à effet.

Contrairement à notre hypothèse de départ, nos résultats indiquent que les effets de ces trois facteurs de stress sur les traits à l'échelle de l'individu sont exclusivement directs. Autrement dit, les facteurs de stress avaient des effets directs sur la condition ou la croissance, et ce indépendamment de l'état physiologique des poissons au moment de l'échantillonnage. Néanmoins, les facteurs de stress avaient malgré tout des effets sur la physiologie des poissons (sans que cela ne puisse être lié aux réponses à l'échelle individuel). Par exemple, le taux de réserves énergétiques stockées dans les muscles des poissons était négativement corrélé au gradient de parasitisme. De plus, le long du gradient de contamination, des effets indirects ont été mis en évidence entre traits physiologiques. Le taux d'ETMs bioaccumulé dans les muscles des poissons augmentait de manière significative le long du gradient de contamination, et les résultats des SEM suggèrent que cette bioaccumulation de métaux contribuait à l'inflammation chronique des tissus hépatiques observée et causait des lésions cellulaires dans le foie (i.e. hépatotoxicité). Cela suggère que les poissons vivants dans les milieux contaminés présentent les symptômes d'une inflammation chronique qui affecterait l'intégrité de leurs organes, en particulier de leur foie, organe central du métabolisme énergétique et de la détoxification.

A l'échelle individuelle, les poissons présentent une condition corporelle croissante le long du gradient de température. De plus, des effets combinés ont été détectés à l'échelle individuelle. La température interagissait avec la contamination aux ETMs sur la croissance des poissons durant la première année : la croissance des poissons vivant dans les sites à la fois chauds et contaminés était réduite, ce qui suggère une interaction synergique entre ces facteurs de stress.

En résumé, peu d'effets des stress multiples ont été mis en évidence dans cette étude de terrain, contrairement à nos attentes. En particulier, peu d'effets négatifs des stress multiples ont été détectés au niveau physiologique et individuel. De plus, contrairement à l'hypothèse formulée au départ, aucun lien n'a été mis en évidence entre la condition des poissons à l'échelle individuelle et les réponses physiologiques. Ces résultats pourraient être, en partie, expliqués



par le fait que les poissons les plus impactés ont été éliminés des populations par sélection naturelle.

En conclusion, ce chapitre souligne l'importance de prendre en compte les effets directs et indirects des stress simples et multiples à différentes échelles d'organisation afin de mieux comprendre et prédire leurs effets sur les populations de poissons d'eau douce. Pour aller plus loin, d'autres investigations en conditions contrôlées sont nécessaires afin de mieux comprendre comment l'exposition aux stress multiples peut affecter les processus physiologiques et l'état de santé des poissons et afin de tenir compte de la variabilité de réponse entre populations ayant des historiques d'exposition différentes.

Direct and indirect physiological effects of multiple environmental stressors on gudgeon health.

Quentin Petitjean^{1,2}, Séverine Jean¹, Jessica Côte², Thibaut Larcher³, Frédéric Angelier⁴, Cécile Ribout⁴, Annie Perrault¹, Pascal Laffaille¹, Lisa Jacquin²

¹ *Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR5245 EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.*

² *EDB, UMR5174 EDB, Université de Toulouse, CNRS, IRD, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.*

³ *Plateforme APEX, INRA-Oniris UMR0703 PAnTher La Chantrerie 44307 Nantes Cedex 3, France*

⁴ *Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, UMR 7372, Université de la Rochelle, CNRS, F-79360 Villiers en Bois, France*

ABSTRACT

Freshwater fish face multiple challenges in human-altered rivers such as trace metal contamination, temperature increase and parasitism. These multiple stressors could have unexpected interactive effects on fish health due to shared physiological pathways, but few studies investigated this question in wild fish populations. In this study, we compared 16 populations of gudgeon (*Gobio occitaniae*) distributed along perturbation gradients in human-altered rivers in the South of France. We tested the effects of single and combined stressors (i.e., metal contamination, temperature, parasitism) on key traits linked to fish health across different biological levels using a Structural Equation Modelling approach. Parasitism and temperature alone had limited deleterious effects on fish health. In contrast, fish living in metal-contaminated sites had higher metal bioaccumulation and higher levels of cellular damage in the liver through the induction of an inflammatory response. In addition, temperature and contamination had interactive negative effects on growth. These results suggest that trace metal contamination has deleterious effects on fish health at environmentally realistic concentrations and that temperature can modulate the effects of trace metals on fish growth. With this study, we hope to encourage integrative approaches in realistic field conditions to better predict the effects of natural and anthropogenic stressors on aquatic organisms.

Keywords Pollution, trace metals, global change, parasitism, ecophysiology, structural equation modelling

1. Introduction

Freshwater ecosystems are increasingly exposed to multiple natural and anthropogenic stressors that could interact and cause unexpected “ecological surprises” (e.g., Christensen et al., 2006; Lange et al., 2018; Schinegger et al., 2016). However, the interactive effects of multiple stressors on fish physiology and health remain largely unknown, which limits our ability to predict the combined effects of environmental stressors on fish populations (Killen et al., 2013; Petitjean et al., 2019; Segner et al., 2014). In human-altered streams, trace metal contamination due to industrial activities and urban wastes, and water temperature increase due to climate change are major stressors affecting the aquatic fauna (Reid et al., 2019; Segner et al., 2014). In addition, parasites are biotic stressors that can affect the physiology (Buchmann and Lindenstrøm, 2002; Slavík et al., 2017; von Gersdorff Jørgensen, 2016) and life-history traits of their hosts (Britton et al., 2011; Šimková et al., 2008). Although the isolated effects of contamination, temperature and parasitism are well documented, their potential interactive effects on fish health remain largely unknown.

These three stressors affect similar physiological pathways, such as immunity, inflammation, and energy management (Dautremepuits et al., 2004; Dittmar et al., 2014; Gandar et al., 2017a), which could result in strong interactive effects. For instance, temperature and contamination can alter fish immunity and affect parasite resistance (i.e., the ability of fish to limit parasite intensity) (Franke et al., 2017; Paul et al., 2014; Sheath et al., 2016). Multiple stressors may also have complex interactive effects on detoxification processes and contaminants bioaccumulation, and trigger inflammatory responses, oxidative stress and cellular damage depending on the combination of stressors. For instance, high temperature can aggravate the effects of contamination by increasing fish metabolism and contaminants uptake (Guinot et al., 2012; Noyes et al., 2009; Sokolova and Lannig, 2008) and may result in higher oxidative stress and cellular lesions (Gandar et al., 2017b; Jacquin et al., 2019). In addition, the activation of costly immune and inflammatory responses under multiple stress is expected to affect energy management and deplete energy reserves (Gimbo et

al., 2015; Marteinson et al., 2017; Martin et al., 2003), thereby affecting fish body condition and growth at the individual level (Johnson and Dick, 2001; Jokela and Mutikainen, 1995; Wernicke von Siebenthal et al., 2018).

Recently, environmental stressors have been shown to accelerate the attrition of telomeres, which are conserved tandem repeats of DNA, causing cell senescence when too short (Blackburn, 2005; Monaghan, 2010, 2014; Monaghan and Hausmann, 2006). Several stressors can affect telomere's length, such as contamination (Blévin et al., 2016; Louzon et al., 2019), temperature (Debes et al., 2016; Simide et al., 2016) and parasitism (Stauffer et al., 2017). However, the interactive effects of multiple stressors on telomere shortening are still unknown. More generally, the relative effects of stressors combinations on fish health and their underlying mechanisms are still unclear. Most previous studies investigated the interactive effects of multiple stressors using experimental approaches in controlled laboratory conditions (and usually with laboratory-reared animals) to control environmental variables and test causative links (Petitjean et al., 2019). However, such controlled approaches are sometimes far from realistic conditions (reviewed in Calisi and Bentley, 2009), which can change the outcomes of stress exposure, especially in a multistress framework. There is thus a growing need to investigate the effects of multiple stressors in realistic natural field conditions to better predict the consequences of anthropogenic stressors on wild fish populations.

In this study, we tested the effects of realistic gradients of trace metal contamination, temperature, and parasitism on fish physiological traits (i.e., metals bioaccumulation, available energy, immunity, cellular damage, telomere length), and their potential cascading effect on fish health (i.e., body condition, parasite intensity, growth) in 16 populations of gudgeon (*Gobio occitaniae*) from the Garonne watershed, South of France. We used Structural Equation Modelling (SEM) analyses to test hypotheses on direct and indirect effects of stressors by comparing several causal scenarios linking environmental factors and response traits at different biological levels (e.g., Blanchet et al., 2009; Fourtune et al., 2016); to decipher the multiple effects of combined anthropogenic stressors on wild fish populations.

2. Material and Methods

2.1. MODEL SPECIES

The gudgeon (*Gobio occitaniae*) was chosen as a model species because it is widely distributed in South-West France and is exposed to several stress factors in its natural environment. This species is relatively sedentary and thereby exposed to the same environmental stressors during its lifetime (Keith et al., 2011; Stott et al., 1963). The gudgeon is a benthic species and is thus exposed to contaminants through sediments, water and food. Moreover, this species is exposed to a wide range of temperatures and parasites in the wild, especially gyrodactylids (Loot et al. 2007). Gyrodactylids are monogenean ectoparasites feeding on fish skin and fins with important effects on fish immunity and life-history traits (Bakke et al., 2007; Buchmann and Lindenstrøm, 2002). Previous studies showed a relatively high allelic richness and low genetic differentiation (Fst) between sites within our study area (Fourtune et al., 2016), suggesting high gene flow among our study populations. Interestingly, gudgeon generally displays contrasted phenotypic responses to environmental variations among populations (Knapen et al., 2004; Shinn et al., 2015).

2.2. SAMPLING SITES

We selected 16 study sites in the Garonne watershed (Fig. 25) along three environmental gradients (i.e., trace metal contamination, water temperature and parasite). Contamination levels and temperatures were calculated based on a dataset from the Adour-Garonne Water Agency (Table 5) from summer 2012 to summer 2016 (i.e., during 4 years, which corresponds to the lifetime duration of the gudgeon) (SIE, 2016). We first computed a contamination gradient using a Toxic Unit (TU) for trace metals elements based on previous studies (Kuzmanović et al. 2016, Sprague 1970). For each study site, a TU was computed for 9 trace metal elements (i.e., aluminium-Al, arsenic-As, cobalt-Co, lead-Pb, zinc-Zn, nickel-Ni, cadmium-Cd, chromium-Cr, and copper-Cu) depending on their concentration and toxicity:

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

C_i corresponds to the average concentration of an element in the water column measured by the Water Agency between 2012 and 2016. LC50 corresponds to the lethal concentration for 50% of *Pimephales promelas* fish in an ecotoxicity bioassay (data from the ECOTOX database, USEPA, 2008). A higher TU thus reflects a higher metal toxic risk for fish. We completed this Water Agency dataset with direct measurements of trace metal concentrations in the water collected during fish sampling (see Table 5 for concentrations). Direct measurements of trace metals concentrations were indeed consistent with the Water Agency database. We also computed a TU for organic pollutants (i.e., pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons), but few organic pollutants were reliably detected. Also, most sites had similar and low TU values for organic pollutants. Consequently, the TU gradient of organic contamination was not included in the final analysis, and only trace metal contamination was taken into account in this study.

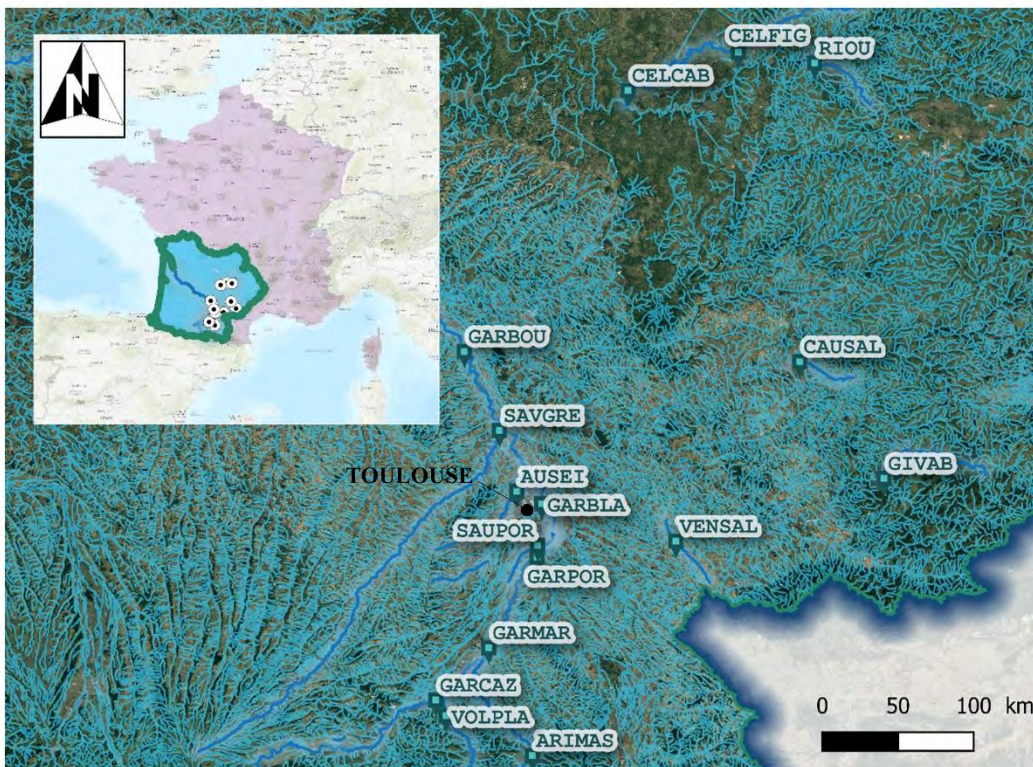


Figure 25. Location of the 16 study sites in the Garonne watershed (South-West France).

Temperature was recorded by the French water agency each month. We computed a gradient of water temperature using a PCA analysis with seasonal mean water temperature (mean of 3 months for each season) and variation coefficients for each study site (see Table 5), to take into account both mean and variations of temperatures among sites. While the first PCA axis was mostly explained by the mean temperature across seasons (35.7% of explained variance), the second axis was mostly explained by the variations coefficient of temperature (30.1% of explained variance) (Fig. 17 from Chapter 2: Materiel & Methodes). Because the gradient of temperature variation (i.e., second PCA axis) did not have any effect on the traits measured in this study, we only reported the effects of the mean temperature gradient (i.e., first PCA axis) (Table 5) (e.g., min/max mean summer temperature: 14°C/21°C; min/max mean winter temperature: 6°C/11°C, see Table 1 from Chapter 2: Materiel & Methodes for more details).

Table 5. Characteristics of study sites: location (Longitude and Latitude in Lambert 93 coordinates), number of fish used in statistical analysis and summary of the three environmental gradients. The contamination gradient corresponds to an integrative index of the toxic risk for fish (Toxic unit - TU) based on dissolved trace metals concentrations in the water. The temperature gradient corresponds to the mean water temperature (first PCA axis, see Fig. 17 from Chapter 2: Materiel & Methodes). The parasite prevalence was calculated as the mean Gyrodactylus prevalence per site (% of infected fish per site), reflecting the encounter probability between this socially transmitted parasite and its host in each site (i.e., risk of being infected). The Variance Inflation Factor (VIF) of the three predictors was below the threshold of 3, showing low collinearity among the three gradients (Zuur et al., 2010).

SITES	STREAM NAME	LONGITUDE	LATITUDE	NUMBER OF FISH	CONTAMINATION GRADIENT	TEMPERATURE GRADIENT	PARASITE PREVALENCE
GIVAB	Le Gijou	652983	6287090	16	-1.0	-3.5	52
VOLPLA	Le Volp	546845	6231930	16	-0.9	-1.2	36.7
GARMAR	La Garonne	557517	6248020	15	-0.9	-1.2	48.3
CELFIG	le Célé	619393	6388240	19	-0.9	-1.7	46.7
ARIMAS	L'Arize	567492	6221890	18	-0.9	-1.3	70.8
CELCAB	le Célé	593305	6379640	15	-0.8	0.4	10
GARCAZ	La Garonne	544488	6235740	27	-0.8	-1.7	10
GARPOR	La Garonne	569591	6269450	3	-0.8	0.2	12.5
CAUSAL	Le Caussels	633072	6315030	19	-0.7	-0.4	60.7
SAVGRE	La Save	561198	6299830	7	-0.6	2.3	14.3
VENSAL	La Vendinelle	602916	6272670	11	-0.6	-1.1	30
GARBLA	La Garonne	570981	6282179	17	-0.5	0.2	40
SAUPOR	La Saurune	569799	6272239	5	-0.3	3.7	66.7
GARBOU	La Garonne	553270	6318800	7	-0.3	0.6	20
AUSEI	L'Aussonnelle	565033	6285220	8	-0.2	2.3	73.3
RIOU	Le Riou Mort	637385	6385460	15	1.3	-0.3	86.7

We scanned all fish for ecto- and endo-parasites (skin, fin, gill, and gut), and the most prevalent and abundant parasite was *Gyrodactylus* sp., which was consistent

with previous studies (Loot et al. 2007). We thus focused our study on this parasite. The mean Gyrodactylus prevalence per site (i.e., percentage of infected fish in a population) and parasite intensity (i.e., number of the parasite on each infected fish) were assessed by thoroughly scanning fins under a dissecting microscope (x10) (e.g., Jacquin et al., 2016).

We used the mean parasite prevalence (i.e., percentage of infected fish per site) to assess a gradient of parasitism within each study site (i.e., risk of being infected) (Table 5). Indeed, gyrodactylids are socially transmitted parasites (Bakke et al., 2007) that are transmitted through fish to fish contacts, so that the risk of being infected depends partly on the proportion of infected fish in the population (i.e., the mean parasite prevalence in each site) (Patterson and Ruckstuhl, 2013; Poulin, 2006; Sol et al., 2003). We also counted the number of parasites on each infected fish to assess parasite resistance (i.e., the ability of the host to limit parasite proliferation), which partly depends on fish immunity (Cable and van Oosterhout, 2007; López, 1998; van der Oost et al., 2003).

We checked that the mean parasite prevalence per site was stable across years (2016 and 2017) in a subset of four study sites (ANOVA: effect of the year: $F = 1.60$, $p = 0.21$), as shown in previous studies (Gotanda et al., 2013), showing that mean gyrodactylids prevalence is generally consistent across years and could be a reliable relative measure of risk of being infected among sites, although seasonal variations probably occur. To check the multicollinearity among the three selected gradients (i.e., contamination, temperature, parasitism), we computed a Variance Inflation Factor (VIF) as recommended by Zuur et al. (2010). The VIF was below the threshold of 3 for each stressor, suggesting that collinearity was low and that the estimate for each environmental gradient could be reliably assessed (Zuur et al., 2010). Because other environmental variables could also affect fish health, we computed an index with potential physico-chemical confounding variables in a PCA gathering pH, dissolved O₂ concentrations, suspended organic matter, conductivity, total organic carbon, total phosphorus, nitrates, nitrites and ammonium. The first axis, explained 63.2% of the variance (see Fig. S1), and was included as a physico-chemical covariate in all statistical models, and removed when non-significant.

2.3. SAMPLE COLLECTION

A total of 440 Fish were sampled by electrofishing (EFKO-FEG 1500). All fish were weighed (± 0.1 g) and measured (± 0.1 cm). Physiological assays were conducted on a subset of 3 to 27 fish per study sites depending on the trait considered (i.e., total sampling size $n = 218$, see Table 5) after euthanasia using anesthetic overdose (Eugenol, 1 mL.L^{-1}) during spring (May-June). These fish were dissected for sex determination and their liver was weighed (± 1 mg) to calculate hepatosomatic index. For some individuals, organs were too small to measure some traits, so that sample size can vary depending on the physiological trait considered. The fish muscle was aliquoted in two parts, which were kept at -20°C for subsequent measurement of trace metal bioaccumulation and available energy. Fish scales were collected to determine the age and growth of each individual during its first year of life. Pelvic fins were collected and stored at -20°C to measure telomere length in somatic tissues. Blood samples were collected from the caudal vein in heparinized syringes (1mL Terumo syringe, 0.45x13 mm needle) to measure immunity.

2.4. PHYSIOLOGICAL TRAIT: BIOACCUMULATION OF TRACE METALS

The first part of fish muscle was freeze-dried, homogenized using Fastprep®-24 homogenizer and analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Agilent 7500ce) after hot acidic mineralization in HNO_3 (67-69%, Trace Metal Grade, Fisher Chemical) using hot plates. We assessed the reliability of the analyses using TORT-3 (lobster hepatopancreas) certified reference material. Concentrations recovery for the 9 metals considered (i.e., As, Al, Co, Pb, Zn, Ni, Cd, Cr, Cu) reached an average of $94 \pm 6\%$ with a minimum value of $85 \pm 12\%$ and a maximum value of $104 \pm 8\%$ for As and Cr respectively (for more details see Table 2 from Chapter 2: Materiel & Methodes). Concentrations of the 9 trace metal elements in fish muscle (see Table S1) were centered, scaled and summed. Finally, the summed concentrations were log-transformed to calculate a bioaccumulation index.

2.5. PHYSIOLOGICAL TRAIT: AVAILABLE ENERGY

The second part of fish muscle was used to assess the available energy as the sum of total carbohydrate, lipid and protein contents in fish muscle following previous studies (Gandar et al., 2016, 2017a; Smolders et al., 2004). The amount of available energy in muscle cells is a useful marker of energy status, because it is critical for the maintenance of biological functions of fish, especially under stress (Gandar, 2015). We used the protocol from De Coen and Janssen (1997) modified by (Gandar et al., 2017a). 25 mg of fish muscle were homogenized in 1 mL of ultrapure water using Fastprep®-24 homogenizer. Muscle suspension was divided into 2 aliquots. The first aliquot was mixed with trichloroacetic acid (TCA) and incubated -20°C. Then, the sample was centrifuged to split up the supernatant and the pellets. 50 µL of the supernatant was read at 492 nm against glucose in TCA using CLARIOstar® (BMG LABTECH) for the determination of total carbohydrate content ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ muscle wet weight). The pellet was resuspended in a sodium hydroxide solution (NaOH, 1 M) and mixed with Bradford reagent before reading the absorbance in triplicate at 595 nm against bovine serum albumin in 0,2 M NaOH for total protein concentration determination ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ muscle wet weight). The second aliquot was mixed with chloroform (CHCl_3), methanol (CH_3OH) and sulfuric acid (H_2SO_4) and centrifuged. H_2SO_4 was added to the bottom phase, and vanillin-phosphoric acid reagent was added before reading the absorbance in triplicate at 525 nm against tripalmitin in chloroform for total lipid concentration determination ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ muscle wet weight). Concentrations of carbohydrates, proteins and lipids were then transformed to energetic values using their enthalpy of combustion (17, 24 and 39.5 $\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively) and summed to obtain the available energy in muscle.

2.6. PHYSIOLOGICAL TRAIT: IMMUNITY

The Neutrophils/Lymphocytes ratio (N/L inflammatory immune ratio) was used as a marker of inflammatory immune response: the number of neutrophils increases and lymphocytes decreases under both stress and infection (reviewed in Davis et al., 2008). Blood smears were made immediately after blood collection and stained with May-Grunwald (Sigma-Aldrich, 1:2 v:v) and Giemsa (Sigma-Aldrich, 1:20 v:v) stains. 100 leucocytes (monocytes, neutrophils and lymphocytes) cells were then numbered after identification (see Table S2 for identification criteria) under an Axioskop microscope (Zeiss, Germany, x40 magnification) to assess the relative abundance of each cell type.

We then calculated a neutrophils/lymphocytes (N/L) ratio as a marker of inflammatory immune response.

2.7. PHYSIOLOGICAL TRAITS: LIVER LESIONS

Liver lesions were quantified by standard histological techniques following previous studies in fish (Cuevas et al., 2016; Jacquin et al., 2019; van Dyk et al., 2007). Briefly, the liver was dissected, immediately fixed in 4% formalin, and then paraffin-embedded. 4 µm thick sections were stained with hematoxylin, eosin saffron and observed under a Nikon microscope (Eclipse Ni) equipped with a digital camera (DS-Ri1).

Three main hepatic lesions were recorded in liver sections: the proliferation of bile ducts and fibrosis reflecting liver hyperplasia (Fig. 26B), melano-macrophage aggregates reflecting an over-inflammation of hepatocytes (Fig. 26C), lysis and nuclear alterations reflecting cell apoptosis (Fig. 26D) (see Wolf and Wheeler, 2018). For each hepatic lesion, a score between 0 and 3 was associated according to the severity of the lesion. A global histopathological score reflecting the severity of the lesions was then calculated as the mean value of the different scores following previous studies (Jacquin et al., 2019).

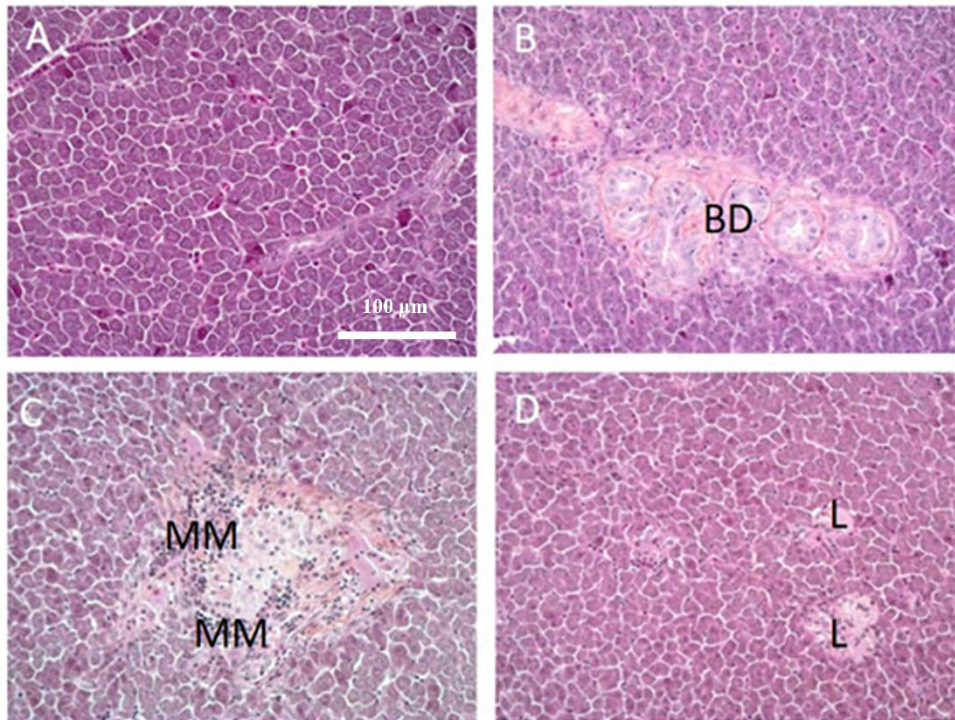


Figure 26. Histopathological observations of gudgeon livers. A. Normal liver parenchyma with bile ducts. B. Proliferating bile ducts with surrounding fibrosis (BD). C. Focal MelanoMacrophage hyperplasia reflecting an over-inflammation (MM). D. Focal hepatocellular necrosis with altered nuclear morphology and clear cytoplasm reflecting cell apoptosis (L). For each liver elementary lesion, a score between 0 and 3 was determined according to the severity of the lesion. A composite global histopathological score was then calculated as the mean value of the different scores as already published (Jacquin et al., 2019). The scale bar represents 100 μm .

2.8. INDIVIDUAL TRAITS: INFECTION INTENSITY

Gyrodactylus sp. infection intensity (i.e. the number of gyrodactilids per fish) was determined for each collected fish by thoroughly scanning pelvic and anal fins under a dissecting microscope (x10) (e.g. Jacquin et al., 2016).

2.9. INDIVIDUAL TRAIT: FISH GROWTH

We measured fish growth rate during their first year of life from scales using the back-calculation method reflecting a scale-proportional hypothesis described by Hile (1941):

$$\text{Growth rate} = -\left(\frac{a}{b}\right) + \langle L + \left(\frac{a}{b}\right) \rangle \times \left(\frac{R1}{Rtot}\right)$$

With a: the slope and b: the intercept of the linear regression between the size of the fish (L) and the radius of the whole scale (R_{tot}). R₁ corresponds to the length of the radius between the nucleus and the first annuli of the scale.

2.10. INDIVIDUAL TRAITS: CONDITION INDICES

Two condition indices were calculated to measure the general condition of fish. First, we calculated the Fulton Condition Factor (FCF, fish mass corrected by its cubic length) as an index of general body condition that reflects the general energy reserves of the fish (Smolders et al., 2002). Second, the hepatosomatic index (HSI, liver mass corrected by the body mass x100) was measured as a proxy of energy content in the liver (Chellappa et al., 1995).

2.11. INDIVIDUAL TRAIT: TELOMERES LENGTH

Telomere length is increasingly used as an integrative marker of stress exposure in wild animals (Angelier et al., 2018; Bize et al., 2009; Hausmann and Marchetto, 2010; Monaghan, 2014). Briefly, telomere length was determined by quantitative PCR using a BioRad CFX 96 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA) according to Cawthon (2002) with minor modifications. We measured telomere length in pelvic fins since this somatic tissue is the main target of gyrodactylids ectoparasites, which are known to feed on it (Bakke et al., 2007). Briefly, pelvic fin samples were digested with proteinase K and DNA was extracted from pelvic fins using the DNeasy Blood and tissue kit (Qiagen). The universal telomere primers designed by Cawthon (2002) were used for amplification of the telomere repeats. The control single-copy gene Recombination Activating Gene 1 (RAG1) was selected and amplified using specific primers (McLennan et al., 2019) designed for the gudgeon (RAG1-F : 5'-AGAGAGAGGGGGCTAGATGA-3' and RAG1-R: 5'-CCATGCTTCTCGCTGACATCAGCAGCAGCCTTCA-3'). qPCR was then performed using 2.5 ng of DNA per reaction. The universal telomere primers designed by Cawthon (2002) were used at a concentration of 800 nM, and primers RAG1-F/RAG1-R at 300 nM. All samples were randomly distributed across the PCR plates. Amplification efficiencies reached Mean ± SE: RAG1, 96.97 ± 0.78; TEL, 99.60 ± 2.05, and the average inter-plate variation of the Ct values was 1.63 for the telomere assay

and 0.74 for the RAG-1 assay, respectively. Telomere length (T/S ratio) was expressed relative to the internal single gene control (RAG1), according to Cawthon (2002).

2.12. STATISTICS

We used a three-step approach to test the effects of multiple stressors on fish health. First, we used preliminary linear mixed-effects models (LMM) to select the main stressor combinations affecting fish health, i.e., select the significant double interactions between contamination, temperature and mean parasite prevalence on each fish trait (i.e., bioaccumulation, available energy, N/L inflammatory immune ratio, liver lesions, telomere length, parasite intensity, condition indices, growth). All response variables were log-transformed and centered and scaled to meet Gaussian distribution. The sampling site was included as a random effect. Fish size (a proxy of fish age: correlation size/age: $R^2=0.76$, $p<0.001$) was added as a covariate because it can strongly affect physiological responses and bioaccumulation in fish. The physico-chemical gradient (first PCA axis) and sex were also added as covariates. Best models were selected by top-down model selection according to the Akaike Information Criterion (AIC) (see Table 6). When ΔAIC was below or equal to 2, we retained the simplest model. Before model fitting, we checked the collinearity of the predictors using the VIFs and a threshold value of 3 and found low collinearity between gradients (Zuur et al., 2010). When interactions between paired stressors were significant, we made posthoc analyses by splitting the dataset into two parts based on the median value of one of the predictors involved in the interaction and running LMM on both separate datasets.

Second, we investigated the direct and indirect effects of these selected stressor combinations on fish health using Structural Equation Modelling (SEM). SEM are probabilistic models that unite multiple predictors and response variables in a single complex causal network to test different scenarios involving causal relationships (Bollen, 1989; Lefcheck, 2016; Shipley, 2016). This property of SEM makes them more adequate to describe a system (i.e., direct and indirect effects) and predict causal relationships compared to conventional univariate analyses (Grace, 2008). We constructed SEM models from the R package PiecewiseSEM, which implements models with random effects (Lefcheck, 2016). We built SEM networks based a priori on existing literature and knowledge about the effects of stressors (i.e., predictors) on

each trait. We also included all significant double interactions between stressors retained in the first statistical LMM approach (see above). Best SEM models were then selected according to AIC. When ΔAIC was below or equal to 2, we applied the parsimony principle and retained the most straightforward model. Because models were qualitatively similar with or without sex and physicochemical variables, we present only the simplest models without these variables in the results. Because sample sizes vary for each trait, we conducted separate SEM models for each response trait at the individual level to obtain the most reliable estimate for each relationship. We thus present a different SEM model per response trait where each link is characterized by an unstandardized estimate, which reflects the expected (linear) change in the response with each unit change in the predictor and p-value. Sample sizes are smaller for liver samples (n=113) because we screened cellular lesions in the liver of a subset of individuals so that a separate SEM is presented on the liver (liver lesions). The accuracy of models was finally assessed using the goodness of fit, which is a test of directed separation available with the summary function of the R package PiecewiseSEM. Briefly, when a p-value > 0.05, the fit was considered as correct.

Third, we computed total, direct and indirect effects from the unstandardized estimates given by the SEM models on traits at the individual level. The indirect effects of each stressor on individual traits were computed through each physiological traits (i.e., indirect pathway in the full model) according to the Sobel product of coefficients approach (Sobel, 1982). To test the significance of the effects (direct and indirect), we used the error propagation method and computed the 95% confidence interval of indirect and total effects from the standard errors of each path given in the summary statistics of the considered SEM.

3. Results

3.1. EFFECTS OF STRESSORS ON PARASITE INTENSITY

First, preliminary LMM shows that parasite intensity in infected fish (i.e., number of parasites per infected fish, reflecting fish ability to limit parasite proliferation) was not linked to any stressor gradient, excepted the mean parasite prevalence (i.e., the proportion of infected fish in the study site) (Table 6).

SEM analyses (goodness of fit: 0.414, CFI = 18.652, df = 18, n = 82) were consistent and showed a higher number of parasites per infected fish in sites with higher mean parasite prevalence (estimate: 0.33, p = 0.023) (see Fig. S2). However, we did not find any significant relationship between immunity or any physiological traits and parasite intensity (Fig. S2). Thus, this effect was mainly direct and no underlying physiological mechanism could be detected in our study (Fig. 29A).

Table 6 Best final linear mixed models (preliminary step) explaining fish traits along stressor gradients according to the Akaike Information Criterion (AIC). When ΔAIC was below or equal to 2, we retained the simplest model. For the effect of the contamination gradient metal on metal bioaccumulation, the reported effect corresponds to the interaction between the contamination gradient and fish size.

Trait	Statistics	Variables					
		Contamination gradient	Temperature gradient	Parasite Prevalence	Size	Sex	Contamination : temperature gradient.
Bioaccumulation n = 197	Estimate ± SE	0.188 ± 0.077	-	-	-0.110 ± 0.093	-	-
	t	2.43	-	-	-1.18	-	-
	P	0.015	-	-	0.238	-	-
Available energy n = 197	Estimate ± SE	0.434 ± 0.117	-	-	-0.268 ± 0.073	-	-
	t	3.71	-	-	-3.69	-	-
	P	< 0.001	-	-	< 0.001	-	-
N/L immune ratio n = 161	Estimate ± SE	-	-	0.213 ± 0.072	0.174 ± 0.071	-0.350 ± 0.105	-
	t	-	-	2.97	2.43	-3.34	-
	P	-	-	0.003	0.015	< 0.001	-
Liver lesions n = 114	Estimate ± SE	-	-	-	0.248 ± 0.011	-	-
	t	-	-	-	2.35	-	-
	p	-	-	-	0.019	-	-
Infection intensity n = 82	Estimate ± SE	-	-	0.163 ± 0.061	-	-	-
	t	-	-	2.66	-	-	-
	P	-	-	0.008	-	-	-
Growth n = 197	Estimate ± SE	-0.252 ± 0.155	-0.116 ± 0.209	0.367 ± 0.159	0.372 ± 0.053	-	-0.770 ± 0.301
	t	-1.63	-0.56	2.31	7.08	-	-2.56
	P	0.103	0.578	0.021	< 0.001	-	0.010
Body condition n = 168	Estimate ± SE	-	0.270 ± 0.128	-	-	-0.405 ± 0.130	-
	t	-	2.10	-	-	-3.12	-
	P	-	0.035	-	-	0.002	-
Hepato-somatic Index n = 123	Estimate ± SE	-	-	-	-0.197 ± 0.122	-0.827 ± 0.180	-
	t	-	-	-	1.62	-4.59	-
	p	-	-	-	0.106	< 0.001	-
Telomere length n = 115	Estimate ± SE	-	-	-	-	-	-
	t	-	-	-	-	-	-
	p	-	-	-	-	-	-

3.2. EFFECTS OF STRESSORS ON GROWTH RATE

Preliminary LMM shows that growth was significantly affected by fish size, mean parasite prevalence and the interaction between temperature and contamination (Table 6). Indeed, fish growth was higher in locations with higher mean parasite prevalence (estimate: 0.41, $p = 0.03$, Fig. 27) but was not affected by parasite intensity (LMM: estimate = 0.04, $t=0.66$, $p=0.81$). In addition, posthoc analyses show that fish growth decreased significantly with contamination in warmer sites (LMM estimate: -0.41, $F = 4.5$, $p = 0.03$) but not in colder sites (LMM estimate: 3.54, $F = 1.4$, $p = 0.23$).

SEM analyses (goodness of fit: $p = 0.907$, CFI = 2.136, $df = 6$, $n = 197$) were consistent, we above described results but we did not detect any significant relationships between growth and any physiological traits (Fig. 27). Thus, we found only direct effects of stressors on growth related to the mean parasite prevalence (direct effect estimate and 95% CI: 0.38 [0.08; 0.69]) and to the contamination: temperature interaction (Fig. 29B).

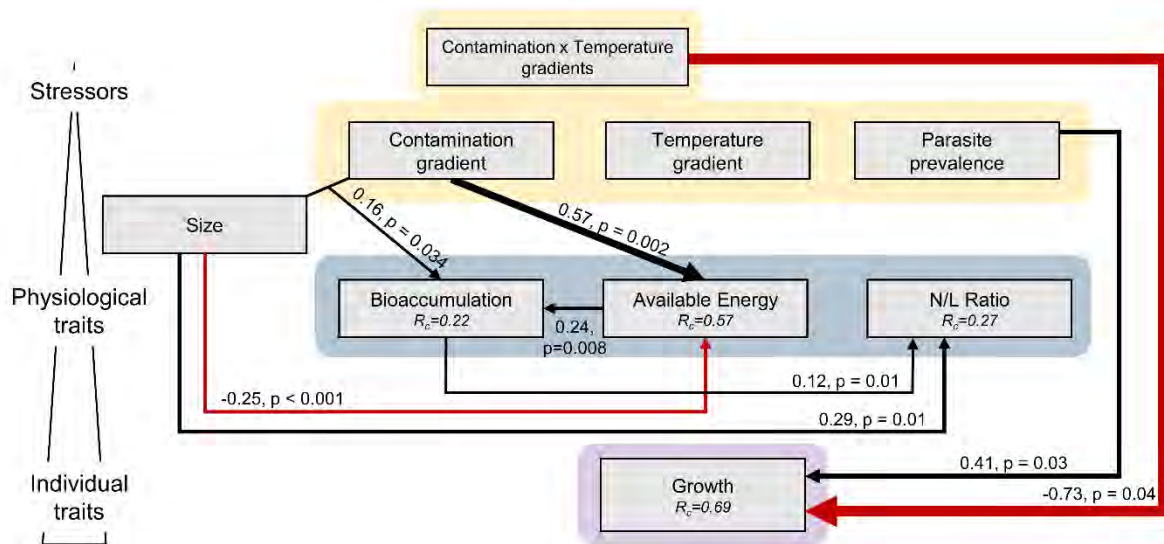


Figure 27. Structural Equation Models (SEM) testing the effects of stressor gradients on growth and underlying physiological traits (goodness of fit: $p = 0.907$, CFI = 2.136, $df = 6$, $n = 197$). Significant links are represented by solid arrows (red: relationship, black: positive relationship). Unstandardized coefficient and p -values are given alongside arrows. Line width represents the strength of the relationship (unstandardized coefficient).

However, here some physiological traits were directly affected by stressors, especially contamination (Fig. 27). First, fish from more contaminated sites (i.e., higher TU) had more available energy in their muscle (estimate: 0.57, $p = 0.002$, Fig. 27), and small fish had less available energy in their muscle (effect of size: estimate -0.25, $p < 0.001$, Fig. 27).

Second, the bioaccumulation of metals in muscle was positively affected by the interaction between fish size and the contamination gradient (estimate: 0.16, $p = 0.034$, Fig. 27): in more contaminated sites bigger fish bioaccumulated more metals in their muscle (LMM estimate: 0.17, $F = 8.9$, $p = 0.004$) compared to smaller fish (LMM estimate: -0.17, $F = 1.0$, $p = 0.332$). In addition, the amount of available energy had a positive effect on metal bioaccumulation (estimate: 0.24, $p = 0.008$, Fig. 27): fish having more available energy in their muscle also bioaccumulated more metals in their muscle. More particularly, by fitting the same SEM structure on lipid, protein and carbohydrate content independently, we found that lipid content explained this pattern (lipid: estimate: 0.27, $p = 0.004$, protein: estimate: -0.10, $p = 0.163$, carbohydrate: estimate: 0.07, $p = 0.446$). In other words, fish with more lipids in their muscles also bioaccumulated more metals.

Third, bigger fish (estimate: 0.29, $p = 0.01$, Fig. 27) and fish with more metals in their muscle (estimate: 0.12, $p = 0.01$, Fig. 27) had a higher N/L inflammatory immune ratio. More particularly, by fitting the same SEM structure on neutrophils and lymphocytes counts independently, we found that metal bioaccumulation significantly increased neutrophils counts (estimate: 0.73, $p = 0.01$) while it did not significantly affect lymphocytes count (estimate: -0.72, $p = 0.09$).

3.3. EFFECTS OF STRESSORS ON BODY CONDITION

Preliminary LMM shows that body condition was significantly affected by the temperature gradient only (Table 6). SEM analyses (goodness of fit: $p = 0.888$, CFI = 1.142, $df = 4$, $n = 218$) show that fish from warmer sites had a higher body condition (estimate: 0.37, $p = 0.04$). However, we did not find any significant relationships between body condition and any physiological traits. Thus, temperature had only direct and positive effects on fish body condition (Fig. 29C).

3.4. EFFECTS OF STRESSORS ON THE LIVER

Preliminary Mixed Models show that the Hepatosomatic Index (i.e., HSI, relative liver mass) was not affected by any stressor (Table 6). Since we screened cellular lesions in the liver of a subset of individuals, we represented a separate SEM on this subset of individuals to infer potential indirect relationships between stressors and the liver HSI through physiological changes. SEM analyses (goodness of fit: $p=0.690$, CFI = 14.592, $df = 18$, $n = 113$) show that the HSI was not significantly affected by stressor gradients nor by physiological traits (Fig. 28) neither directly nor indirectly (Fig. 29D).

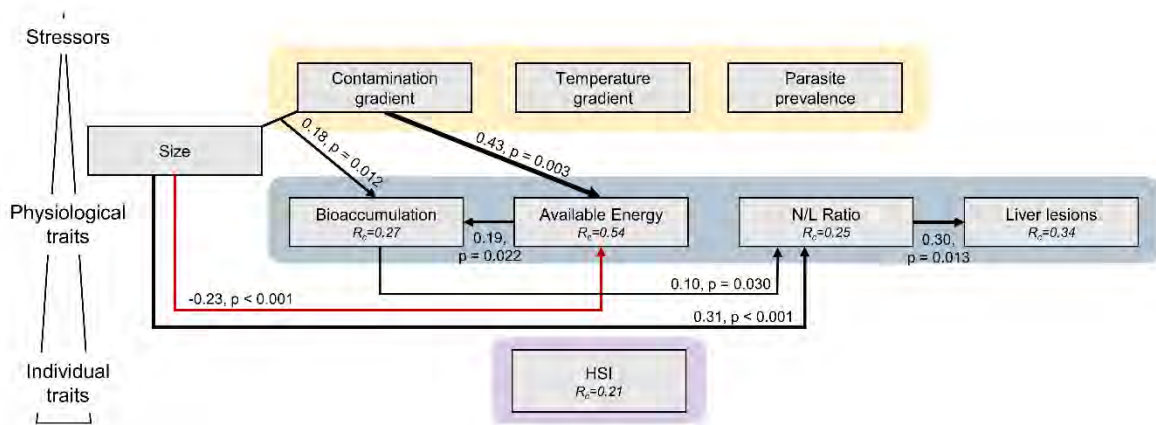


Figure 28. Structural Equation Models (SEM) testing the effects of stressors on the liver HepatoSomatic Index (HSI) and underlying physiological traits (goodness of fit: $p = 0.690$, CFI = 14.592, $df = 18$, $n = 113$). The sample size for this analysis is $n = 113$ because histopathological analyses on the liver were conducted on a subset of individuals. We thus present here a separate SEM model on liver variables. Significant links are represented by solid arrows (red: negative relationship, black: positive relationship). Unstandardized coefficient and p -values are given alongside arrows. Line width represents the strength of the relationship (unstandardized coefficient).

In contrast, we found that the histopathological index (i.e., index of cellular lesions in the liver) was positively linked to the N/L inflammatory immune ratio (estimate: 0.30, $p = 0.013$, Fig. 28). We also fitted the same SEM statistical models on each lesion separately, i.e., proliferating bile ducts with surrounding fibrosis (BD on Fig. 26), MelanoMacrophage hyperplasia (MM on Fig. 26), and cell apoptosis (L on Fig. 26). We found that biliary alterations (i.e., proliferating bile ducts) and surrounding hepatic fibrosis mostly contributed to the observed pattern (BD: estimate: 0.26, $p = 0.026$, MM: estimate: 0.02, $p = 0.886$, L: estimate: 0.02, $p = 0.886$). In other words, fish from more contaminated sites had higher metal bioaccumulation in their muscle (estimate: 0.18, $p = 0.012$, Fig. 28), higher N/L inflammatory immune ratio (estimate:

0.10, $p = 0.030$, Fig. 28), and more severe cellular lesions in their liver, especially a proliferation of bile duct and fibrosis (Fig. 28).

3.5. EFFECTS OF STRESSORS ON TELOMERE LENGTH

LMM (Table 6) and SEM analyses show that telomeres length was not affected, either directly or indirectly, by any stressor gradient (goodness of fit: $p = 0.525$, CFI = 11.05, $df = 12$, $n = 107$) (Fig. 29E).

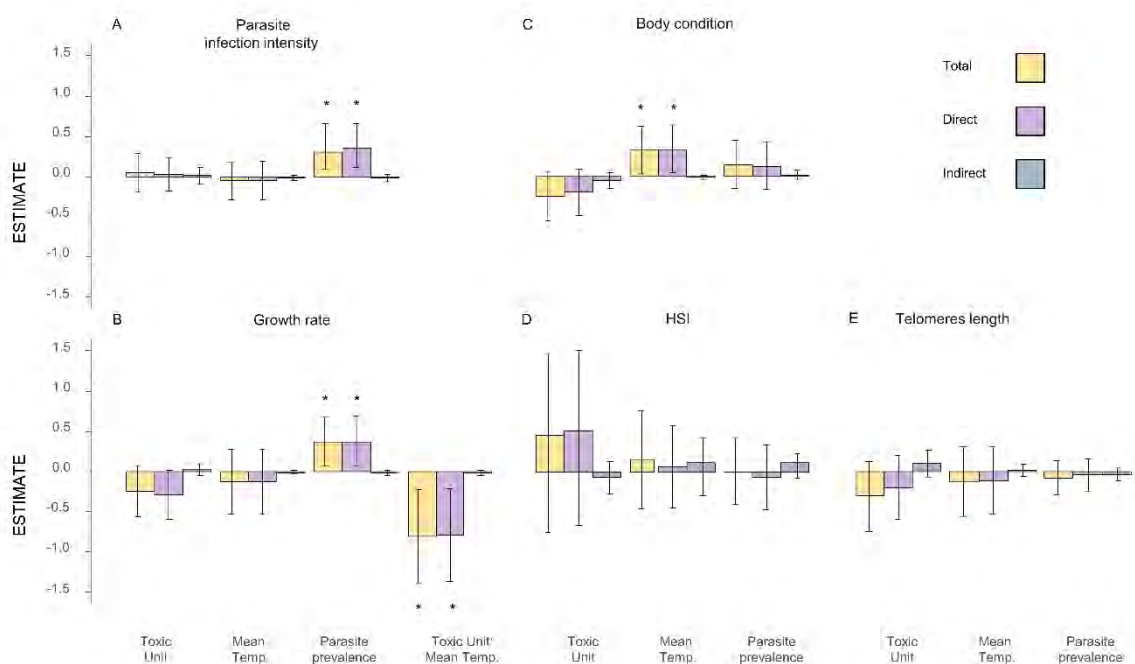


Figure 29. Total, direct and indirect effects of stressors on, infection intensity ($n = 82$, A), growth rate ($n = 197$, B), body condition index ($n = 218$, C), HSI ($n = 113$, D) and telomere length ($n = 107$, E). Total effects are represented by a yellow bar (sum of direct and indirect effects). Direct effects are represented by a pink bar (estimate of the relationship between the stressor and measured trait at the individual level). Indirect effects through physiological traits are represented by a blue bar (sum of the products of path coefficients along all indirect physiological pathways). Error bars correspond to the 95% confidence interval computed by the standard error propagation method. Stars indicate effects that are significantly different from zero. Here, we did not find any indirect effects of stressors on individual levels across fish physiology. Indeed, when stressors had significant (total) effects on traits at the individual level, it was exclusively due to direct effects.

4. Discussion

Different environmental stressors affected different traits related to fish physiology and health. First, parasitism risk had limited deleterious effects and temperature had positive

effects on fish body condition, while trace metal contamination appeared to trigger a cascade of physiological changes, which seems to contribute to liver lesions. In addition, the combination of contamination and elevated temperature reduced fish growth. These results highlight the importance of studying the effects of multiple stressors across biological levels.

4.1. EFFECTS OF PARASITE GRADIENT

The mean parasite prevalence (i.e., the proportion of infected fish in each site) had limited effects on fish health. In addition, contamination and temperature gradients did not affect mean parasite prevalence nor parasite intensity, contrary to previous studies (Marcogliese, 2016; Poulin, 1992; Sures et al., 2017). This suggests that the ranges of our perturbation gradients were limited and did not affect *Gyrodactylus* parasites or that we could not detect any effect with our sampling design, but further studies are needed to confirm these hypotheses.

We found that infected fish living in sites with a higher mean prevalence of *Gyrodactylus* (i.e., sites with a higher infection risk) also had a higher parasite intensity (i.e., a higher number of parasites per infected individual) (Poulin and Guégan, 2000). In other words, The higher the proportion of infected hosts, the higher the parasite intensity (i.e., the number of parasites per infected host) suggesting either that these sites harbor more virulent parasites and/or that fish sampled here have a weaker immune system, and thus a lower ability to limit the proliferation of parasites. However, we found no relationship between immune or physiological parameters and parasite intensity, so that the underlying physiological mechanisms remain unknown. Several explanations could explain this result. First, parasite intensity was relatively low (i.e., 0 to 14 parasites per fish) compared to other studies (up to 100 parasites per fish, Van Oosterhout et al., 2006), which could explain the absence of link with physiological changes. Alternatively, parasite intensity could vary across seasons, and/or heavily infected fish could have been counter-selected in the wild and not sampled in this study (Cable and van Oosterhout, 2007; van Oosterhout et al., 2007). Also, in our study, the mean parasite prevalence (i.e., risk of being infected) was assessed through the mean parasite prevalence per site (i.e., percentage of infected fish in each site) because *Gyrodactylus* are socially transmitted parasites. However, some other unmeasured parameters such as parasite density in the water column/sediment, fish behavior, habitat

structure might also affect infection risk, so that further studies might be needed to assess more precisely parasitism risk (McCallum et al., 2017).

Interestingly, we found that fish living in sites with a higher mean parasite prevalence had a faster growth during the first year of their life. One potential explanation is that habitats that are favorable for parasites are also beneficial for fish growth, for instance linked to higher food availability (Atalabi et al., 2018). Alternatively, high mean parasite prevalence (i.e., higher risk of being infected) could select for faster life-history strategies and a faster growth rate to cope with stressful environments (Kortet et al., 2010), but further longitudinal studies across seasons and life stages are now needed to test this hypothesis.

4.2. EFFECTS OF TEMPERATURE GRADIENT

The temperature gradient alone did not negatively affect any physiological nor individual trait in our study. On the contrary, fish living in warmer sites had a higher body condition. This might be explained by the moderate range of the temperature gradient found in our study sites (min/max mean summer temperature: 14°C/21°C) that was within the optimum temperature of gudgeon (i.e., critical limit temperature: 27°C, Tissot and Souchon, 2010). In addition, increased mean water temperature could enhance secondary production (Benke, 1998; Reynolds and Benke, 2005), which could in turn increase food availability for gudgeon. But, temperature may also sharply rise above the optimal temperature, for instance during summer heatwaves and could adversely affect fish health through physiological changes (Kassahn et al., 2009; Pörtner, 2010; Pörtner and Farrell, 2008). However, we could not test this hypothesis in our study because the resolution of the temperature records was too low to assess the effects of rapid temperature changes on fish physiology and health and further field studies using temperature dataloggers are now necessary.

4.3. EFFECTS OF TOXIC GRADIENT

The levels of water metal contamination found in our study sites were above the Annual Average-Quality Standard defined by the European Parliament (Directive n°2013/39/UE) for the preservation of aquatic habitats and wildlife (see Table 2 from Chapter 2: Materiel & Methodes). Accordingly, several effects were observed at the physiological level.

First, metals were significantly bioaccumulated in fish muscle in a size-dependent manner (i.e., age-dependent) (Bird et al., 2008; Farkas et al., 2003; Pyle et al., 2005). Muscle generally bioaccumulates less metals than other organs such as the liver and spleen (Bervoets et al., 2009; Cretì et al., 2010; Rajotte and Couture, 2002). This suggests that along the metal contamination gradient, fish accumulated a fairly high amount of metals in all their organs. Besides, water contamination also increased the available energy in muscle, especially lipids, which could be due to pollution-induced disturbances in lipid metabolism (Bano and Hasan, 1989; Melvin et al., 2019) and/or due to increased food uptake in contaminated sites (Yang et al., 2013). Interestingly, in our study, this pollution-induced increase in available energy increased in turn the bioaccumulation of metals in muscle (Schäfer et al., 2015). This suggests that contamination by metals could result in positive feedback loops amplifying the adverse effects of contamination on fish physiology. However, this hypothesis remains to be empirically tested in controlled laboratory conditions.

In addition, SEM models showed that metal bioaccumulation was related to the increased N/L inflammatory immune ratio, partly due to increased neutrophils number, which suggests that trace metals triggered a significant over-inflammation (Dethloff et al., 1999; Don Xavier et al., 2019), which in turn may increase liver cellular lesions. Indeed, histopathological analyses reveal an increase of biliary alteration and hepatic fibrosis, which are likely to reflect chronic cytotoxicity, over-inflammation and more globally liver alteration (Lukin et al., 2011; Wolf and Wolfe, 2005). This suggests that metal contamination has deleterious consequences for cell integrity and liver function through both direct toxicity and over-inflammation (Jaeschke et al., 2002; Rikans and Yamano, 2000; Xu et al., 2018). These results raise concerns about the long term effects of realistic levels of pollution on fish health and population persistence. However, we did not find any effects of these physiological changes on individual traits such as growth or body condition contrary to previous studies (Bervoets and Blust, 2003; MacKenzie et al., 1995; Pietroock and Marcogliese, 2003; Pyle et al., 2005), maybe because fish with lower fitness were counter-selected in the wild and not sampled in our field study. Further longitudinal studies across time and life stages are now needed to better estimate the effects of metal contamination on fish fitness.

4.4. MULTIPLE STRESSOR EFFECTS

Interestingly, we found an interactive effect of temperature and contamination gradients on fish growth. Contamination decreased fish growth, but only in warmer sites. This suggests that elevated temperature aggravates the effects of pollution, as shown in previous studies (Noyes et al. 2009, Gandar et al. 2017, Jacquin et al. 2019). Here, growth was affected during the first year of life of gudgeon, but no other deleterious effects were observed, which suggests that multiple stressors have more severe consequences during early life stage, a critical period of fish development. Stressful conditions are known to inhibit growth in fish, which is partly due to the inhibition of growth hormones (Barton, 2002; McCormick et al., 1998). In addition, high temperature increases metabolism and accelerates contamination uptake (Noyes et al., 2009; Sokolova and Lannig, 2008), which can increase the costs of detoxification and defenses and decrease the energy invested in somatic growth (Petitjean et al., 2019; Sokolova et al., 2012; Sokolova, 2013). However, in this study, the interaction between contamination and temperature gradients had no effects on physiological traits nor energy reserves, so that the underlying physiological mechanisms remain to be determined.

We found no effect of stressors on telomere length, a proxy of whole-life stress exposure. The literature reports contrasting results on the relationship between telomere shortening and stress exposure in wild animals, depending on the stressor, species, sex, and tissue collected (Angelier et al., 2018; Chatelain et al., 2020; Louzon et al., 2019). In our study, we only measured telomere length in somatic tissues (i.e., pelvic fin). Thus further studies in other organs such as the liver and immune organs (Giraudeau et al., 2019) are now necessary to better understand the links between stress exposure and telomere shortening in wild animals.

5. Conclusion

To conclude, this study shows that parasitism and temperature alone had limited deleterious effects on fish health in human-altered rivers. In contrast, trace metal

contamination increased metal bioaccumulation and lipid storage in muscle, likely through a positive feedback loop, which led to cellular damage in the liver, although few effects were detected at the individual level. In addition, trace metal contamination decreased fish growth when combined with elevated temperature, which suggests that multiple stressors could affect fish life-history traits, although further studies are needed to assess the consequences of multiple stressors on fish fitness and, ultimately on population dynamics (e.g., structure and abundance). In addition, further experimental studies under controlled conditions and/or in semi-natural setting using cross-transplantations would also be useful to test the underlying mechanisms and potential local adaptation of populations to environmental stressors. With this study, we hope to encourage future studies to take into account multiple stressors in environmentally realistic conditions to better understand and anticipate the effects of anthropogenic stressors on fish populations.

Compliance with ethical standards

Fish sampling was conducted under the authorization of local authorities (N° 2016-995, 2016-15av, 2016-21av, PE-2016-014, E-2016-130) and in compliance with French and European legislation (European directive 2010/63/UE).

Acknowledgements

We are grateful to Charlotte Veyssière, Loïc Tudesque, Hélène Lazareff, Margaux Meurant, Océane Morisseau, Hortense Hourmat, Myriam Cousseau, Gaël Leroux, David Baquet, Thibaut Rota, Lisa Fourtune, Gaël Grenouillet, Simon Blanchet and Géraldine Loot for assistance at various stages of this study. We also thank Christel Lefrançois, Patrice Couture and the two anonymous reviewers whose comments helped improve the manuscript. This work was financially supported by the water agency Adour-Garonne (PHYPAT project), the french national programme CNRS EC2CO-Ecodyn and the CPER ECONAT. We thank the GET platform from the Observatoire Midi Pyrenées for trace metals analyses. QP was supported by doctoral grants of the

French Ministry of Higher Education and Research. The EDB laboratory is part of the French Laboratory of Excellence “TULIP” (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest

References

Angelier, F., Costantini, D., Blévin, P., Chastel, O., 2018. Do glucocorticoids mediate the link between environmental conditions and telomere dynamics in wild vertebrates? A review. *Gen. Comp. Endocrinol., The Proceedings of the 11th International Symposium on Avian Endocrinology* 256, 99–111. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.007>

Atalabi, T.E., Awharitoma, A.O., Akinluyi, F.O., 2018. Prevalence, intensity, and exposed variables of infection with *Acanthocephala* parasites of the gastrointestinal tract of *Coptodon zillii* (Gervais, 1848) [Perciformes: Cichlidae] in Zobe Dam, Dutsin-Ma Local Government Area, Katsina State, Nigeria. *J. Basic Appl. Zool.* 79. <https://doi.org/10.1186/s41936-018-0042-6>

Bakke, T.A., Cable, J., Harris, P.D., 2007. The Biology of Gyrodactylid Monogeneans: The “Russian-Doll Killers,” in: *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp. 161–460. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64003-7)

Bano, Y., Hasan, M., 1989. Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis*. *J. Environ. Sci. Health Part B* 24, 145–166. <https://doi.org/10.1080/03601238909372641>

Barber, I., Berkhout, B.W., Ismail, Z., 2016. Thermal Change and the Dynamics of Multi-Host Parasite Life Cycles in Aquatic Ecosystems. *Integr. Comp. Biol.* 56, 561–572. <https://doi.org/10.1093/icb/icw025>

Barton, B.A., 2002. Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>

Benke, A.C., 1998. Production Dynamics of Riverine Chironomids: Extremely High Biomass Turnover Rates of Primary Consumers. *Ecology* 79, 899. <https://doi.org/10.2307/176588>

Bervoets, L., Blust, R., 2003. Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environ. Pollut.* 126, 9–19. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00173-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00173-8)

- Bervoets, L., Van Campenhout, K., Reynders, H., Knapen, D., Covaci, A., Blust, R., 2009. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 720–728. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.10.008>
- Bird, D.J., Rotchell, J.M., Hesp, S.A., Newton, L.C., Hall, N.G., Potter, I.C., 2008. To what extent are hepatic concentrations of heavy metals in *Anguilla anguilla* at a site in a contaminated estuary related to body size and age and reflected in the metallothionein concentrations? *Environ. Pollut.* 151, 641–651. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.03.018>
- Bize, P., Criscuolo, F., Metcalfe, N.B., Nasir, L., Monaghan, P., 2009. Telomere dynamics rather than age predict life expectancy in the wild. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 276, 1679–1683. <https://doi.org/10.1098/rspb.2008.1817>
- Blackburn, E.H., 2005. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.* 579, 859–862. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.036>
- Blanchet, S., Méjean, L., Bourque, J.-F., Lek, S., Thomas, F., Marcogliese, D.J., Dodson, J.J., Loot, G., 2009. Why Do parasitized Hosts Look Different? Resolving the “Chicken-Egg” Dilemma. *Oecologia* 160, 37–47. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1272-y>
- Blévin, P., Angelier, F., Tartu, S., Ruault, S., Bustamante, P., Herzke, D., Moe, B., Bech, C., Gabrielsen, G.W., Bustnes, J.O., Chastel, O., 2016. Exposure to oxychlorane is associated with shorter telomeres in arctic breeding kittiwakes. *Sci. Total Environ.* 563–564, 125–130. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.04.096>
- Bollen, K.A., 1989. Structural equations with latent variables, Wiley series in probability and mathematical statistics Applied probability and statistics. Wiley, New York, NY Chichester Brisbane Toronto Singapore.
- Britton, J.R., Pegg, J., Williams, C.F., 2011. Pathological and Ecological Host Consequences of Infection by an Introduced Fish Parasite. *PLoS ONE* 6, e26365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026365>
- Buchmann, K., Lindenstrøm, T., 2002. Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int. J. Parasitol.* 32, 309–319. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00332-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00332-0)
- Cable, J., van Oosterhout, C., 2007. The impact of parasites on the life history evolution of guppies (*Poecilia reticulata*): The effects of host size on parasite virulence. *Int. J. Parasitol.* 37, 1449–1458. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.013>
- Calisi, R.M., Bentley, G.E., 2009. Lab and field experiments: Are they the same animal? *Horm. Behav.* 56, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.010>
- Cawthon, R.M., 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 30, e47. <https://doi.org/10.1093/nar/30.10.e47>

Chatelain, M., Drobnik, S.M., Szulkin, M., 2020. The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: a meta-analysis. *Ecol. Lett.* 23, 381–398. <https://doi.org/10.1111/ele.13426>

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

Christensen, M.R., Graham, M.D., Vinebrooke, R.D., Findlay, D.L., Paterson, M.J., Turner, M.A., 2006. Multiple anthropogenic stressors cause ecological surprises in boreal lakes. *Glob. Change Biol.* 12, 2316–2322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01257.x>

Côte, J., Morriseau, O., Pilisi, C., Veyssi re, C., Perrault, A., Jezequel, C., Loot, G., Blanchet, S., Jean, S., Jacquin, L., In revision. Urbanization and eutrophication as drivers of morphological and physiological divergence among riverine fish populations. *Freshw. Biol.*

Creti, P., Trinchella, F., Scudiero, R., 2010. Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environ. Monit. Assess.* 165, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0948-z>

Cuevas, N., Zorita, I., Franco, J., Costa, P.M., Larreta, J., 2016. Multi-organ histopathology in gobies for estuarine environmental risk assessment: A case study in the Ibaizabal estuary (SE Bay of Biscay). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 179, 145–154. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.11.023>

Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacios, S., Vernet, G., 2004. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 68, 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.003>

Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 43–55. <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>

Debes, P.V., Visse, M., Panda, B., Ilmonen, P., Vasemägi, A., 2016. Is telomere length a molecular marker of past thermal stress in wild fish? *Mol. Ecol.* 25, 5412–5424. <https://doi.org/10.1111/mec.13856>

Dethloff, G.M., Schlenk, D., Hamm, J.T., Bailey, H.C., 1999. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 253–264. <https://doi.org/10.1006/eesa.1998.1757>

- Dittmar, J., Janssen, H., Kuske, A., Kurtz, J., Scharsack, J.P., 2014. Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *J. Anim. Ecol.* 83, 744–757. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12175>
- Don Xavier, N.D., Bijoy Nandan, S., Jayachandran, P.R., Anu, P.R., Midhun, A.M., Mohan, D., 2019. Chronic effects of copper and zinc on the fish, *Etroplus suratensis* (Bloch, 1790) by continuous flow through (CFT) bioassay. *Mar. Environ. Res.* 143, 141–157. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.11.002>
- Farkas, A., Salánki, J., Specziár, A., 2003. Age-and size-specific patterns of heavy metals in the organs of freshwater fish *Abramis brama* L. populating a low-contaminated site. *Water Res.* 37, 959–964. [https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(02\)00447-5](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(02)00447-5)
- Fourtune, L., Paz-Vinas, I., Loot, G., Prunier, J.G., Blanchet, S., 2016. Lessons from the fish: a multi-species analysis reveals common processes underlying similar species-genetic diversity correlations. *Freshw. Biol.* 61, 1830–1845. <https://doi.org/10.1111/fwb.12826>
- Franke, F., Armitage, S.A.O., Kutzer, M.A.M., Kurtz, J., Scharsack, J.P., 2017. Environmental temperature variation influences fitness trade-offs and tolerance in a fish-tapeworm association. *Parasit. Vectors* 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2192-7>
- Gandar, A., 2015. Réponse aux stress multiples chez les poissons: effets croisés de la température et des cocktails de pesticides (PhD Thesis).
- Gandar, A., Jean, S., Canal, J., Marty-Gasset, N., Gilbert, F., Laffaille, P., 2016. Multistress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3184–3194. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5147-6>
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., Gress, L., Mormède, P., Tapie, N., Budzinski, H., Jean, S., 2017a. Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 188, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.089>
- Gandar, A., Laffaille, P., Marty-Gasset, N., Viala, D., Molette, C., Jean, S., 2017b. Proteome response of fish under multiple stress exposure: Effects of pesticide mixtures and temperature increase. *Aquat. Toxicol.* 184, 61–77. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.01.004>
- Gimbo, R.Y., Fávero, G.C., Franco Montoya, L.N., Urbinati, E.C., 2015. Energy deficit does not affect immune responses of experimentally infected pacu (*Piaractus mesopotamicus*). *Fish Shellfish Immunol.* 43, 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2015.01.005>
- Giraudeau, M., Heidinger, B., Bonneaud, C., Sepp, T., 2019. Telomere shortening as a mechanism of long-term cost of infectious diseases in natural animal populations. *Biol. Lett.* 15, 20190190. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2019.0190>

- Gotanda, K.M., Delaire, L.C., Raeymaekers, J.A.M., Pérez-Jvostov, F., Dargent, F., Bentzen, P., Scott, M.E., Fussmann, G.F., Hendry, A.P., 2013. Adding parasites to the guppy-predation story: insights from field surveys. *Oecologia* 172, 155–166. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2485-7>
- Grace, J.B., 2008. Structural Equation Modeling for Observational Studies. *J. Wildl. Manag.* 72, 14–22. <https://doi.org/10.2193/2007-307>
- Guinot, D., Ureña, R., Pastor, A., Varó, I., Ramo, J. del, Torreblanca, A., 2012. Long-term effect of temperature on bioaccumulation of dietary metals and metallothionein induction in *Sparus aurata*. *Chemosphere* 87, 1215–1221. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.01.020>
- Hausmann, M.F., Marchetto, N.M., 2010. Telomeres: Linking stress and survival, ecology and evolution. *Curr. Zool.* 56. <https://doi.org/10.1093/czoolo/56.6.714>
- Hile, R., 1941. Age and growth of the rock bass, *Ambloplites rupestris* (Rafinesque), in Nebish Lake, Wisconsin. *Trans. Wis. Acad. Sci. Arts Lett.* 33, 189337.
- Jacquin, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Hénaff, M.L., Jong, L.D., Paris-Palacios, S., Laffaille, P., Jean, S., 2019. High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.085>
- Jacquin, L., Reader, S.M., Boniface, A., Mateluna, J., Patalas, I., Pérez-Jvostov, F., Hendry, A.P., 2016. Parallel and nonparallel behavioural evolution in response to parasitism and predation in Trinidadian guppies. *J. Evol. Biol.* 29, 1406–1422. <https://doi.org/10.1111/jeb.12880>
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65, 166–176. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.166>
- Johnson, M.W., Dick, T.A., 2001. Parasite effects on the survival, growth, and reproductive potential of yellow perch (*Perca flavescens* Mitchell) in Canadian Shield lakes. *Can. J. Zool.* 79, 1980–1992. <https://doi.org/10.1139/cjz-79-11-1980>
- Jokela, J., Mutikainen, P., 1995. Phenotypic plasticity and priority rules for energy allocation in a freshwater clam: a field experiment. *Oecologia* 104, 122–132. <https://doi.org/10.1007/BF00365570>
- Kassahn, K.S., Crozier, R.H., Pörtner, H.O., Caley, M.J., 2009. Animal performance and stress: responses and tolerance limits at different levels of biological organisation. *Biol. Rev.* 84, 277–292. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2008.00073.x>
- Keith, P., Persat, H., Feunteun, E., Allardi, J., 2011. Les Poissons d'eau douce de France., Biotope. ed, Inventaires & biodiversité. Paris, France.
- Killen, S.S., Marras, S., Metcalfe, N.B., McKenzie, D.J., Domenici, P., 2013. Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour. *Trends Ecol. Evol.* 28, 651–658. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.05.005>

- Knapen, D., Bervoets, L., Verheyen, E., Blust, R., 2004. Resistance to water pollution in natural gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. *Aquat. Toxicol.* 67, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.12.001>
- Kortet, R., Hedrick, A.V., Vainikka, A., 2010. Parasitism, predation and the evolution of animal personalities: Personalities and parasitism. *Ecol. Lett.* 13, 1449–1458. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01536.x>
- Kuzmanović, M., López-Doval, J.C., De Castro-Català, N., Guasch, H., Petrović, M., Muñoz, I., Ginebreda, A., Barceló, D., 2016. Ecotoxicological risk assessment of chemical pollution in four Iberian river basins and its relationship with the aquatic macroinvertebrate community status. *Sci. Total Environ.* 540, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.112>
- Lange, K., Bruder, A., Matthaei, C.D., Brodersen, J., Paterson, R.A., 2018. Multiple-stressor effects on freshwater fish: Importance of taxonomy and life stage. *Fish Fish.* 19, 974–983. <https://doi.org/10.1111/faf.12305>
- Lefcheck, J.S., 2016. PIECEWISESEM : Piecewise structural equation modelling in R for ecology, evolution, and systematics. *Methods Ecol. Evol.* 7, 573–579. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12512>
- Loot, G., Reyjol, Y., Poulet, N., Simkova, A., Blanchet, S., Lek, S., 2007. Effects of small weirs on fish parasite communities. *Parasitol. Res.* 101, 1265–1276. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0632-6>
- López, S.L., 1998. Acquired resistance affects male sexual display and female choice in guppies. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 265, 717–723. <https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0352>
- Louzon, M., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Pauget, B., de Vaufléury, A., 2019. Telomere dynamic in humans and animals: Review and perspectives in environmental toxicology. *Environ. Int.* 131, 105025. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105025>
- Lukin, A., Sharova, J., Belicheva, L., Camus, L., 2011. Assessment of fish health status in the Pechora River: Effects of contamination. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 355–365. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.022>
- MacKenzie, K., Williams, H.H., Williams, B., McVicar, A.H., Siddall, R., 1995. Parasites as Indicators of Water Quality and the Potential Use of Helminth Transmission in Marine Pollution Studies, in: *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp. 85–144. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60070-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60070-6)
- Marcogliese, D.J., 2016. The Distribution and Abundance of Parasites in Aquatic Ecosystems in a Changing Climate: More than Just Temperature. *Integr. Comp. Biol.* 56, 611–619. <https://doi.org/10.1093/icb/icw036>
- Marteinson, S.C., Marcogliese, D.J., Verreault, J., 2017. Multiple stressors including contaminant exposure and parasite infection predict spleen mass and energy expenditure in breeding ring-billed gulls. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 200, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2017.06.005>

Martin, L.B., Scheuerlein, A., Wikelski, M., 2003. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 153–158. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2185>

McCallum, H., Fenton, A., Hudson, P.J., Lee, B., Levick, B., Norman, R., Perkins, S.E., Viney, M., Wilson, A.J., Lello, J., 2017. Breaking beta: deconstructing the parasite transmission function. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0084>

McCormick, S.D., Shrimpton, J.M., Carey, J.B., O’Dea, M.F., Sloan, K.E., Moriyama, S., Björnsson, B.T., 1998. Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol. *Aquaculture* 168, 221–235. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00351-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00351-2)

McLennan, D., Recknagel, H., Elmer, K.R., Monaghan, P., 2019. Distinct telomere differences within a reproductively bimodal common lizard population. *Funct. Ecol.* 33, 1917–1927. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13408>

Melvin, S.D., Lanctôt, C.M., Doriean, N.J.C., Bennett, W.W., Carroll, A.R., 2019. NMR-based lipidomics of fish from a metal(loid) contaminated wetland show differences consistent with effects on cellular membranes and energy storage. *Sci. Total Environ.* 654, 284–291. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.113>

Monaghan, P., 2014. Organismal stress, telomeres and life histories. *J. Exp. Biol.* 217, 57–66. <https://doi.org/10.1242/jeb.090043>

Monaghan, P., 2010. Telomeres and life histories: the long and the short of it. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1206, 130–142. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05705.x>

Monaghan, P., Hausmann, M.F., 2006. Do telomere dynamics link lifestyle and lifespan? *Trends Ecol. Evol.* 21, 47–53. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.11.007>

Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L.A., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971–986. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2009.02.006>

Patterson, J.E.H., Ruckstuhl, K.E., 2013. Parasite infection and host group size: a meta-analytical review. *Parasitology* 140, 803–813. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002259>

Paul, N., Chakraborty, S., Sengupta, M., 2014. Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*. *Aquat. Toxicol.* 152, 105–112. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.017>

Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P., Jacquin, L., 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Sci. Total Environ.* 684, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>

Pietroock, M., Marcogliese, D.J., 2003. Free-living endohelminth stages: at the mercy of environmental conditions. *Trends Parasitol.* 19, 293–299. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00117-X](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00117-X)

- Pörtner, H.-O., 2010. Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881–893. <https://doi.org/10.1242/jeb.037523>
- Pörtner, H.O., Farrell, A.P., 2008. Physiology and Climate Change. *Science* 322, 690–692. <https://doi.org/10.1126/science.1163156>
- Poulin, R., 2006. Variation in infection parameters among populations within parasite species: Intrinsic properties versus local factors. *Int. J. Parasitol.* 36, 877–885. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.02.021>
- Poulin, R., 1992. Toxic pollution and parasitism in freshwater fish. *Parasitol. Today* 8, 58–61. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90090-O](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90090-O)
- Poulin, R., Guégan, J.-F., 2000. Nestedness, anti-nestedness, and the relationship between prevalence and intensity in ectoparasite assemblages of marine fish: a spatial model of species coexistence. *Int. J. Parasitol.* 30, 1147–1152. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(00\)00102-8](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(00)00102-8)
- Pyle, G.G., Rajotte, J.W., Couture, P., 2005. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 287–312. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.09.003>
- Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1296–1304. <https://doi.org/10.1139/f02-095>
- Reid, A.J., Carlson, A.K., Creed, I.F., Eliason, E.J., Gell, P.A., Johnson, P.T.J., Kidd, K.A., MacCormack, T.J., Olden, J.D., Ormerod, S.J., Smol, J.P., Taylor, W.W., Tockner, K., Vermaire, J.C., Dudgeon, D., Cooke, S.J., 2019. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol. Rev.* 94, 849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>
- Reynolds, S.K., Benke, A.C., 2005. Temperature-dependent growth rates of larval midges (Diptera: Chironomidae) from a southeastern U.S. stream. *Hydrobiologia* 544, 69–75. <https://doi.org/10.1007/s10750-004-8334-x>
- Richards, E.L., Oosterhout, C. van, Cable, J., 2010. Sex-Specific Differences in Shoaling Affect Parasite Transmission in Guppies. *PLOS ONE* 5, e13285. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013285>
- Rikans, L.E., Yamano, T., 2000. Mechanisms of cadmium-mediated acute hepatotoxicity. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 14, 110–117. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1099-0461\(2000\)14:2<110::aid-jbt7>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1099-0461(2000)14:2<110::aid-jbt7>3.0.co;2-j)
- Schäfer, S., Buchmeier, G., Claus, E., Duyster, L., Heininger, P., Körner, A., Mayer, P., Paschke, A., Rauert, C., Reifferscheid, G., Rüdell, H., Schlechtriem, C., Schröter-Kermani, C., Schudoma, D., Smedes, F., Steffen, D., Vietoris, F., 2015. Bioaccumulation in aquatic systems: methodological approaches, monitoring and assessment. *Environ. Sci. Eur.* 27. <https://doi.org/10.1186/s12302-014-0036-z>

Schinegger, R., Palt, M., Segurado, P., Schmutz, S., 2016. Untangling the effects of multiple human stressors and their impacts on fish assemblages in European running waters. *Sci. Total Environ.* 573, 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.143>

Segner, H., Schmitt-Jansen, M., Sabater, S., 2014. Assessing the Impact of Multiple Stressors on Aquatic Biota: The Receptor's Side Matters. *Environ. Sci. Technol.* 48, 7690–7696. <https://doi.org/10.1021/es405082t>

Sheath, D.J., Andreou, D., Britton, J.R., 2016. Interactions of warming and exposure affect susceptibility to parasite infection in a temperate fish species. *Parasitology* 143, 1340–1346. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000846>

Shinn, C., Blanchet, S., Loot, G., Lek, S., Grenouillet, G., 2015. Phenotypic variation as an indicator of pesticide stress in gudgeon: Accounting for confounding factors in the wild. *Sci. Total Environ.* 538, 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.081>

Shipley, B., 2016. Cause and correlation in biology: a user's guide to path analysis, structural equations and causal inference with R. Cambridge University Press.

SIE, 2016. SIEAG-database. Agence de l'eau ADOUR-GARONNE.

Simide, R., Angelier, F., Gaillard, S., Stier, A., 2016. Age and Heat Stress as Determinants of Telomere Length in a Long-Lived Fish, the Siberian Sturgeon. *Physiol. Biochem. Zool.* 89, 441–447. <https://doi.org/10.1086/687378>

Šimková, A., Lafond, T., Ondračková, M., Jurajda, P., Ottová, E., Morand, S., 2008. Parasitism, life history traits and immune defence in cyprinid fish from Central Europe. *BMC Evol. Biol.* 8, 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-29>

Slavík, O., Horký, P., Douda, K., Velíšek, J., Kolářová, J., Lepič, P., 2017. Parasite-induced increases in the energy costs of movement of host freshwater fish. *Physiol. Behav.* 171, 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.010>

Smolders, R., Bervoets, L., De Boeck, G., Blust, R., 2002. Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 87–93. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210113>

Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.* 129, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.027>

Sokolova, I.M., 2013. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53, 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>

Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>

- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181–201. <https://doi.org/10.3354/cr00764>
- Sol, D., Jovani, R., Torres, J., 2003. Parasite mediated mortality and host immune response explain age-related differences in blood parasitism in birds. *Oecologia* 135, 542–547. <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1223-6>
- Sprague, J.B., 1970. Measurement of pollutant toxicity to fish. II. Utilizing and applying bioassay results. *Water Res.* 4, 3–32. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(70\)90018-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(70)90018-7)
- Stauffer, J., Panda, B., Eeva, T., Rainio, M., Ilmonen, P., 2017. Telomere damage and redox status alterations in free-living passerines exposed to metals. *Sci. Total Environ.* 575, 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.131>
- Stott, B., Elsdon, J.W.V., Johnston, J.A.A., 1963. Homing behaviour in gudgeon (*Gobio gobio*, (L.)). *Anim. Behav.* 11, 93–96. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(63\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0003-3472(63)90015-0)
- Sures, B., Nachev, M., Selbach, C., Marcogliese, D.J., 2017. Parasite responses to pollution: what we know and where we go in ‘Environmental Parasitology.’ *Parasit. Vectors* 10. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2001-3>
- Tissot, L., Souchon, Y., 2010. Synthèse des tolérances thermiques des principales espèces de poissons des rivières et fleuves de plaine de l’ouest européen. *Hydroécologie Appliquée* 17, 17–76. <https://doi.org/10.1051/hydro/2010004>
- USEPA, 2008. ECOTOX 4.0 ecotoxicology database [Accessible]. <http://cfpub.epa.gov/ecotox>.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S1382-6689\(02\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S1382-6689(02)00126-6)
- van Dyk, J.C., Pieterse, G.M., van Vuren, J.H.J., 2007. Histological changes in the liver of *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae) after exposure to cadmium and zinc. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66, 432–440. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.012>
- Van Oosterhout, C., Joyce, D.A., Cummings, S.M., Blais, J., Barson, N.J., Ramnarine, I.W., Mohammed, R.S., Persad, N., Cable, J., 2006. Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evol. Int. J. Org. Evol.* 60, 2562–2574.
- van Oosterhout, C., Mohammed, R.S., Hansen, H., Archard, G.A., McMullan, M., Weese, D.J., Cable, J., 2007. Selection by parasites in spate conditions in wild Trinidadian guppies (*Poecilia reticulata*). *Int. J. Parasitol.* 37, 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2006.12.016>
- von Gersdorff Jørgensen, L., 2016. The dynamics of neutrophils in zebrafish (*Danio rerio*) during infection with the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 55, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.026>

Wernicke von Siebenthal, E., Rehberger, K., Bailey, C., Ros, A., Herzog, E.L., Segner, H., 2018. Trade-Offs Underwater: Physiological Plasticity of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Confronted by Multiple Stressors. *Fishes* 3, 49. <https://doi.org/10.3390/fishes3040049>

Wolf, J.C., Wheeler, J.R., 2018. A critical review of histopathological findings associated with endocrine and non-endocrine hepatic toxicity in fish models. *Aquat. Toxicol.* 197, 60–78. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.013>

Wolf, J.C., Wolfe, M.J., 2005. A Brief Overview of Nonneoplastic Hepatic Toxicity in Fish. *Toxicol. Pathol.* 33, 75–85. <https://doi.org/10.1080/01926230590890187>

Xu, H., Zhang, X., Li, H., Li, C., Huo, X.-J., Hou, L.-P., Gong, Z., 2018. Immune response induced by major environmental pollutants through altering neutrophils in zebrafish larvae. *Aquat. Toxicol.* 201, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.06.002>

Yang, J., Liu, D., Jing, W., Dahms, H.-U., Wang, L., 2013. Effects of Cadmium on Lipid Storage and Metabolism in the Freshwater Crab *Sinopotamon henanense*. *PLoS ONE* 8, e77569. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077569>

Zuur, A.F., Ieno, E.N., Elphick, C.S., 2010. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems: Data exploration. *Methods Ecol. Evol.* 1, 3–14. <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2009.00001.x>

Supporting material

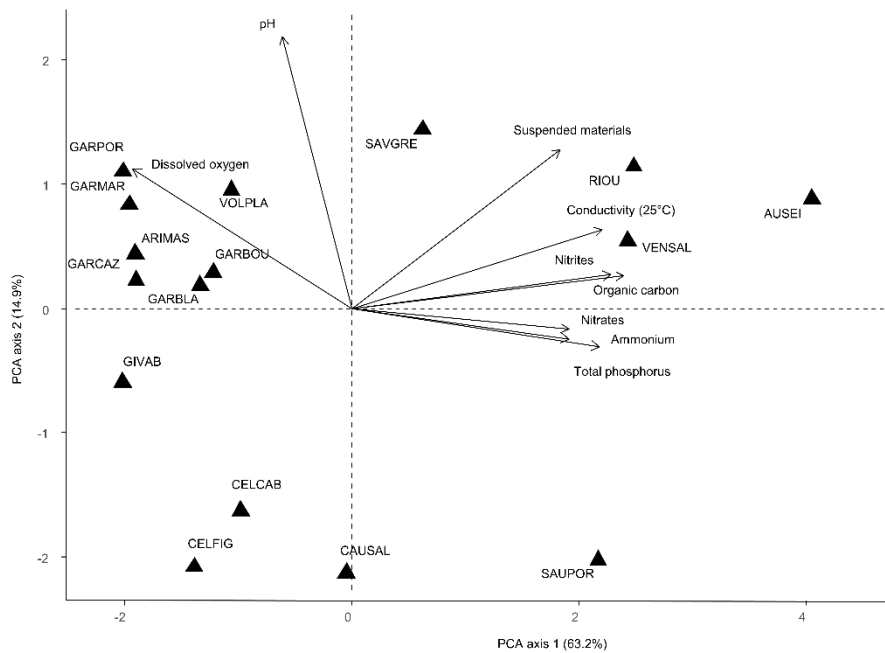



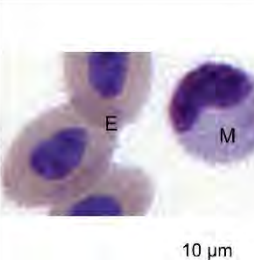
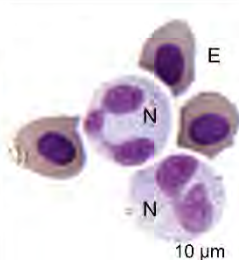
Figure S1. PCA of the 16 study sites according to the mean of each physico-chemical parameters measured in the water fraction during 4 years: concentration of oxygen dissolved, pH, amount of suspended materials, conductivity, concentrations of nitrates, nitrites, ammonium, phosphorus and organic carbon. Axis 1 represents the major part of the variation in the dataset (63.2%) and is mostly explained by the concentration of nitrites, nitrates, ammonium, phosphorus and organic carbon as well as the conductivity. The axis 1 was thus retained as a covariate in models in order to take into account variability of physico-chemical parameters among study sites.

Table S1. Mean concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$ of dry weight) and standard deviation (Sd) of 9 trace metal elements measured in the muscle of sampled fish according to their origin (study sites). The reliability of the analyses (Recovery) was assessed using TORT-3 (lobster hepatopancreas) certified material except for Al for which SLRS-6 was used.

Study sites	Concentration of trace metal elements in fish muscle ($\mu\text{g.g}^{-1}$ DW) \pm Sd										
	TU	n	Al	As	Co	Pb	Zn	Ni	Cd	Cr	Cu
GIVAB	-1	21	11.045 \pm 9.76	0.184 \pm 0.094	0.024 \pm 0.012	0.113 \pm 0.105	50.911 \pm 23.758	0.38 \pm 0.31	0.056 \pm 0.127	0.31 \pm 0.315	1.662 \pm 0.379
ARIMAS	-0.9	19	7.183 \pm 9.944	0.116 \pm 0.047	0.018 \pm 0.012	0.171 \pm 0.257	47.737 \pm 12.391	0.197 \pm 0.141	0.064 \pm 0.159	0.164 \pm 0.12	1.682 \pm 0.357
CELFIG	-0.9	20	17.762 \pm 29.137	0.303 \pm 0.162	0.033 \pm 0.023	0.142 \pm 0.179	43.965 \pm 15.78	0.351 \pm 0.181	0.06 \pm 0.04	0.309 \pm 0.284	1.531 \pm 0.369
GARMAR	-0.9	21	5.3 \pm 2.645	0.141 \pm 0.047	0.021 \pm 0.007	0.056 \pm 0.034	48.948 \pm 20.702	0.372 \pm 0.248	0.101 \pm 0.339	0.222 \pm 0.236	1.806 \pm 0.643
VOLPLA	-0.9	19	6.973 \pm 3.943	0.088 \pm 0.022	0.017 \pm 0.01	0.055 \pm 0.035	42.593 \pm 14.076	0.348 \pm 0.259	0.013 \pm 0.014	0.427 \pm 0.601	1.561 \pm 0.452
CELCAB	-0.8	17	7.591 \pm 8.781	0.291 \pm 0.079	0.02 \pm 0.011	0.051 \pm 0.035	34.931 \pm 8.431	0.311 \pm 0.164	0.076 \pm 0.075	0.673 \pm 0.64	1.75 \pm 0.835
GARCAZ	-0.8	29	17.19 \pm 14.543	0.188 \pm 0.08	0.043 \pm 0.055	0.177 \pm 0.2	42.469 \pm 12.928	0.487 \pm 0.334	0.245 \pm 0.836	0.436 \pm 0.539	1.74 \pm 0.399
GARPOR	-0.8	3	7.989 \pm 2.963	0.196 \pm 0.074	0.017 \pm 0.008	0.105 \pm 0.053	34.726 \pm 3.28	0.322 \pm 0.129	0.138 \pm 0.119	0.311 \pm 0.198	1.426 \pm 0.47
CAUSAL	-0.7	19	8.394 \pm 5.396	0.244 \pm 0.163	0.02 \pm 0.013	0.097 \pm 0.065	49.182 \pm 24.91	0.261 \pm 0.152	0.011 \pm 0.015	0.367 \pm 0.248	1.873 \pm 1.27
SAVGRE	-0.6	8	25.552 \pm 30.218	0.177 \pm 0.037	0.014 \pm 0.004	0.094 \pm 0.05	56.874 \pm 22.16	0.794 \pm 1.384	0.236 \pm 0.257	0.205 \pm 0.155	1.879 \pm 0.532
VENSAL	-0.6	19	11.595 \pm 10.051	0.136 \pm 0.041	0.018 \pm 0.007	0.123 \pm 0.107	25.392 \pm 4.378	0.434 \pm 0.547	0.24 \pm 0.578	0.341 \pm 0.214	1.724 \pm 1.037
GARBLA	-0.5	17	6.201 \pm 3.129	0.187 \pm 0.046	0.024 \pm 0.016	0.184 \pm 0.379	48.977 \pm 23.022	0.243 \pm 0.128	0.048 \pm 0.074	0.254 \pm 0.171	1.823 \pm 0.495
GARBOU	-0.3	8	8.153 \pm 6.016	0.288 \pm 0.038	0.015 \pm 0.005	0.202 \pm 0.311	40.198 \pm 9.958	0.353 \pm 0.302	0.173 \pm 0.308	0.275 \pm 0.234	1.792 \pm 0.424
SAUPOR	-0.3	6	8.599 \pm 7.981	0.476 \pm 0.169	0.022 \pm 0.021	0.116 \pm 0.114	58.592 \pm 34.361	0.282 \pm 0.211	0.012 \pm 0.006	0.31 \pm 0.329	2.348 \pm 1.466
AUSEI	-0.2	21	6.708 \pm 4.282	0.093 \pm 0.025	0.022 \pm 0.02	0.073 \pm 0.056	38.684 \pm 14.393	0.266 \pm 0.171	0.046 \pm 0.105	0.222 \pm 0.179	1.579 \pm 0.611
RIOU	1.3	15	1.852 \pm 0.675	0.343 \pm 0.11	0.014 \pm 0.005	0.093 \pm 0.055	93.079 \pm 52.182	0.178 \pm 0.106	0.297 \pm 0.144	0.073 \pm 0.057	2.552 \pm 1.814
Recovery in % (Tort-3)	NA	8	99 \pm 2 *	85 \pm 12	90 \pm 12	100 \pm 15	95 \pm 12	89 \pm 9	91 \pm 15	104 \pm 8	89 \pm 9

* Since the certified value for Al is not available for this matrix, we used the SLRS-6 stream water matrix as the reference here.

Table S2. Main cellular type identified and counted for the N/L inflammatory immune ratio characterization. Lymphocytes (L) frequently have pseudopods and large condensed nucleus and scant cytoplasmic space. Monocytes (M) are large round cells with eccentric kidney-shaped nucleus. Neutrophils (N) are large round cells with abundant cytoplasm and eccentric multi-lobed nucleus. Erythrocytes (E) are elliptical cells with a central dark purple/blue nucleus.

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

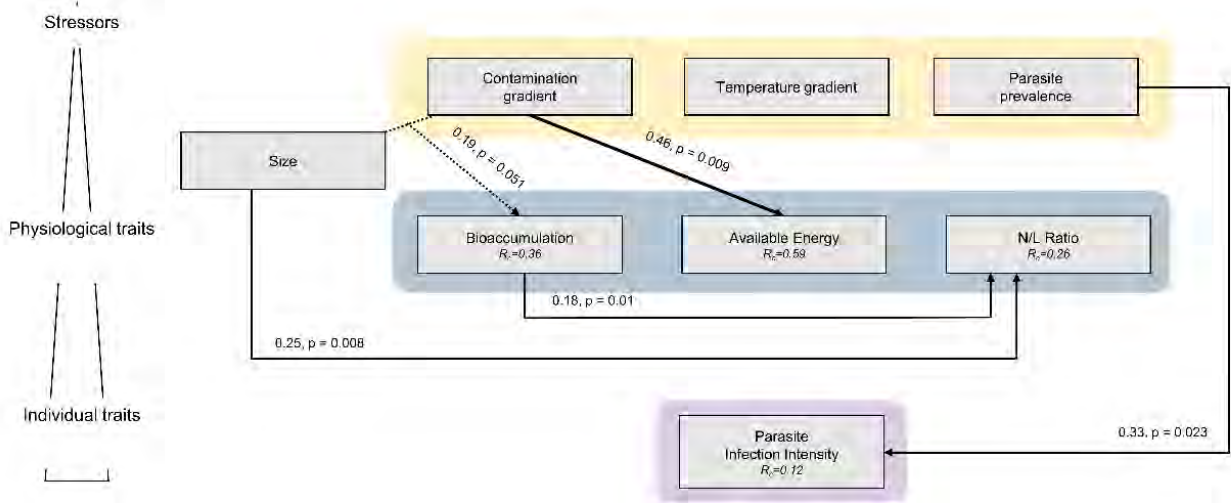


Figure S2. Structural equation model (SEM) of relationships between stressors and parasite infection intensity (*Gyrodactylus* number in infected fish only) (goodness of fit: $p = 0.414$, CFI = 18.652, $df = 18$, $n = 82$). Significant links are represented by solid arrows (red negative relationship, black: positive relationship) and marginally significant link are represented by dotted arrows. Unstandardized coefficient and p-values are given alongside arrows. Line width is proportional to unstandardized coefficients (arrow width (pt) = 1×10 [std-estimate]).



CHAPITRE 4

COST OF IMMUNE RESPONSE

Résumé du chapitre

Au cours des dernières décennies, les activités humaines et les changements globaux ont modifié la fréquence des infections par les pathogènes émergents (Adlard et al., 2015; Okamura et al., 2011). Ces infections peuvent induire des modifications physiologiques et comportementales importantes (Barber et al., 2000; Buchmann and Lindenstrøm, 2002; Rebl and Goldammer, 2018). Parmi ces réponses, les réponses immunitaires innées, à médiation cellulaire (i.e. réponse inflammatoire) et humorale, jouent un rôle prépondérant chez les poissons (Magnadóttir, 2006; Uribe et al., 2011). De nombreuses études portant sur des oiseaux et des petits mammifères indiquent que ces réponses immunitaires induisent un coût non-négligeable qui peut entraîner une réduction des réserves énergétiques, une perte de masse (Bonneaud et al., 2003; Lochmiller and Deerenberg, 2000; Sheldon and Verhulst, 1996) ainsi que la production de stress oxydant (Costantini and Møller, 2009). Cependant, la cinétique de réponses ainsi que les seuils auxquels ces réponses peuvent être détectés chez les poissons sont peu connus, et ce, en particulier pour les traits comportementaux (Johnson, 2002; Kirsten et al., 2018).

Ce chapitre vise donc à évaluer la dynamique de la réponse immunitaire et ses conséquences sur la physiologie et le comportement des poissons d'eau douce au cours du temps. De plus, nous avons testé les doses et temps optimaux pour déclencher une réponse immunitaire chez le goujon. Nous avons émis l'**hypothèse** que le déclenchement de la réponse immunitaire peut entraîner des effets en cascade sur les traits des poissons, en lien avec la mise en place des défenses immunitaires et antioxydantes, qui pourrait dépendre de la dose d'antigène injectée. Une **stratégie de compensation** pourrait alors se mettre en place (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013), c'est-à-dire une **réallocation énergétique** avec une **réduction des réserves énergétiques** stockées dans les muscles, une **perte de masse**, ainsi qu'une **réduction des activités comportementales, au profit des défenses immunitaires et/ou antioxydantes**.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons injecté différentes concentrations d'antigène (dose faible, intermédiaire et élevée) à des goujons (*Gobio occitaniae*) provenant de

pisciculture. L'état de santé de ces poissons a ensuite été analysé à plusieurs intervalles de temps (i.e. 2, 4, 8 et 16 jours) et à plusieurs échelles biologiques. Aux échelles moléculaires et cellulaires, nous avons mesuré plusieurs traits liés à la réponse immunitaire : la réponse inflammatoire locale (i.e. gonflement au point d'injection des antigènes), la réponse humorale (i.e. activité lysozyme, peroxydase et hémolytique) et le métabolisme énergétique (i.e. stockage des réserves énergétiques dans les muscles). A l'échelle individuelle, nous avons suivi la perte de masse des individus au cours de l'expérimentation et estimé un proxy des réserves énergétiques stockées dans le foie (i.e. indice hépatosomatique) en fin d'expérimentation. De plus, à chaque temps de la cinétique, les poissons ont été filmés afin d'évaluer leurs réponses comportementales (i.e. activité de nage, exploration, sociabilité) en lien avec le traitement auquel ils ont été exposés.

Les résultats indiquent qu'une faible dose d'antigène affecte peu les différents traits que nous avons mesuré chez les poissons, avec un maintien de leur niveau de réserves énergétiques, ainsi que de leur activité de nage tout au long des 16 jours d'exposition. Au contraire, les poissons ayant reçu une injection avec les doses d'antigène intermédiaires ou élevées présentent une augmentation de leur réponse inflammatoire locale ainsi qu'humorale (après 2 jours). Ils présentent aussi une réduction de leur activité de nage et de leur sociabilité (après 4 jours), potentiellement en lien avec l'augmentation de la demande énergétique. Cela suggère que la réponse immunitaire induit bien des effets en cascade en entraînant notamment une modification du comportement des poissons. Cependant, les poissons ne présentent pas de réduction de leur condition générale (i.e. perte de masse, indice hépatosomatique), et ce quelle que soit la dose d'antigène injectée.

Ces résultats sont en accord avec le concept de « sickness behaviour » qui suggère que le déclenchement de la réponse immunitaire entraîne une réduction de l'activité des poissons, probablement en lien avec des mécanismes de réallocation énergétique (Dantzer, 2004; Johnson, 2002) et donc avec la mise en place d'une stratégie de compensation. Cette étude souligne aussi l'importance de prendre en compte les effets des pathogènes en tant que facteurs de stress dans le milieu naturel. De plus, d'autres investigations restent nécessaires afin d'évaluer le coût des réponses au stress dans un contexte d'expositions multiples, et au sein de plusieurs populations de poissons sauvages.

Dose and time-dependent effects of an immune challenge on fish across biological levels

Quentin Petitjean^{1,2}, Lisa Jacquin², Michel LeHénaff³, Annie Perrault¹, Myriam Cousseau¹, Pascal Laffaille¹, Séverine Jean¹

¹ *Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR5245 EcoLab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.*

² *Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR5174 EDB, Université de Toulouse, CNRS, IRD, UPS, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.*

³ *Bordeaux Science Agro, 1 cours du Général De Gaulle, CS 40201, 33175 Gradignan, France*

ABSTRACT

Due to global changes, fish are increasingly exposed to immune challenges associated with disease outbreaks in aquatic ecosystems. Adjustments in physiology and behavior are generally critical to maintain homeostasis after an immune challenge, but there is limited knowledge on the specific thresholds and dynamics of responses across levels of biological organization in fish. In this study, we tested how different concentrations of an antigens mixture (Phytohemagglutinin PHA and Lipopolysaccharide LPS) affected innate immunity with potential consequences on oxidative stress, energy reserves, body condition and behavior across time, using the common gudgeon (*Gobio occitaniae*) as model species. The immune challenge induced a transitory increase in lytic enzyme activity (i.e., lysozyme) and local immune response (i.e., skin swelling) two days after the antigen injection. The available energy stored in muscle was also reduced four days after injection, without inducing oxidative stress at the cellular level. Overall, the immune challenge induced limited costs at the molecular and cellular levels but had strong effects at the whole organism level, especially on behavior. Indeed, fish activity and sociability were affected in a dose and time-dependent manner. These results suggest that immune challenges have dose-dependent effects across levels of biological organization and that behavior is a key response trait to cope with pathogen-induced immune costs in the wild, although fitness consequences remain to be tested.


Keywords Eco-immunology, pathogen, sickness behavior, dose-response, energy storage, oxidative stress

1. Introduction

Global change affects the rate of emerging diseases and disease outbreaks, especially in aquatic ecosystems (Adlard et al., 2015; Okamura et al., 2011). Indeed, anthropogenic activities greatly modify fish-pathogen interactions in freshwater habitats (Dudgeon et al., 2006) and have contributed to several disease outbreaks in fish populations, such as the Proliferative Kidney Disease (PKD) (Okamura et al., 2011; Sterud et al., 2007) or the Gyrodactylus salaris epidemic (Bakke et al., 2007; Paladini et al., 2014). Consequently, some freshwater fish populations are increasingly exposed to costly immune challenges (Krkošek et al., 2007), but the suite of physiological and behavioral responses against such immune challenges and their associated costs are still poorly known.

When exposed to pathogens, freshwater fish display a cascade of physiological and behavioral responses limiting pathogen proliferation and maintaining fish homeostasis and fitness (Barber et al., 2000; Behringer et al., 2018; Buchmann and Lindenstrøm, 2002). Immunity is a central defense trait, which consists of interconnected innate (non-specific) and acquired (specific) branches (Lochmiller and Deerenberg, 2000). In fish, the innate immune system is the most critical immune branch, which identifies antigens (Magnadóttir, 2006; Uribe et al., 2011) and recruits immune cells such as neutrophils, macrophages and/or lymphocytes locally. This cellular immune response then induces the elimination of pathogens through phagocytosis, the complement system, and several enzymes' secretion. For instance, lytic enzymes such as lysozymes (Alexander and Ingram, 1992; Magnadóttir, 2006) and peroxidase participate in pathogen elimination through the oxidative burst (Ellis, 2001; Quade and Roth, 1997; Rodríguez et al., 2003).

Several studies suggest that these non-specific immune responses could be extremely costly in birds or mammals (Bonneaud et al., 2003; Lochmiller and Deerenberg, 2000; Sheldon and Verhulst, 1996). However, studies in fish are still scarce, so that the physiological and fitness costs of immune challenges in fish remain debated. During the immune response, metabolic activity increases to support the energy requirements



of immune cells (King and Swanson, 2013; Rauw, 2012). Several consequences are expected, such as a depletion of energy reserves in the liver and muscle (Wang et al., 2012), with potentially detrimental effects on body mass and whole-body condition (Bonneaud et al., 2003). For instance, immune challenges can deplete liver glycogen in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Wedemeyer et al., 1969) and cause a significant body mass loss in mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) (Bonneaud et al., 2016). The immune response itself and the associated increase of metabolic activity can lead to an overproduction of reactive oxygen species (ROS), which may exceed the amount of antioxidant molecules and result in deleterious consequences on cell and tissue integrity (Cherry and Piantadosi, 2015; Costantini and Møller, 2009; Finkel and Holbrook, 2000; Jaeschke et al., 2002; Preynat-Seauve et al., 2003). However, the specific thresholds and timing of these responses are still poorly known.

In addition, immune challenges can affect animal behavior, but the behavioral costs of immune challenges in fish are still elusive (Combes, 2001; Filiano et al., 2016; Johnson, 2002). The so-called "sickness behavior" is a suite of behavioral changes, including a decrease of activity, exploration, and social behavior that can enable hosts to save energy for immunity and/or to limit the exposure to pathogens (Adelman and Martin, 2009; Combes, 2001). For instance, Kirsten et al. (2018) recently showed that immune challenged zebrafish (*Danio rerio*) displayed reduced activity, sociability, and exploratory behavior, which could benefit individuals by saving energy for immunity, but could also have severe negative consequences for fish fitness by reducing fish ability to forage, find mates or escape predators (Wong and Candolin, 2015). However, the threshold (e.g., the amount of antigens required) and the timing (i.e., duration) at which immune challenges trigger such behavioral changes are still unclear.

More generally, few studies investigated the cascading effects of immune challenges across levels of biological organization (i.e., from molecules to the whole individual), especially in fish, which limits our ability to predict the impacts of pathogens on fish fitness (Kirsten et al., 2018). Empirical studies are thus needed to test the potential physiological and behavioral changes in immune-challenged fish across time and biological levels.

To address these questions, we used the common gudgeon (*Gobio occitaniae*) as a model species because it is a common freshwater fish species from European streams,

which is widely exposed to immune challenge by numerous pathogens in the wild (Loot et al., 2007). We tested the effects of different concentrations of an antigen mixture (i.e., Phytohemagglutinin or PHA and Lipopolysaccharide or LPS) on humoral (i.e., lysozyme, hemolytic and peroxidase activity) and local cellular immune response (i.e., measured by skin swelling). We also measured oxidative stress in fish blood and available energy in muscle cells to test the oxidative and energetic costs of immune challenges. At the organ and individual level, we measured organosomatic indices, body mass changes, and fish behavioral traits (swimming activity and sociability). To better understand the dose-dependent temporal effects of immune challenges, we tested several antigen doses and monitored the kinetics of fish responses across time.

2. Material and Methods

2.1. MODEL SPECIES

The gudgeon (*Gobio occitaniae*) was chosen as a model species because it is ubiquitous in Europe's lowland streams (Keith et al., 2011). This benthic fish forages in the substrate for invertebrates and is gregarious, thus displaying complex social behaviors by forming schools (Keith et al., 2011; Pitcher, 1986). Gudgeons are exposed to several parasites in their natural habitats, such as monogenean ectoparasites, copepods, or nematode endoparasites (Loot et al., 2007). The gudgeon is also relatively sedentary and thereby potentially exposed to the same environmental stressors throughout its lifetime (Keith et al., 2011; Stott et al., 1963).

2.2. ANIMAL CARE

340 gudgeons were purchased from the fish farming Les Viviers de Haute Corrèze (Courteix, France) in size range 10–14 cm (13.3 ± 2.7 g). At the fish farm, fish were raised in natural ponds without selective breeding programs nor vaccination treatment. Fish were brought to the laboratory and were immediately deparasitized using Praziquantel (Prescription n°2529, Vetofish, France, purity = 1000 mg.g⁻¹; concentration: 3 mg.L⁻¹) to eliminate potential parasites and standardize their immune status before the experimentation. Fish were then acclimated for 30 days in four 200 L tanks (85 fish per tank) containing oxygen pumps, mechanical filters, gravel, and

shelters to reduce stress. During acclimation, temperature and light regime were 14°C and 12:12 h, respectively. Physico-chemical parameters were monitored every week (pH = 7.9 ± 0.2; Conductivity = 324 ± 29 µS.cm⁻¹; O₂ dissolved = 11.4 ± 1.1 mg.L⁻¹). Half of the water was renewed every week to ensure proper conditions. Fish were fed daily (about 1% of the total biomass per tank) with commercial fish food (JBL Propond Sterlet S) to ensure a sufficient daily food supply (Flammarion et al., 1998; Kestemont et al., 1991). No mortality occurred during the acclimation period.

2.3. ANTIGENS

To standardize the immune challenge among individuals and mimick an infection by a wide range of pathogens, we used a mixture of two antigens: LPS (i.e., *Escherichia coli* lipopolysaccharide, serotype: O111: B4, L2830 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and PHA (i.e., *Phaseolus vulgaris* phytohaemagglutinin-P, L8754 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Both antigens are commonly used in eco-immunological studies to trigger inflammatory, and more broadly, innate immune response in various vertebrates, including fish (Ardia and Clotfelter, 2006; Bonneaud et al., 2003; Otálora-Ardila et al., 2016). The LPS antigen is an endotoxin from the membrane of gram-negative bacteria, which triggers a substantial and costly local and humoral innate immune response (Swain et al., 2008). The PHA is a plant protein inducing a cell-mediated response (e.g., inflammatory response and proliferation of T-cells), reflecting a local cellular immune response against a wide range of ectoparasites (Martin et al., 2006; Tella et al., 2008). Because the gudgeon's immune system is poorly known, we injected both antigens conjointly in an antigen mixture to maximize our chance to trigger a significant immune response.

2.4. EXPERIMENTAL DESIGN

Before the experiment, 20 fish were randomly selected and used as a reference untreated (i.e., uninjected) group. They were sampled immediately after acclimation (untreated fish sampled at T = 0) (Fig. 30). The remaining fish were marked with visible implant elastomers (Northwest Marine Technologies, Inc., Shaw Island, Washington) to identify each individual for behavioral assays.

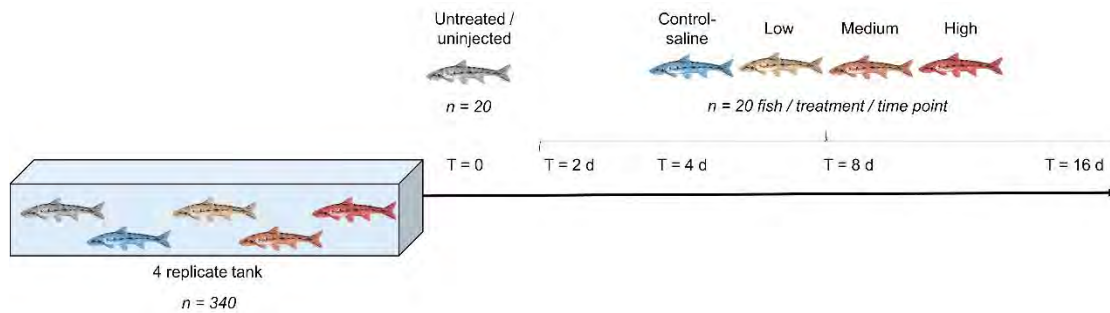


Figure 30. Experimental design: At the end of the acclimation 20 fish were sampled and considered as untreated (uninjected) fish. The remaining fish were randomly assigned to 4 treatments ($n = 80$ fish per treatment): control-saline (injected only with PBS, in blue), low-dose (injected with 4.5 g.L^{-1} of each antigen, in yellow), medium-dose (injected with 9.0 g.L^{-1} of each antigen, in orange) and high-dose group (injected with 18.0 g.L^{-1} of each antigen in red). At each time point (2, 4, 8, and 16 days), we collected 20 fish from each experimental group.

Fish were then randomly assigned to one out of four experimental treatments (Fig. 30) and maintained in the same conditions as for acclimation (e.g., temperature 14°C , light regime were 12:12 h, half of the water renewed every week). There were $n = 80$ fish per treatment, distributed in four replicate tanks ($n = 20 \times 4$ replicate tanks per treatment). Fish involved in the experiment were anesthetized using benzocaine at 50 mg.L^{-1} and subcutaneously injected in the caudal peduncle with $10 \mu\text{L}$ of PBS (control-saline group named: PBS, $n = 80$ control fish) or to different concentrations of each antigen at 4.5 g.L^{-1} , 9.0 g.L^{-1} or 18.0 g.L^{-1} (treatment names: low, medium and high respectively) using Hamilton syringe ($10 \mu\text{L}$, 26-gauge). Hence, fish from low, medium and high dose groups were injected with $10 \mu\text{L}$ of PBS containing $45 \mu\text{g}$ of PHA and $45 \mu\text{g}$ of LPS, $90 \mu\text{g}$ of PHA and $90 \mu\text{g}$ of LPS or $180 \mu\text{g}$ of PHA and $180 \mu\text{g}$ of LPS, respectively. We chose these concentrations based on previous studies using a constant ratio of antigens concentration for fish biomass corresponding approximately to 4.5, 9 and 18 mg.kg^{-1} of each antigen (see Ardia and Clotfelter, 2006; Johansen et al., 2006; Jolly et al., 2014; Le Guernic et al., 2016).

We then monitored fish responses across time (0, 2, 4, 8, and 16 days) by sampling 20 fish per time point in each treatment group (Fig. 30). These time durations were chosen based on the literature showing significant changes in immune activity at 2 and 4 days post-injection in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*), respectively (Langston et al., 2001; Le Guernic et al., 2016), while behavioral changes can be detected at 2, 4 and 8 days in mice (Zhao et al., 2019). In addition, we sampled fish 16 days after the immune challenge in order to observe potential lasting consequences on fish energy mobilization and behavior.

At each time point, videos were recorded to measure fish behavior (details below). Fish were then euthanized using an anesthetic overdose (benzocaine, 150 mg.L⁻¹), weighed (+/- 0.1 g) and measured (+/- 0.1 cm). Blood samples were collected from the caudal vein in heparinized syringes (1mL Terumo syringe, 0.45x13 mm needle). The collected blood samples were centrifuged (4°C, 2000 g) for 10 min in order to retrieve plasma. Plasma samples were aliquoted in 2 parts and kept at -20°C for subsequent immune and oxidative damage and antioxidant capacity assays (see below). Fish were then dissected for sex determination and further analyses on tissues. Spleen and liver were weighed (+/- 1 mg) to calculate condition indices while the white muscle of fish was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C to assess fish energy reserves (see below).

In total, 20 fish per treatment and per time point were used, but due to difficulties in collecting blood or tissue on some small individuals, sample sizes can vary across groups (from n = 7 to n = 20 depending on the considered trait, treatment and time point). We checked the injection of PBS itself was not stressful for fish by comparing saline-injected fish (PBS) with untreated fish for all traits (see results in Table 7 below). There was no difference in sex ratio (Kruskal Wallis test $\chi^2=19.54$, p=0.24) nor fish mass (Kruskal Wallis test $\chi^2=14.13$, p=0.59); and size (Kruskal Wallis test $\chi^2=12.87$, p=0.68) among treatments. Survival rate was 98.75% and was not significantly different among treatments (binomial LM, $\chi^2 = 18.0$, p-value = 0.32), with a total of four dead fish (i.e., 1 from low and 3 from high dose treatment groups), showing that the experimental treatments resulted in very low mortality.

2.5. MOLECULAR-LEVEL: OXIDATIVE STRESS INDEX

We measured the non-enzymatic antioxidant capacity of the plasma barrier (Isaksson, 2013) using the OXY-adsorbent test (expressed in mMeq HClO; Diacron International, Grosseto, Italy) and both active oxidant action and oxidative damage (Alberti et al., 2000) using d-ROM test (expressed in mMeq H₂O₂; Diacron International, Grosseto, Italy). Both assays were performed according to the manufacturer instructions with some modifications for fish plasma sample, as suggested in previous studies (Bagni et al., 2007; Hoogenboom et al., 2012). Intra- and inter-plate repeatability was 88.2 ± 8.9 % and 89.1 ± 2.1 %, respectively for OXY-adsorbent test and 95.4 ± 4.0 % and 95.9 ± 2.3 % for d-ROM test. We then used the ratio of oxidative damage divided by the

antioxidant capacity multiplied by 1000 in order to calculate an oxidative stress index (Costantini et al., 2006; Herborn et al., 2011), reflecting the oxidative status of each fish.

2.6. MOLECULAR-LEVEL: IMMUNE RESPONSE

We measured the humoral immune response through three parameters: the lysozyme activity, the hemolytic (complement) activity, and the peroxidase activity in fish plasma.

Lysozymes are essential anti-microbial proteins of the innate immune system that alter the cell wall of gram-positive and gram-negative bacteria (Magnadóttir, 2006). We measured lysozyme activity using a turbidometric assay according to previous studies (Cha et al., 2008; Kumari and Sahoo, 2005). Briefly, lyophilized *Micrococcus lysodeikticus* cells (gram-positive bacteria, ATCC No. 4698; Sigma, St. Louis, USA) were suspended in a sodium citrate buffer (0.05M, pH 5.5) at a concentration of 0.2 mg.mL⁻¹. 150µL of cell suspension was added to fish plasma (15 to 20 µL) in 96-well microtiter plates. Lysozyme activity was then measured through the decrease of absorbance (at 450 nm) along a 40 min kinetics of 5 min intervals and corrected according to the volume of plasma used in the assay. A unit of lysozyme activity (U) was defined as the quantity of sample required to induce a reduction in absorbance of 0.001/min.

The hemolytic activity is a non-specific measure of the innate immune system, activated by numerous micro-organisms, which measures the activity of the complement immune system of fish (Magnadóttir, 2006, 2000). We measured the hemolytic activity of fish plasma according to previous methods (Magnadóttir, 2000; Sakai, 1992). Briefly, red blood cells of sheep (Biomerieux, Lyon, France) were diluted in an HBSS (Hanks' Balanced Salt solution) buffer containing Mg²⁺ to reach a concentration of 3%. Serial dilutions of 20 µL of fish plasma sample (6 dilutions per samples: 1/10^e, 1/20^e, 1/40^e, 1/80^e, 1/160^e, 1/320^e) were made within 96-well microtiter plates and 100 µL of the 3% blood cell suspension was added in each well. After 60 minutes of incubation at 21°C, the microplate was centrifuged at 800 g for 5 min, and 100 µL of the supernatant was transferred to another microplate to read sample absorbance at 450 nm. Within each plate, maximum and spontaneous hemolysis (i.e., positive and negative controls) were made by adding 100µL of distilled water or HBSS

buffer to the blood cell suspension, respectively. Hemolytic activity was then measured as the concentration of plasma necessary to lyse 50% of red blood suspension (U.mL⁻¹).

The peroxidase activity is a measure of enzymes' activity (i.e., myeloperoxidase and eosinophil peroxidase) released during the oxidative burst by leukocytes to fight pathogens (Guardiola et al., 2013; Rodríguez et al., 2003). We measured the peroxidase activity of fish plasma according to previously described methods (Guardiola et al., 2013; Quade and Roth, 1997). Briefly, 5 µL of plasma was diluted in 500 µL of HBSS buffer without Ca²⁺ or Mg²⁺. We then placed 60 µL of diluted plasma in 96-well microtiter plates and added 100 µL of enzyme substrate composed of 1mL of tetramethylbenzidine and dimethylsulfoxide (TMB and DMSO; 1:1 m/v; Sigma, St. Louis, USA), 20µL of 3% hydrogen peroxide (30% H₂O₂; Sigma, St. Louis, USA) and 9mL of citrate phosphate buffer (0.05 M, pH = 5.0) in each well. After an incubation of 2 minutes, we added 50 µL of sulphuric acid (2 M, 2SO₄; Sigma, St. Louis, USA) to stop the reaction and read sample absorbance at 450 nm. A unit of peroxidase activity (U) was defined as quantity of enzyme per milliliter of plasma necessary to oxidize 1 mole of H₂O₂ per minute.

2.7. CELLULAR LEVEL: LOCAL IMMUNE RESPONSE

We assessed the local immune response by measuring the local skin swelling (i.e., thickness measurement) of the caudal peduncle after immune challenge or control injection following previous studies in fish (Ardia and Clotfelter, 2006; O'Connor et al., 2014). The local immune response reflects the intensity of the local inflammation and the proliferation of T-cells (Ardia and Clotfelter, 2006; O'Connor et al., 2014; Tella et al., 2008). The thickness of the caudal peduncle was measured three times by the same operator and averaged before and after the injection of the antigen mixture or PBS using a thickness gauge (Elcometer® 124) to calculate the intensity of the local immune response as the difference of peduncle thickness before and after injection divided by the thickness before injection x100. The intra-individual repeatability was 97.0 ± 1.2 % before injection and 96.2 ± 1.0 % after injection.

2.8. CELLULAR LEVEL: AVAILABLE ENERGY

The amount of available energy in white muscle cells is a good marker of energy status because it is critical for the maintenance of biological functions of fish, especially under stress (Gandar et al., 2016; Gomes et al., 2015). We thus used previously validated protocols (De Coen and Janssen, 1997; Gandar et al., 2017) to measure the total available energy in fish muscle by summing energetic values of carbohydrates, proteins, and lipids content expressed in $\text{mJ}\cdot\text{mg}^{-1}$ of muscle (see Gandar et al., 2017).

2.9. ORGAN-LEVEL: CONDITIONS INDICES

Three condition indices were calculated to reflect the general condition of fish based on organ mass. Firstly, we measured an averaged daily body mass change by calculating body mass change before and after the experiment. We then standardized this value by the number of experimental days fish experienced to measure an averaged daily changes in whole-body condition. Secondly, we measured the splenosomatic index (SSI, spleen mass corrected by the body mass $\times 100$) as a proxy of spleen state resulting from the production of erythrocytes and lymphocytes and their release in the blood during the immune and stress responses (Maule and Schreck, 1990; Nilsson, 1983; Pearson and Stevens, 1991). Finally, we measured the hepatosomatic index (HSI, liver mass corrected by the body mass $\times 100$) as a proxy of energy content in the liver (Chellappa et al., 1995).

2.10. INDIVIDUAL-LEVEL: BEHAVIOUR

To measure fish behavior, fish were placed by groups of 5 individuals (from the same tank and the same treatment) in a rectangular arena (75 x 50 cm) containing 30 L of water. During behavioral measurements, fish were kept in groups of 5 individuals to reduce stress and record social behaviors. After 5 min of acclimation, videos were recorded using Webcam Logitech C922 Pro Stream (30 fps, 1080p) and blindly analyzed using Boris software (Friard and Gamba, 2016) for 10 minutes based on previous studies (Jacquin et al., 2017; Lopez-Luna et al., 2017). Three behavioral traits were chosen because they are commonly affected by pathogens and immune challenges: swimming activity, exploration, and sociability (Barber et al., 2000). To measure fish activity and exploration, the tank was virtually divided in six areas (25 x 25 cm). The activity was measured as the time spent swimming and the number of crossed lines (area limits) for 10 minutes (Calfee et al., 2016), while the exploration

was measured as the number of visited areas following previous studies (Jacquin et al., 2017). Sociability was assessed as the number of encounters between individuals (number of times an individual touches another individual with the head) (Geffroy et al., 2014).

Because behavioral traits related to swimming activity and exploration were partly correlated (see Figure S3), we used a PCA to extract one synthetic variable representing the "general activity" of fish (PCA axis 1, 52.9% of variance explained). Fish with a higher general activity index on the first PCA axis swam for a longer time and explored more areas. The number of contacts was used as a proxy of sociability (Colchen et al., 2016; Geffroy et al., 2014).

2.11. STATISTICS

To test whether time and antigen doses affect fish responses, we used linear mixed-effects models (LMM, lme4 package, Bates et al., 2015) on each trait: oxidative stress ratio (log-transformed), lysozyme (root-square transformation), hemolytic activity (root-square transformation), peroxidase activity (log-transformed), local immune response (skin swelling), total available energy in muscle (log-transformed), daily mass change (log-transformed), SSI (log-transformed), HSI (log-transformed), general activity (first behavioral PCA axis) and sociability (number of contacts, log-transformed). The experimental replicate tank was included as a random effect to take into account possible shared conditions in the same tank. The fixed explanatory variable was the combination of the treatment group (PBS, low dose, medium dose, or high dose of antigens) and time postinjection (0, 2, 4, 8, and 16 days). Fish size and sex were added as covariates in all models but removed from final models when non-significant. When the effect of the fixed explanatory variable (i.e., treatment group combined with the time postinjection) was significant, we used selective contrast posthoc analyses (emmeans package, Lenth et al., 2017) with False Discovery Rate adjustment (Benjamini and Hochberg, 1995) to analyze differences between each treatment (i.e., dose and time) and the control-saline group within a given time point. To control the potential effect of captivity and elastomers injection, we compared fish involved in the experiment (including control saline PBS fish) and untreated fish sampled at T = 0 day. Statistical analyses were made using the open-source software R (V 3.5.2).

3. Results

3.1. MOLECULAR-LEVEL: OXIDATIVE STRESS

We found no difference in oxidative stress between untreated fish and fish involved in the experiment. In addition, the oxidative stress index was not affected by any treatment (LMM, $\chi^2 = 22.2$, p-value = 0.14) (Table 7). More specifically, oxidative damage and antioxidant capacity (LMM, $\chi^2 = 20.1$, p-value = 0.22 and $\chi^2 = 18.3$, p-value = 0.31, respectively) were not significantly affected by antigen injection, whatever the time point.

Table 7. Linear mixed models (LMM) explaining fish responses to treatments across time (2, 4, 8 or 16 days): untreated T = 0, injection of control saline solution (PBS), injection of a low (4.5 g.L⁻¹), medium (9.0 g.L⁻¹) or high (18.0 g.L⁻¹) dose of LPS and PHA antigens. Fish size and sex were included as covariates but removed from final models. The χ^2 and p-value on the right correspond to the ANOVA tests testing the interaction between treatment and time. Different upper case letters indicate significant differences due to the experiment itself (i.e., differences between the experimental group and untreated fish euthanized at T = 0). Different lower case letters indicate significant differences between control-saline fish (PBS) and antigens-injected fish (low, medium and high dose) at each time point (2, 4, 8, 16 days) from posthoc tests.

Biological levels	Response traits Unit	Time (days)	Treatments					n	χ ²	P
			Untreated T = 0	Control PBS	Low	Medium	High			
			Mean ± Se	Mean ± Se	Mean ± Se	Mean ± Se	Mean ± Se			
Molecular	Oxidative stress Index mMeq H ₂ O ₂ / mMeq HClO	2		2.6 ± 0.6	3.8 ± 0.8	4.4 ± 1.2	4.5 ± 1.6	302	22.2	0.14
		4	4.5 ± 1	1.7 ± 0.4	2.4 ± 0.5	2.7 ± 0.6	3.6 ± 0.9			
		8		3.6 ± 0.8	6.3 ± 3.8	3.7 ± 1.9	1.7 ± 0.3			
		16		1.7 ± 0.4	1.9 ± 0.6	4.9 ± 1.2	2.4 ± 0.8			
	Lysozyme activity U.mL ⁻¹	2		4.9 ± 2.1 A.a	6.3 ± 2.2 A.a	18.3 ± 3.8 B.b	16 ± 4.2 B.b	279	36.7	0.002
		4	4.7 ± 2.6 A	8.8 ± 2.1 A.a	12 ± 3.4 A.a	11.8 ± 3.2 A.a	9.9 ± 4.3 A.a			
		8		10.8 ± 3.5 A.a	18.3 ± 3.9 B.a	14.9 ± 3.5 B.a	11.9 ± 3.1 A.a			
		16		14 ± 3.1 B.a	14.4 ± 3 B.a	5.9 ± 2.2 A.a	18.9 ± 4 B.a			
	hemolytic activity U.mL ⁻¹	2		4.3 ± 1.6	11 ± 2.2	9.7 ± 3.5	7.7 ± 1.4	260	24.4	0.082
		4	12.9 ± 3.7	5.9 ± 2.1	6.6 ± 2	13.3 ± 5	9.5 ± 3.1			
		8		3.4 ± 1.6	5.2 ± 1.9	6.2 ± 4.6	5.4 ± 1.7			
		16		6.4 ± 2.2	4.3 ± 1.2	16.2 ± 5	12.4 ± 5.6			
	Peroxidase activity U.mL ⁻¹	2		23.9 ± 14 A.a	69.7 ± 55.7 A.a	25.6 ± 10.6 A.a	41.5 ± 21.3 A.a	221	26.6	0.046
		4	4.3 ± 2.6 A	68.9 ± 41.5 A.a	40.4 ± 20.9 A.a	90.3 ± 36.5 A.a	132.4 ± 56.7 A.a			
		8		46.1 ± 24.3 A.a	96.5 ± 49.3 A.a	104.5 ± 37.3 A.a	97.5 ± 35.6 A.a			
		16		115.9 ± 67.7 A.a	47.2 ± 27.6 A.a	124 ± 65 A.a	171.1 ± 57.3 B.a			
Cellular	Local immune response Swelling Percentage	2		2.7 ± 1.7 a	9.5 ± 1.8 b	10.1 ± 2.1 b	12.2 ± 2 b	316	88.2	< 0.001
		4	NA	4.8 ± 1.4 a	13.4 ± 1.5 b	12.6 ± 2.3 b	11.6 ± 2.1 b			
		8		2.7 ± 1.8 a	5.9 ± 2.2 a	11.6 ± 1.7 b	13.1 ± 2 b			
		16		-2.2 ± 2.2 a	5.1 ± 1.8 b	5.6 ± 2.4 b	7 ± 2.2 b			
	Available Energy mJ.mg _{muscle} ⁻¹	2		4762.7 ± 401 B.a	4924.4 ± 362.6 B.a	5013.1 ± 349.8 B.a	4837.5 ± 286.7 B.a	323	46.6	< 0.001
		4	3192.2 ± 152 A	4857.6 ± 347.3 B.a	4576.9 ± 291.8 B.a	4386.9 ± 285.4 A.a	4195.2 ± 254.8 A.a			
		8		5355.9 ± 382.1 B.a	5305.7 ± 314.2 B.a	4803.6 ± 308.9 B.a	4756.1 ± 300 B.a			
		16		4889.7 ± 440 B.a	4716.6 ± 311.1 B.a	5527.3 ± 434.9 B.a	5020.3 ± 418.3 B.a			

Table 7. Continued

Biological levels	Response traits Unit	Time (days)	Treatments					n	χ ²	P
			Untreated T = 0	Control	Low	Medium	High			
			Mean ± Se	Mean ± Se	Mean ± Se	Mean ± Se	Mean ± Se			
Organ	Daily mass change Percentage	2		0.94 ± 0.45	-0.87 ± 0.18	-0.54 ± 0.17	-0.51 ± 0.36	316	21.7	0.12
		4	NA	-0.26 ± 0.23	0.11 ± 0.20	0.38 ± 0.33	0.01 ± 0.22			
		8		-0.41 ± 0.05	-0.41 ± 0.06	-0.54 ± 0.21	-0.42 ± 0.05			
		16		-0.30 ± 0.06	-0.34 ± 0.06	-0.31 ± 0.03	-0.35 ± 0.07			
	SSI Relative spleen mass percentage	2		0.35 ± 0.05 A.a	0.32 ± 0.04 A.a	0.31 ± 0.04 A.a	0.41 ± 0.06 A.a	336	35.7	0.003
		4	0.48 ± 0.06 A	0.38 ± 0.05 A.a	0.42 ± 0.05 A.a	0.41 ± 0.1 A.a	0.45 ± 0.06 A.a			
		8		0.58 ± 0.07 A.a	0.44 ± 0.05 A.a	0.35 ± 0.04 A.a	0.59 ± 0.1 A.a			
		16		0.58 ± 0.09 A.a	0.44 ± 0.07 A.a	0.43 ± 0.07 A.a	0.54 ± 0.08 A.a			
	HSI Relative liver mass percentage	2		0.6 ± 0.1 A.a	0.8 ± 0.1 A.a	0.8 ± 0.1 A.a	0.8 ± 0.1 A.a	336	65.9	< 0.001
		4	0.7 ± 0.1 A	0.8 ± 0.1 A.a	0.9 ± 0.1 A.a	0.9 ± 0.1 A.a	0.9 ± 0.1 A.a			
		8		1 ± 0.1 A.a	0.8 ± 0.1 A.a	0.8 ± 0.1 A.a	0.8 ± 0.1 A.a			
		16		1.4 ± 0.2 B.a	1.1 ± 0.1 A.a	1 ± 0.1 A.a	1.3 ± 0.1 B.a			
Individual	General activity PCA axis	2		-0.1 ± 0.2 a	0.5 ± 0.2 a	-0.3 ± 0.2 a	-0.5 ± 0.6 a	316	52.9	< 0.001
		4	NA	0.9 ± 0.3 a	0.3 ± 0.2 a	-0.3 ± 0.2 b	-0.8 ± 0.5 b			
		8		0.3 ± 0.2 a	0.3 ± 0.2 a	0.7 ± 0.3 a	0.1 ± 0.1 a			
		16		-0.9 ± 0.5 a	0.2 ± 0.2 b	0.5 ± 0.2 b	-0.9 ± 0.4 a			
	Sociability Contacts counts	2		64.7 ± 6.2 a	64 ± 7.1 a	65.3 ± 6.8 a	60.6 ± 8.8 a	316	32.1	< 0.01
		4	NA	65.3 ± 6.7 a	61.3 ± 6.8 a	45.1 ± 4.1 a	46.7 ± 8.6 b			
		8		46.3 ± 6 a	44.4 ± 6 a	67.9 ± 7.8 a	56.8 ± 6.3 a			
		16		53.3 ± 6.5 a	51.3 ± 7.2 a	60.1 ± 5 a	54.8 ± 4.2 a			

3.2. MOLECULAR-LEVEL: HUMORAL IMMUNE RESPONSE

Fish from the control-saline PBS group had a marginally higher lysozyme activity compared to untreated fish, but only after 16 days of exposure (LMM post-hoc test, estimate = 1.57 ± 0.65 , p-value = 0.05, see Table 7), suggesting the injection itself, even of the PBS saline solution triggered a response compared to untreated (i.e., non-injected) fish but only at long time scales. Fish injected with a medium and high dose of antigens (9.0 and 18.0 g.L⁻¹, respectively) had increased lysozyme activity compared to the control saline PBS group 2 days after injection only (LMM post-hoc test, estimate = 1.98 ± 0.65 , p-value = 0.02; estimate = 1.51 ± 0.63 , p-value = 0.05, respectively) (Table 7 and Fig. 31).

In contrast, we did not find any significant effect of the antigen injection on hemolytic and peroxidase activities of fish plasma (LMM, $\chi^2 = 24.4$, p-value = 0.082 and $\chi^2 = 26.6$, p-value = 0.046, respectively), whatever the time (Table 7).

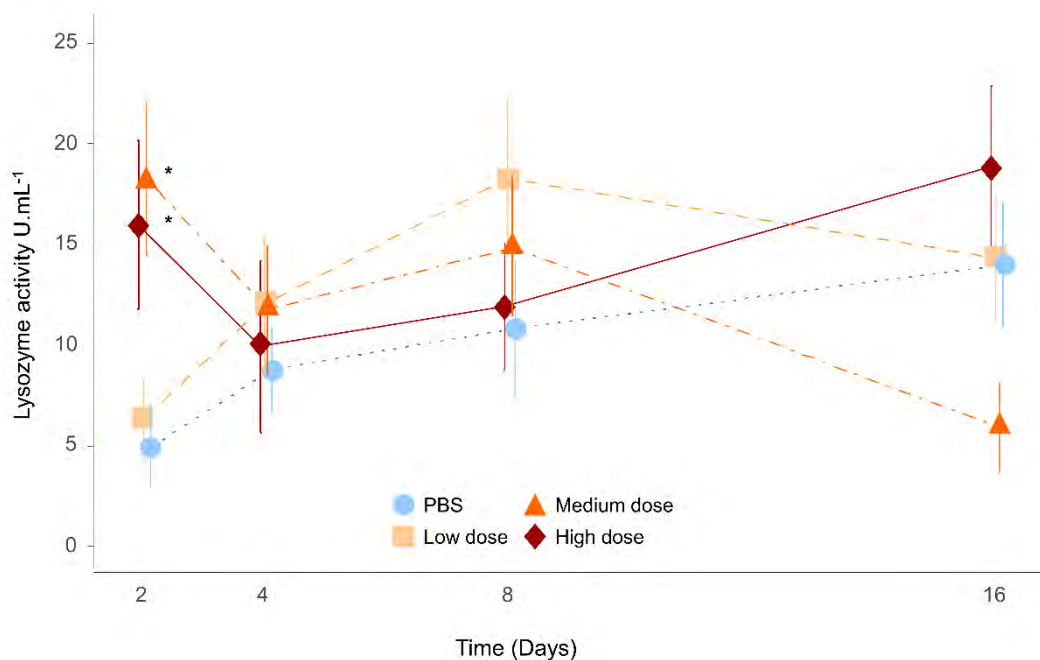


Figure 31. Mean lysozyme activity in the plasma \pm SE (in U.mL⁻¹) of fish in different treatment groups across time (blue circles and dotted line: control-saline group; yellow squares and dashed line: low dose of antigens 4.5 g.L⁻¹; orange triangles and dot-dashed line: medium dose of antigens 9.0 g.L⁻¹; red diamonds and solid line: high dose of antigens 18.0 g.L⁻¹). Stars indicate significant differences between antigen-injected fish and the control-saline group (PBS injected fish, in blue) within each time point.

3.3. CELLULAR LEVEL: LOCAL IMMUNE RESPONSE

Since untreated fish were not injected, we did not measure their local immune response before the experiment. We found that all injected fish displayed a significant local immune response (skin swelling) compared to the control saline PBS group, whatever the concentration of antigen injected and the time (LMM, $\chi^2 = 88.2$, p-value < 0.001, Table 7) except for fish injected with the low dose of antigens (4.5 g.L⁻¹) after eight days of exposure (LMM post-hoc test, estimate = 3.16 ± 2.70 , p-value = 0.24).

3.4. CELLULAR LEVEL: AVAILABLE ENERGY

The amount of available energy (i.e., sum of lipids, proteins, and carbohydrates) in fish muscle increased significantly in all treatment groups compared to the untreated fish (LMM, $\chi^2 = 46.6$, p-value < 0.001, see Table 7) suggesting that the experiment itself increased fish reserves, except in fish injected with medium and high dose of antigens 4 days after antigen injection (LMM post-hoc test, estimate = 835.8 ± 383.1 , p-value = 0.079; estimate = 664 ± 360.9 , p-value = 0.14, respectively) (Table 7). This difference was mainly due to a reduced amount of lipids stored in fish muscle (LMM post-hoc test on lipids separately: medium dose: estimate = 835.8 ± 383.1 , p-value = 0.08; high dose: estimate = 664 ± 360.9 , p-value = 0.14, respectively).

3.5. ORGAN-LEVEL: CONDITIONS INDICES

There was no effect of the injection itself (untreated vs control saline PBS group) nor treatments on the daily mass change (LMM, $\chi^2 = 24.2$, p-value = 0.09) and the SplenoSomatic Index (SSI) of fish (LMM, $\chi^2 = 35.7$, p-value = 0.003, but see non-significant multiple comparison among treatments groups in Table 7), whatever the concentration of antigens and time (Table 7). Regarding the HepatoSomatic Index (HSI), fish injected with control-saline solution and with high doses of antigens had a higher HSI 16 days after injection reflecting a higher amount of energy in the liver (LMM post-hoc test, estimate = 0.53 ± 0.13 , p-value = 0.015; estimate = 0.57 ± 0.14 , p-value = 0.015, respectively).

3.6. INDIVIDUAL-LEVEL: BEHAVIOUR

We did not measure behavioral response before the experiment (untreated fish). In treated fish, we found that antigen injection significantly affected fish general activity (LMM, $\chi^2 = 52.9$, p-value < 0.001). Indeed, at 4 days, fish injected with medium and high dose of antigens decreased their general activity compared to saline-injected fish (LMM post-hoc test, estimate = -1.18 ± 0.43 , p-value = 0.027; estimate = -1.73 ± 0.43 , p-value < 0.001, respectively). Detailed analyses on each separate behavioral trait confirmed that fish injected with high dose had a lower swimming time and explored fewer areas than control-saline fish at 4 days (LMM post-hoc test, estimate = -21.7 ± 6.57 , p-value = 0.01 and estimate = -0.45 ± 0.18 , p-value = 0.05, respectively).

However, fish then increased their activity. Indeed, fish from the low and medium dose groups displayed a higher general activity than control-saline injected fish at 16 days (LMM post-hoc test, estimate = 1.09 ± 0.44 , p-value = 0.04; estimate = 1.43 ± 0.43 , p-value = 0.006, respectively, Table 7, Fig. 32).

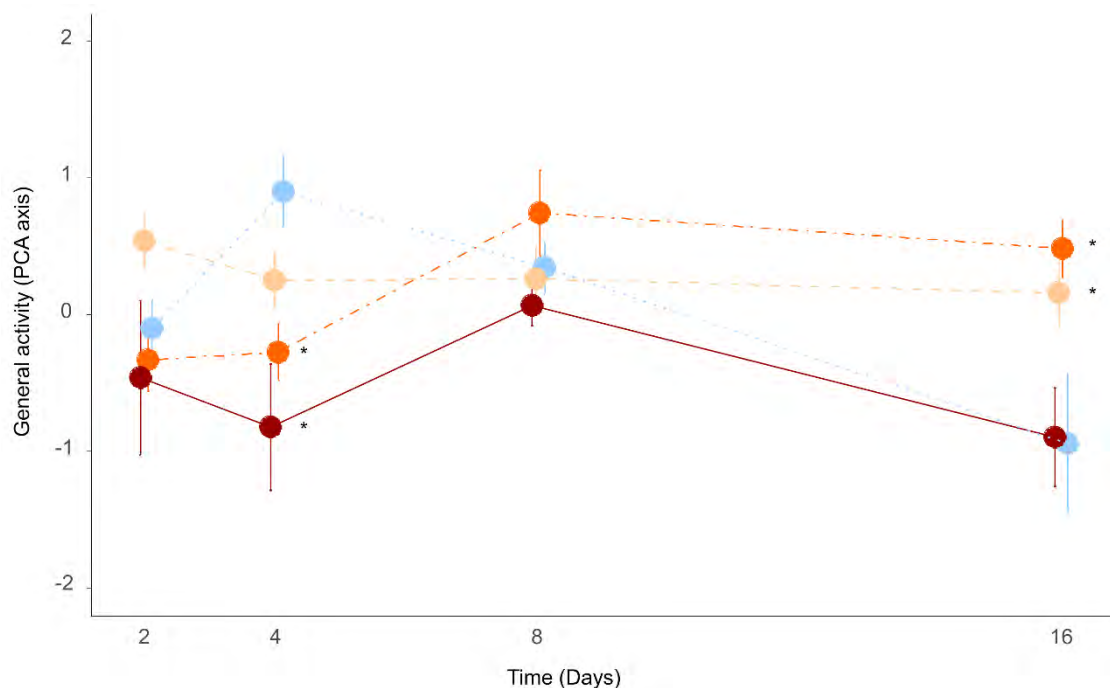


Figure 32. Mean general activity (first PCA axis scores) \pm SE of fish in different treatment groups across time (blue circles and dotted line: control-saline group (PBS); yellow squares and dashed line: low dose of PHA and LPS antigens 4.5 g.L⁻¹; orange triangles and dot-dashed line: medium dose of antigens 9.0 g.L⁻¹; red diamonds and solid line: high dose of antigens 18.0 g.L⁻¹). Error bars represent the standard error. Stars indicate significant differences between the control-saline group and immune-challenged groups within each time point.

Fish sociability (number of encounters between individuals) was also significantly affected by the immune challenges. Indeed, the number of contacts was significantly lower in fish injected with the high dose of antigens eight days after injection compared to saline-injected fish, respectively (LMM post-hoc test, estimate = -0.50 ± 0.17 , p-value = 0.045, Table 7).

4. Discussion

Altogether, our results indicate that different concentrations of antigen mixture induce different effects in fish and that responses were contrasted depending on the biological level considered. Medium and high doses of antigens had the highest effects, notably on immunity, energy reserves and behavior (Table 8), and appeared to be more costly compared to a low dose of antigens. Hence, this suggests that the immune response and the associated costs vary according to the intensity of the immune challenge in a dose-dependent manner. These costs were however, limited since we did not find any significant difference in available energy and fish condition indices (i.e., body and organ mass) between antigen-injected and control-saline fish. In addition, oxidative stress indices were not affected.

Moreover, the type of response varied according to the timing of the immune challenge (Table 8). At the molecular level, the humoral immune response was triggered two days after the immune challenge, while effects at higher biological scales on energy reserves and behavior were delayed at four days. This suggests that an immune challenge rapidly triggers a transitory immune response with potential cascading effects on energy management and behavior without affecting fish body condition nor survival (only four dead fish from the low and high dose treatment groups). Physiological and behavioral changes triggered by the immune challenge might thus enable fish to maintain fish body condition and fitness to cope with pathogen attacks in the wild, although further studies using live pathogens would be needed to test this hypothesis.

Table 8. Summary of the main results

Response traits	Antigens concentration		
	Low Dose (4.5 g.L ⁻¹)	Medium Dose (9.0 g.L ⁻¹)	High Dose (18.0 g.L ⁻¹)
Immunity	Significant local immune response at the cellular level but no humoral response at the molecular level	Significant local (cellular level) and humoral (molecular level: lysozyme) immune response at two days	
Energy reserves	At the cellular level, the amount of available energy in fish muscle increases significantly in all treatment groups compared to untreated fish, except in fish injected with a medium and high dose of antigens at 4 days. At higher biological levels, few effects were detected on condition indices		
Behavior	Fish activity increases at 16 days	Fish activity first decreases at 4 days and then increases at 16 days	Fish activity decreases at 4 days Fish sociability (contacts) decreases at 4 days

4.1. EFFECTS OF IMMUNE CHALLENGE ON FISH IMMUNITY

The immune challenge had different effects on fish immune traits depending on the concentration of antigens injected. At the molecular level, results were contrasted. We did not find any effect of antigen injection on hemolytic and peroxidase activities. This suggests that the immune challenge did not trigger the expected systemic immune response and/or that the hemolytic activity (i.e., activation of the complement system) was altered by coagulation in fish plasma (Bexborn et al., 2009; Markiewski et al., 2007). Accordingly, lysozyme activity rapidly increased in fish injected with the medium and high doses of antigens but the response did not last longer than two days, which contrasts with previous studies reporting longer responses (Bich Hang et al., 2013; Nayak et al., 2008; Paulsen et al., 2003). These discrepancies might be explained by interspecific variability in antiparasitic defenses among fish species as shown in previous studies (Fänge et al., 1976; Grinde et al., 1988; Saurabh and Sahoo, 2008). Accordingly, in our study, gudgeons fish exhibited lower lysozyme activity than other freshwater fish species such as the common carp (*Cyprinus carpio*) (Xu et al., 2019) and the striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) (Bich Hang et al., 2013).

On the contrary, at the cellular level, the local immune response (i.e., skin swelling) increased significantly in all injected fish, whatever the antigen concentration.

This result is consistent with the effects of both LPS and PHA on local immune response (Ardia and Clotfelter, 2006; O'Connor et al., 2014; Otálora-Ardila et al., 2016; Tella et al., 2008), which is due to the local infiltration of neutrophils, macrophages, and lymphocytes and more broadly local inflammation (Ardia and Clotfelter, 2006). This shows that the immune challenge was efficient to trigger a significant immune response, and that skin swelling might be a reliable and rapid measure of immune activation in fish.

In summary, our results show that the experimental immune challenge was efficient in triggering a significant immune response. Indeed, the immune challenge was mainly detected in the short term (i.e., only at two days) in the circulating plasma and for a more long-lasting period at the local level (i.e., skin swelling). These results suggest the set up of a non-specific inflammatory response, involving the local recruitment of neutrophils and macrophages at the location of antigen injection (Afonso et al., 1998; von Gersdorff Jørgensen, 2016). Interestingly, such short-term inflammation is usually costly and could potentially affect other traits related to energy management in fish, as investigated below.

4.2. EFFECTS OF IMMUNE CHALLENGE ON FISH ENERGY RESERVES

Contrary to expectations, the available energy in muscle did not decrease in fish injected with antigens mixture compared to the control-saline group. Indeed, energy reserves (mostly lipids) deposited in fish muscle increased in all fish involved in the experiment compared to untreated ($T = 0$) fish, except in fish injected with medium and high doses of antigens at four days. This suggests that artificial feeding in captivity induces rapid storage of energy reserves in muscle, but that fish injected with the highest antigens concentrations had lower storage of energy (particularly lipids) in their muscle. This result is consistent with previous studies indicating that immune challenges increase metabolic activity and immunity at the expense of energy reserves in various vertebrate species (Bonneaud et al., 2003; Cabrera-Martínez et al., 2018; King and Swanson, 2013). Indeed, the inflammatory response is particularly costly because it triggers the secretion of several cytokines (e.g., TNF α) involved in the remobilization of fatty acids to produce lipoproteins to fight pathogens and to fuel the immune response (Grunfeld and Feingold, 1992; Johansen et al., 2006).

However, we likely underestimated these costs in captivity because captive fish likely increased food consumption to cover the costs of immunity, resulting in limited changes in body condition indices and survival. Accordingly, in our study, the hepatosomatic index and the body mass were not significantly affected by the immune challenge, contrary to other studies (Bonneaud et al., 2016; Johansen et al., 2006). In addition, the immune challenge had no effects on the oxidative stress index measured in our study, whatever the concentration of antigens injected. This confirms that the potential increase of metabolic activity and inflammatory response had no visible deleterious effects on oxidative stress and thus limited expected cellular damage when food is abundant (Cherry and Piantadosi, 2015; Costantini and Dell’Omo, 2006; Costantini and Møller, 2009), although detailed studies on more specific oxidative markers would be necessary to confirm this hypothesis.

In summary, our results suggest that fish have the ability to manage the short-term costs of the immune challenges without strong depletion of energy reserves nor oxidative damage, likely due to the increased food availability and consumption in captivity that could enable fish to cover the costs of immunity. However, this hypothesis needs to be tested by controlling the food supply individually during exposure. In the wild, immune challenges might have more deleterious consequences for fish if food accessibility is limited, especially if the behavior is also affected by immune challenges, with potential consequences for fish ability to forage (Dantzer, 2004; Exton, 1997; Volkoff and Peter, 2004).

4.3. EFFECTS OF IMMUNE CHALLENGE ON FISH BEHAVIOUR

Fish injected with the medium and high antigen doses decreased their activity after four days. This is consistent with the expected increase in energetic demand for the immune response (Kirsten et al., 2018). However, at the lowest antigen concentration, fish activity was not affected by the immune challenge, which suggests a dose-dependent effect of antigens on fish behavior. This supports that immune challenge with medium and high doses of antigens increases immunity at the expense of activity, which is a classical sickness behavior allowing fish to save energy for immunity (Dantzer, 2004; Johnson, 2002; Kirsten et al., 2018). However, a potential side effect is that less active fish could be less able to find food (Dantzer, 2004; Johnson, 2002; Volkoff and Peter, 2004), which could explain the transient reduction of available energy stored (i.e., at

four days) in the muscle of antigen-injected fish (Volkoff and Peter, 2004). Interestingly, the reduction of activity and exploration was then followed by an enhanced activity at 16 days, which could help to offset the cost of the immune response by increasing foraging and food consumption in the long term, but this hypothesis remains to be formally tested.

We also found a decreased sociability (i.e., contact between individuals) in fish injected with the high dose of antigen at four days according to previous studies (Dugatkin et al., 1994; Kirsten et al., 2018). Such behavioral alterations could be part of the sickness behavior and could reduce pathogen spread (i.e., “behavioral resistance”) among conspecifics in the wild (Barber et al., 2000), but could also have side effects on the ability of fish to find food efficiently (Pitcher et al., 1982) or escape predator in the wild (Ward et al., 2011).

In summary, our results suggest that in the short term behavioral adjustments involved in the sickness behavior might allow energy reallocation from behavior (e.g., activity, exploration, sociability) to immunity (e.g., macrophages, natural killer and T cells) (Dantzer, 2004; Exton, 1997). In addition, we showed that a low dose of antigens had limited adverse effects on behavior, while high concentrations of antigens decreased activity and sociability, probably due to the high energy demand for immunity. Such energy reallocation could potentially have detrimental effects on fish ability to find food and hence amplify the energetic costs of immune challenges, but this remains to be formally tested. Although behavioral assay under laboratory condition may not reflect real behavior in the wild (Calisi and Bentley, 2009), our study shows a dose-dependent effect of immune challenges which could result in contrasting effects on fish ability to acquire resources but also to escape from predators, with consequences for fish fitness. Further studies investigating physiological and behavioral changes induced by an immune challenge in a more realistic context are thus needed (e.g., infection by parasites under different environmental conditions) to infer potential cascading effects on fish fitness in the wild.

5. Conclusion

Immune challenges triggered a significant non-specific immune response at the local cellular level and, to a lesser extent on circulating immunity (i.e., lysozyme activity) but with high differences depending on the intensity of the immune challenge. Contrary to our expectations, we found limited evidence for oxidative stress or depletion in energy reserves in different organs, likely due to increased feeding in captivity. Interestingly, the immune challenge triggered behavioral changes such as a transient reduction in activity and sociability depending on the dose injected, which likely allowed to save energy for immunity but might have detrimental consequences for fish foraging ability, mating, or vulnerability to predators. Further research in a more realistic biotic context with parasites and predators is now needed to better understand the consequences of immune challenges on fish fitness in human-altered rivers.

Compliance with ethical standards

Experimental procedures were conducted under the establishment approval for vertebrate experimentation N°A3113002 and were endorsed by the ethical committee n°073 (authorization n°8538) as stated in the French and European legislation for animal experimentation (European directive 2010/63/UE).

Acknowledgements

We thank anonymous reviewers for relevant suggestions and corrections. The authors are grateful to Sandrine Papillon, Corinne Pautot, Alexianne Damien, Cyprian Kauffman, the technical service of INP ENSAT for technical assistance and to Patrice Couture, Stéphane Bétouille and Christel Lefrançois for useful advice. This work was financially supported by the water agency Adour-Garonne (Agence de l'Eau Adour-Garonne AEAG) and the CNRS french national program EC2CO-Ecodyn (PHYPAT project). QP was supported by doctoral grants of the French Ministry of Higher Education and Research. The EDB laboratory is part of the French Laboratory of Excellence "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest

References

- Adelman, J.S., Martin, L.B., 2009. Vertebrate sickness behaviors: Adaptive and integrated neuroendocrine immune responses. *Integr. Comp. Biol.* 49, 202–214. <https://doi.org/10.1093/icb/icp028>
- Adlard, R.D., Miller, T.L., Smit, N.J., 2015. The butterfly effect: parasite diversity, environment, and emerging disease in aquatic wildlife. *Trends Parasitol.* 31, 160–166. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.11.001>
- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A.E., Silva, M.T., 1998. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis. Aquat. Organ.* 34, 27–37. <https://doi.org/10.3354/dao034027>
- Alberti, A., Bolognini, L., Macciantelli, D., Caratelli, M., 2000. The radical cation of N, N-diethyl-para-phenylendiamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res. Chem. Intermed.* 26, 253–267. <https://doi.org/10.1163/156856700X00769>
- Alexander, J.B., Ingram, G.A., 1992. Noncellular non-specific defence mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 249–279. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90066-7](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90066-7)
- Ardia, D.R., Clotfelter, E.D., 2006. The novel application of an immunological technique reveals the immunosuppressive effect of phytoestrogens in *Betta splendens*. *J. Fish Biol.* 68, 144–149. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.00962.x>
- Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., Marino, G., 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.049>
- Bakke, T.A., Cable, J., Harris, P.D., 2007. The Biology of Gyrodactylid Monogeneans: The “Russian-Doll Killers,” in: *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp. 161–460. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64003-7)
- Barber, I., Hoare, D., Krause, J., 2000. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 131–165. <https://doi.org/10.1023/A:1016658224470>
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R.H.B., Singmann, H., Dai, B., Grothendieck, G., 2015. Package ‘lme4.’ *Convergence* 12.
- Behringer, D.C., Karvonen, A., Bojko, J., 2018. Parasite avoidance behaviours in aquatic environments. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373, 20170202. <https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0202>
- Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>

- Bexborn, F., Engberg, A.E., Sandholm, K., Mollnes, T.E., Hong, J., Ekdahl, K.N., 2009. Hirudin versus heparin for use in whole blood in vitro biocompatibility models. *J. Biomed. Mater. Res. A* 89A, 951–959. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32034>
- Bich Hang, B.T., Milla, S., Gillardin, V., Phuong, N.T., Kestemont, P., 2013. In vivo effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide on regulation of immune response and protein expression in striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Fish Shellfish Immunol.* 34, 339–347. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.11.025>
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G., 2003. Assessing the Cost of Mounting an Immune Response. *Am. Nat.* 161, 367–379. <https://doi.org/10.1086/346134>
- Bonneaud, C., Wilson, R.S., Seebacher, F., 2016. Immune-challenged fish up-regulate their metabolic scope to support locomotion. *PloS One* 11, e0166028. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166028>
- Buchmann, K., Lindenstrøm, T., 2002. Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int. J. Parasitol.* 32, 309–319. [https://doi.org/10.1016/s0020-7519\(01\)00332-0](https://doi.org/10.1016/s0020-7519(01)00332-0)
- Cabrera-Martínez, L.V., Herrera M., L.G., Cruz-Neto, A.P., 2018. The energetic cost of mounting an immune response for Pallas's long-tongued bat (*Glossophaga soricina*). *PeerJ* 6, e4627. <https://doi.org/10.7717/peerj.4627>
- Calfee, R.D., Puglis, H.J., Little, E.E., Brumbaugh, W.G., Mebane, C.A., 2016. Quantifying Fish Swimming Behavior in Response to Acute Exposure of Aqueous Copper Using Computer Assisted Video and Digital Image Analysis. *J. Vis. Exp.* <https://doi.org/10.3791/53477>
- Calisi, R.M., Bentley, G.E., 2009. Lab and field experiments: Are they the same animal? *Horm. Behav.* 56, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.010>
- Cha, S.-H., Lee, J.-S., Song, C.-B., Lee, K.-J., Jeon, Y.-J., 2008. Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 278, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2008.01.025>
- Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y., 1995. Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J. Fish Biol.* 47, 775–787. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1995.tb06002.x>
- Cherry, A.D., Piantadosi, C.A., 2015. Regulation of Mitochondrial Biogenesis and Its Intersection with Inflammatory Responses. *Antioxid. Redox Signal.* 22, 965–976. <https://doi.org/10.1089/ars.2014.6200>
- Colchen, T., Teletchea, F., Fontaine, P., Pasquet, A., 2016. Temperature modifies activity, inter-individual relationships and group structure in fish. *Curr. Zool.* zow048. <https://doi.org/10.1093/cz/zow048>

Combes, C., 2001. Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions. University of Chicago Press.

Costantini, D., Dell’Omo, G., 2006. Effects of T-cell-mediated immune response on avian oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.002>

Costantini, D., Møller, A.P., 2009. Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 153, 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.010>

Dantzer, R., 2004. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.040>

De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 43–55. <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>

Dudgeon, D., Arthington, A.H., Gessner, M.O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D.J., Lévêque, C., Naiman, R.J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M.L.J., Sullivan, C.A., 2006. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81, 163. <https://doi.org/10.1017/S1464793105006950>

Dugatkin, L.A., FitzGerald, G.J., Lavoie, J., 1994. Juvenile three-spined sticklebacks avoid parasitized conspecifics. *Environ. Biol. Fishes* 39, 215–218. <https://doi.org/10.1007/BF00004940>

Ellis, A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria.

Exton, M.S., 1997. Infection-induced anorexia: active host defence strategy. *Appetite* 29, 369–383. <https://doi.org/10.1006/appe.1997.0116>

Fänge, R., Lundblad, G., Lind, J., 1976. Lysozyme and chitinase in blood and lymphomyeloid tissues of marine fish. *Mar. Biol.* 36, 277–282. <https://doi.org/10.1007/BF00389289>

Filiano, A.J., Xu, Y., Tustison, N.J., Marsh, R.L., Baker, W., Smirnov, I., Overall, C.C., Gadani, S.P., Turner, S.D., Weng, Z., Peerzade, S.N., Chen, H., Lee, K.S., Scott, M.M., Beenhakker, M.P., Litvak, V., Kipnis, J., 2016. Unexpected role of interferon- γ in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature* 535, 425–429. <https://doi.org/10.1038/nature18626>

Finkel, T., Holbrook, N.J., 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>

Flammarion, P., Migeon, B., Urios, S., Morfin, P., Garric, J., 1998. Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.* 42, 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00046-0)

- Friard, O., Gamba, M., 2016. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol. Evol.* 7, 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
- Gandar, A., Jean, S., Canal, J., Marty-Gasset, N., Gilbert, F., Laffaille, P., 2016. Multistress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3184–3194. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5147-6>
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., Gress, L., Mormède, P., Tapie, N., Budzinski, H., Jean, S., 2017. Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 188, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.089>
- Geffroy, B., Bru, N., Dossou-Gbété, S., Tentelier, C., Bardonnnet, A., 2014. The link between social network density and rank-order consistency of aggressiveness in juvenile eels. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 68, 1073–1083. <https://doi.org/10.1007/s00265-014-1719-6>
- Gomes, S., Scott-Fordsmand, J., Amorim, M., 2015. Cellular Energy Allocation to Assess the Impact of Nanomaterials on Soil Invertebrates (Enchytraeids): The Effect of Cu and Ag. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12, 6858–6878. <https://doi.org/10.3390/ijerph120606858>
- Grinde, B., Lie, Ø., Poppe, T., Salte, R., 1988. Species and individual variation in lysozyme activity in fish of interest in aquaculture. *Aquaculture* 68, 299–304. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(88\)90243-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(88)90243-8)
- Grunfeld, C., Feingold, K.R., 1992. Tumor necrosis factor, interleukin, and interferon induced changes in lipid metabolism as part of host defense. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* N 200, 224–227. <https://doi.org/10.3181/00379727-200-43424>
- Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Martínez, S., Martínez-Sánchez, M.J., Pérez-Sirvent, C., Esteban, M.A., 2013. Accumulation, histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.011>
- Herborn, K.A., Coffey, J., Larcombe, S.D., Alexander, L., Arnold, K.E., 2011. Oxidative profile varies with personality in European greenfinches. *J. Exp. Biol.* 214, 1732–1739. <https://doi.org/10.1242/jeb.051383>
- Hoogenboom, M.O., Metcalfe, N.B., Groothuis, T.G.G., de Vries, B., Costantini, D., 2012. Relationship between oxidative stress and circulating testosterone and cortisol in pre-spawning female brown trout. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 163, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.07.002>
- Isaksson, C., 2013. Opposing effects on glutathione and reactive oxygen metabolites of sex, habitat, and spring date, but no effect of increased breeding density in great tits (*Parus major*). *Ecol. Evol.* 3, 2730–2738. <https://doi.org/10.1002/ece3.663>

- Jacquin, L., Dybwad, C., Rolshausen, G., Hendry, A.P., Reader, S.M., 2017. Evolutionary and immediate effects of crude-oil pollution: depression of exploratory behaviour across populations of Trinidadian guppies. *Anim. Cogn.* 20, 97–108. <https://doi.org/10.1007/s10071-016-1027-9>
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J., 2002. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65, 166–176. <https://doi.org/10.1093/toxsci/65.2.166>
- Johansen, K.A., Sealey, W.M., Overturf, K., 2006. The effects of chronic immune stimulation on muscle growth in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 144, 520–531. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.05.006>
- Johnson, R.W., 2002. The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 443–450. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00069-7)
- Jolly, S., Jaffal, A., Delahaut, L., Palluel, O., Porcher, J.-M., Geffard, A., Sanchez, W., Betoulle, S., 2014. Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13103–13117. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3227-7>
- Keith, P., Persat, H., Feunteun, E., Allardi, J., 2011. Les Poissons d'eau douce de France., Biotope. ed, Inventaires & biodiversité. Paris, France.
- Kestemont, P.P., Van Driessche, I., Mélard, C., 1991. Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio*, L.: 3. Maturation des gonades sous regimes thermiques ovulatoire et sub-ovulatoire. *J. Appl. Ichthyol.* 7, 205–216. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1991.tb00598.x>
- King, M.O., Swanson, D.L., 2013. Activation of the immune system incurs energetic costs but has no effect on the thermogenic performance of house sparrows during acute cold challenge. *J. Exp. Biol.* 216, 2097–2102. <https://doi.org/10.1242/jeb.079574>
- Kirsten, K., Soares, S.M., Koakoski, G., Carlos Kreutz, L., Barcellos, L.J.G., 2018. Characterization of sickness behavior in zebrafish. *Brain. Behav. Immun.* 73, 596–602. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2018.07.004>
- Krkošek, M., Ford, J.S., Morton, A., Lele, S., Myers, R.A., Lewis, M.A., 2007. Declining Wild Salmon Populations in Relation to Parasites from Farm Salmon. *Science* 318, 1772–1775. <https://doi.org/10.1126/science.1148744>
- Kumari, J., Sahoo, P., 2005. Effects of cyclophosphamide on the immune system and disease resistance of Asian catfish. *Fish Shellfish Immunol.* 19, 307–316. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2005.01.008>
- Langston, A.L., Johnstone, R., Ellis, A.E., 2001. The kinetics of the hypoferraemic response and changes in levels of alternative complement activity in diploid and triploid Atlantic salmon, following injection of lipopolysaccharide. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 333–345. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0319>

Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Floriani, M., Turies, C., Chadili, E., Vedova, C.D., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.-M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25, 1478–1499. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1699-6>

Lenth, R., Love, J., Hervé, M., 2017. Package ‘emmeans.’ *Underst Stat* 34, 216–21.

Lochmiller, R.L., Deerenberg, C., 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88, 87–98. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x>

Loot, G., Reyjol, Y., Poulet, N., Simkova, A., Blanchet, S., Lek, S., 2007. Effects of small weirs on fish parasite communities. *Parasitol. Res.* 101, 1265–1276. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0632-6>

Lopez-Luna, J., Al-Jubouri, Q., Al-Nuaimy, W., Sneddon, L.U., 2017. Impact of stress, fear and anxiety on the nociceptive responses of larval zebrafish. *PLOS ONE* 12, e0181010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181010>

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

Magnadóttir, B., 2000. The spontaneous haemolytic activity of cod serum: Heat insensitivity and other characteristics. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 731–735. <https://doi.org/10.1006/fsim.2000.0290>

Markiewski, M.M., Nilsson, B., Nilsson Ekdahl, K., Mollnes, T.E., Lambris, J.D., 2007. Complement and coagulation: strangers or partners in crime? *Trends Immunol.* 28, 184–192. <https://doi.org/10.1016/j.it.2007.02.006>

Martin, L.B., Han, P., Lewittes, J., Kuhlman, J.R., Klasing, K.C., Wikelski, M., 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Funct. Ecol.* 20, 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2006.01094.x>

Maule, A.G., Schreck, C.B., 1990. Changes in Numbers of Leukocytes in Immune Organs of Juvenile Coho Salmon after Acute Stress or Cortisol Treatment. *J. Aquat. Anim. Health* 2, 298–304. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(1990\)002<0298:CINOLI>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8667(1990)002<0298:CINOLI>2.3.CO;2)

Nayak, S.K., Swain, P., Nanda, P.K., Dash, S., Shukla, S., Meher, P.K., Maiti, N.K., 2008. Effect of endotoxin on the immunity of Indian major carp, *Labeo rohita*. *Fish Shellfish Immunol.* 24, 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2007.09.005>

Nilsson, S., 1983. *Autonomic Nerve Function in the Vertebrates*, Zoophysiology. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

O’Connor, C.M., Reddon, A.R., Marsh-Rollo, S.E., Hellmann, J.K., Ligocki, I.Y., Hamilton, I.M., Balshine, S., 2014. A comparative study of an innate immune response

in Lamprologine cichlid fishes. *Naturwissenschaften* 101, 839–849. <https://doi.org/10.1007/s00114-014-1225-8>

Okamura, B., Hartikainen, H., Schmidt-Posthaus, H., Wahli, T., 2011. Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease: PKD as an emerging disease of salmonid fish. *Freshw. Biol.* 56, 735–753. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2010.02465.x>

Otálora-Ardila, A., Flores-Martínez, J.J., Welch Jr, K.C., 2016. Metabolic cost of the activation of immune response in the fish-eating myotis (*Myotis vivesi*): the effects of inflammation and the acute phase response. *PloS One* 11, e0164938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164938>

Paladini, G., Hansen, H., Williams, C.F., Taylor, N.G., Rubio-Mejía, O.L., Denholm, S.J., Hytterød, S., Bron, J.E., Shinn, A.P., 2014. Reservoir hosts for *Gyrodactylus salaris* may play a more significant role in epidemics than previously thought. *Parasit. Vectors* 7. <https://doi.org/10.1186/s13071-014-0576-5>

Paulsen, S.M., Lunde, H., Engstad, R.E., Robertsen, B., 2003. In vivo effects of β -glucan and LPS on regulation of lysozyme activity and mRNA expression in Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.). *Fish Shellfish Immunol.* 14, 39–54. <https://doi.org/10.1006/fsim.2002.0416>

Pearson, M.P., Stevens, E.D., 1991. Size and hematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol. Biochem.* 9, 39–50. <https://doi.org/10.1007/BF01987610>

Pitcher, T.J. (Ed.), 1986. *The Behaviour of Teleost Fishes*. Springer US, Boston, MA. <https://doi.org/10.1007/978-1-4684-8261-4>

Pitcher, T.J., Magurran, A.E., Winfield, I.J., 1982. Fish in Larger Shoals Find Food Faster. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 10, 149–151. <https://doi.org/10.1007/BF00300175>

Preynat-Seauve, O., Coudurier, S., Favier, A., Marche, P.-N., Villiers, C., 2003. Oxidative stress impairs intracellular events involved in antigen processing and presentation to T cells. *Cell Stress Chaperones* 8, 162. [https://doi.org/10.1379/1466-1268\(2003\)008<0162:osiiei>2.0.co;2](https://doi.org/10.1379/1466-1268(2003)008<0162:osiiei>2.0.co;2)

Quade, M.J., Roth, J.A., 1997. A rapid, direct assay to measure degranulation of bovine neutrophil primary granules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 58, 239–248. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(97\)00048-2](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(97)00048-2)

Rauw, W.M., 2012. Immune response from a resource allocation perspective. *Front. Genet.* 3. <https://doi.org/10.3389/fgene.2012.00267>

Rodríguez, A., Esteban, M.Á., Meseguer, J., 2003. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata*, L.) leucocytes in response to yeast cells: Phagocytosis and Peroxidase Release in Seabream. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* 272A, 415–423. <https://doi.org/10.1002/ar.a.10048>

Sakai, D.K., 1992. Repertoire of complement in immunological defense mechanisms of fish. *Annu. Rev. Fish Dis.* 2, 223–247. [https://doi.org/10.1016/0959-8030\(92\)90065-6](https://doi.org/10.1016/0959-8030(92)90065-6)

Saurabh, S., Sahoo, P.K., 2008. Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquac. Res.* 39, 223–239. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2007.01883.x>

Sheldon, B.C., Verhulst, S., 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11, 317–321. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10039-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10039-2)

Sterud, E., Forseth, T., Ugedal, O., Poppe, T., Jørgensen, A., Bruheim, T., Fjeldstad, H., Mo, T., 2007. Severe mortality in wild Atlantic salmon *Salmo salar* due to proliferative kidney disease (PKD) caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa). *Dis. Aquat. Organ.* 77, 191–198. <https://doi.org/10.3354/dao01846>

Stott, B., Elsdon, J.W.V., Johnston, J.A.A., 1963. Homing behaviour in gudgeon (*Gobio gobio*, L.). *Anim. Behav.* 11, 93–96. [https://doi.org/10.1016/0003-3472\(63\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0003-3472(63)90015-0)

Swain, P., Nayak, S., Nanda, P., Dash, S., 2008. Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 191–201. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2008.04.009>

Tella, J.L., Lemus, J.A., Carrete, M., Blanco, G., 2008. The PHA Test Reflects Acquired T-Cell Mediated Immunocompetence in Birds. *PLoS ONE* 3, e3295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003295>

Uribe, C., Folch, H., Enríquez, R., Moran, G., 2011. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Vet. Med. (Praha)* 56, 486–503.

Volkoff, H., Peter, R.E., 2004. Effects of lipopolysaccharide treatment on feeding of goldfish: role of appetite-regulating peptides. *Brain Res.* 998, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.11.011>

von Gersdorff Jørgensen, L., 2016. The dynamics of neutrophils in zebrafish (*Danio rerio*) during infection with the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 55, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.026>

Wang, X., Wang, L., Yao, C., Qiu, L., Zhang, H., Zhi, Z., Song, L., 2012. Alternation of immune parameters and cellular energy allocation of *Chlamys farreri* under ammonia-N exposure and *Vibrio anguillarum* challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 741–749. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2012.01.025>

Ward, A.J.W., Herbert-Read, J.E., Sumpter, D.J.T., Krause, J., 2011. Fast and accurate decisions through collective vigilance in fish shoals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2312–2315. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007102108>

Wedemeyer, G., Ross, A.J., Smith, L., 1969. Some metabolic effects of bacterial endotoxins in salmonid fishes. *J. Fish. Board Can.* 26, 115–122. <https://doi.org/10.1139/f69-010>

Wong, B.B.M., Candolin, U., 2015. Behavioral responses to changing environments. *Behav. Ecol.* 26, 665–673. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru183>

Xu, M., Wang, T., Wang, J., Wan, W., Wang, Z., Guan, D., Sun, H., 2019. An evaluation of mixed plant protein in the diet of Yellow River carp (*Cyprinus carpio*): growth, body composition, biochemical parameters, and growth hormone/insulin-like growth factor 1. *Fish Physiol. Biochem.* 45, 1331–1342. <https://doi.org/10.1007/s10695-019-00641-6>

Zhao, J., Bi, W., Xiao, S., Lan, X., Cheng, X., Zhang, J., Lu, D., Wei, W., Wang, Y., Li, H., Fu, Y., Zhu, L., 2019. Neuroinflammation induced by lipopolysaccharide causes cognitive impairment in mice. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42286-8>

Supporting materials

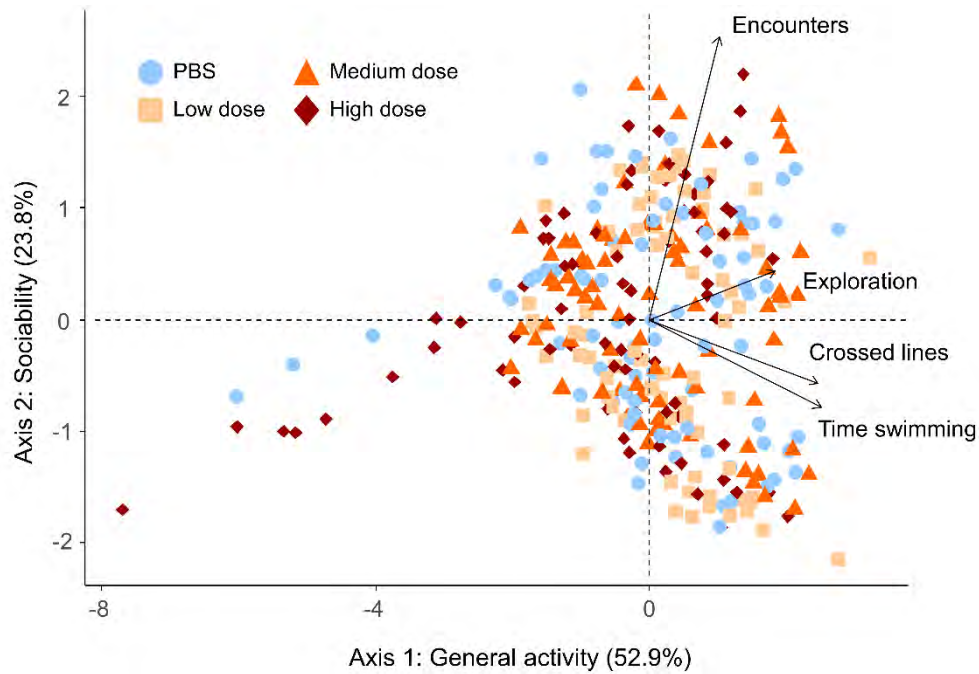



Figure S3. PCA of the behavior of fish exposed to three doses of antigen mixture (Control: blue circles, low: yellow squares, medium: orange triangles and high: red diamonds), each points represents an individual. Axis 1 mostly represents the activity of fish (time swimming, crossed lines, and exploration). Axis 2 mostly represents the sociability of fish (Number encounter or contacts between individuals).



CHAPITRE 5

COMBINED EFFECTS OF TEMPERATURE AND IMMUNE CHALLENGE IN GUDGEON POPULATIONS



Résumé du chapitre

Dans un contexte de changements globaux, l'augmentation concomitante de la température de l'eau et des pics d'infection par les parasites peut avoir des effets inattendus sur l'état de santé des poissons. En effet, comme présenté dans les chapitres précédents (chapitres 3 et 4), les parasites, et plus généralement le challenge immunitaire qu'ils induisent, entraînent le déclenchement d'une réponse immunitaire susceptible d'affecter d'autres traits physiologiques (i.e. réserves énergétiques, stress oxydant) ainsi que le comportement des poissons (Cable et al., 2017; Macnab and Barber, 2012). Ces facteurs de stress sont fortement susceptibles d'interagir dans le milieu naturel, mais leurs effets combinés sont peu décrits. De plus, l'origine des populations de poissons peut conditionner leurs réponses face à une augmentation de la température (Dittmar et al., 2014).

Au vu de la littérature et des résultats obtenus dans le cadre des chapitres précédents, nous avons émis **l'hypothèse** que les expositions aux facteurs de **stress simples**, mèneraient à la mise en place d'une **stratégie de compensation (i.e. réallocation énergétique)** permettant aux poissons de mettre en place une réponse au stress efficace avec des effets limités sur leur survie. Au contraire, sous **stress multiples**, des **effets interactifs complexes** sont attendus. Dans le cadre de la mise en place d'une **stratégie de conservation** des effets antagonistes sont attendus sur les réponses immunitaires, de la production de stress oxydant, de la mobilisation des réserves énergétiques ainsi que sur le comportement des individus. De plus, nous nous attendions à une **forte variabilité de réponse entre populations de poissons**. Les populations provenant d'un site d'étude plus chaud pourraient en effet développer des capacités leur permettant de faire face à ce même facteur de stress ultérieurement. A l'inverse, la mise en place de tel ajustements pourraient être coûteux et ces populations pourraient être plus vulnérables à de nouveaux facteurs de stress ou à une exposition combinée.

Afin de tester ces hypothèses, 2 populations de goujons sauvages (*Gobio occitaniae*) ont été échantillonnées, dans le bassin versant de la Garonne, sur des sites contrastés en termes de régime thermique (site chaud et site froid). De retour au laboratoire, et après une période

d'acclimatation, les poissons ont été exposés à 2 traitements de température (contrôle/froid : 17°C vs chaud : 24°C), et 2 traitements d'injection (contrôle : solution saline vs challenge immunitaire : mélange de deux antigènes) en suivant un **plan factoriel complet**. Afin de caractériser la réponse au stress, plusieurs traits ont été mesurés à différentes échelles d'organisation biologique, des molécules (i.e. dommage génotoxique, stress oxydant et réserves énergétiques dans les muscles) aux individus (i.e. perte de masse, indices de Fulton, hépato- et gonado-somatiques, comportement).

Les résultats obtenus indiquent que les stress simples ont eu peu d'effets sur les traits aux échelles moléculaires et cellulaires. Cependant, à l'échelle individuelle, ils induisaient une réduction de la condition des poissons, mais une bonne survie, en accord avec une stratégie de compensation. La combinaison de température et d'un challenge immunitaire avaient des effets uniquement à l'échelle individuelle. Premièrement, le challenge immunitaire inhibait l'effet stimulant de la température sur le comportement des poissons (i.e. effet antagoniste). De plus, le challenge immunitaire amplifiait l'effet négatif de la température sur la survie des individus (i.e. effet synergique). De façon intéressante, les réponses comportementales au challenge immunitaire variaient fortement entre les deux populations mais pas avec la température. Ce résultat suggère que les populations ont des stratégies comportementales différentes. Cependant d'autres investigations sont nécessaires, notamment via le suivi d'un plus grand nombre de populations afin de comprendre les mécanismes sous-jacents.

En résumé, les stress simples (i.e. température ou injection seule) semblent provoquer la mise en place d'une stratégie de compensation de l'énergie chez les poissons. Au contraire, les stress multiples semblent plutôt provoquer la mise en place d'une stratégie de conservation, inhibant ainsi la réponse comportementale et entraînant une réduction importante de la survie. Cependant, nos résultats ne soutiennent que partiellement cette hypothèse puisque dans notre étude aucun effet interactif n'a été constaté sur les réponses physiologiques des poissons. Comme dans le chapitre précédent, cette étude souligne l'intérêt de prendre en compte les parasites en tant que facteurs de stress biotiques qui peuvent moduler l'effet de la température sur les poissons. Cependant plus d'études sont nécessaires afin de caractériser les mécanismes sous-jacents. De plus, nos résultats soulignent la variabilité de réponses qu'il peut exister entre populations, ce qui confirme l'intérêt de tenir compte de cette variabilité pour mieux anticiper les effets des stress sur les populations sauvages.

Combined effects of temperature and immune challenge in gudgeon populations

Quentin Petitjean^{1,2}, Séverine Jean¹, Jessica Côte², Amaïa Lamarins², Marie Lefranc³, Raphaël Santos³, Annie Perrault¹, Pascal Laffaille¹, Lisa Jacquin²

¹ *Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR5245 Ecolab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.*

² *Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR5174 EDB, Université de Toulouse, CNRS, IRD, UPS, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.*

³ *HEPIA, University of Applied Sciences Western Switzerland, Ecology and Engineering of Aquatic Systems Research Group, 150 Route de Presinge, CH-1254 Jussy, Switzerland*

ABSTRACT

In the context of global changes, aquatic ecosystems are increasingly exposed to multiple stressors that can have unexpected interactive effects on aquatic organisms. Among these stressors, the occurrence of heat waves and pathogens is changing rapidly in freshwater rivers, but their combined effects on fish health are still understudied. In this study, we experimentally tested the crossed effects of increased temperature (mimicking a heat wave) and a standardized immune challenge (mimicking a parasite attack) on wild gudgeon (*Gobio occitaniae*) physiology and behaviour across biological levels, from molecules to the whole individual. We also investigated the potential variation of sensitivity among populations by comparing two wild populations from contrasted thermal regimes. Combined stressors (i.e. temperature increase and immune challenge) had contrasted effects on fish physiology and behaviour compared to single stressors, but only at the individual level. In particular, the immune challenge inhibited the effect of the temperature on fish behaviour (activity, exploration and foraging) but amplified the negative effect of temperature on fish survival. No interactions were found at other biological levels. This study thus shows that it is essential to consider biotic stressors such as pathogens to better anticipate the effects of global changes on aquatic organisms. In addition, there was a high variability of response between the two gudgeon populations, suggesting that future studies should take into account population variability to better predict the responses of aquatic wildlife to current and future stressors.

Keywords Multiple stressors, climate change, pathogens, physiology, behaviour, inter-population variability

1. Introduction

Freshwater ecosystems are increasingly exposed to numerous stressors which can potentially interact (Hoffmann et al. 2010; Schinegger et al. 2016) and have unexpected effects on fish physiology and behaviour. Among stressors, temperature increase and occurrence of extreme weather are among the most important factors affecting fish physiology (e.g. immune responses, energy reserves and allocations) and behaviour (Brett 1971; Cossins and Bowler 1987). For instance, high temperature can hamper fish immune responses (Dittmar et al. 2014), and enhance fish activity, energy expenditure and oxidative stress (Bartolini et al. 2015; Gandar et al. 2017). Simultaneously, pathogen occurrence is expected to drastically change in the future due to global changes. This could increase the immune costs incurred by fish hosts and strongly affect their physiology and behaviour (Macnab and Barber 2012; Cable et al. 2017). For instance, the reproduction and transmission of ectoparasites such as gyrodactylids are increasing due to climate change, which can trigger a costly immune response and oxidative stress in their fish hosts (Bakke et al. 2007). These molecular effects might interact and have cascading effects on the whole individual, such as reduced fish energy reserves, body condition, reproductive success, and survival (Buchmann and Lindenstrøm 2002; Eizaguirre et al. 2009, 2011). However, pathogens and their associated immune challenges are still rarely considered as biotic stressors that could interact with other stressors (Preston et al. 2016), such as increased temperature.

Previous studies outlined the importance of taking into account different levels of biological organisation in stress responses, because different effects might be expressed at the molecular, cellular or individual level (Côté et al. 2016). In this study, we tested the combined effects of stressors (temperature and immune challenge) on fish physiology and behaviour across levels of biological organisation, from molecules to the whole individual. We focused on traits related to oxidative stress, DNA damage and immune defenses at the molecular and cellular levels, because both temperature and parasites can affect immunity and increase metabolic activity, oxygen consumption and lead to a higher level of oxidative stress (Marcogliese et al. 2005; Stumbo et al. 2012; Halliwell and Gutteridge 2015; Schreck et al. 2016; Birnie-Gauvin et al. 2017). Such molecular effects can have potential cascading effects at the individual level, especially through

behavioural adjustment (i.e. plasticity) and effects on fish survival and fitness (Wingfield 2003; Wong and Candolin 2015). We thus focused on fish behaviour and survival because it could have consequences for population dynamics in the wild (Vélez-Espino et al. 2006).

At the molecular level, anti-oxidative molecules are the main defense pathways against reactive oxygen species (ROS) produced by exposure to most environmental stressors. When these anti-oxidative defenses are exceeded by ROS production (i.e. imbalance) damage to lipids, proteins and DNA impacting their structure and functioning are expected (Lushchak 2011). More specifically, temperature increase and immune challenges generally both induce the production of ROS which can increase oxidative damage (Preynat-Seauve et al. 2003; Swindle and Metcalfe 2007; Vinagre et al. 2012). Thus, combined exposure to these multiple stressors could lead to an overproduction of ROS and potentially to high oxidative damage at the molecular level due to imbalance between oxidant and anti-oxidant molecules (Sulmon et al. 2015). This could ultimately lead to primary DNA damage and cause genotoxic effects (Finkel and Holbrook 2000; Birnie-Gauvin et al. 2017). Such genotoxic effects are important to take into account because they can result in cellular dysfunction and apoptosis, with potential cascading deleterious effects at the individual level, particularly on fish survival and thus population dynamic (Anitha et al. 2000; Malev et al. 2010; Cheng et al. 2018).

At the cellular level, immunity is generally strongly affected by environmental stressors. Previous studies showed that temperature strongly affects innate immunity, a central immune trait in fish (Magnadóttir 2006). To measure innate immunity, the local inflammatory immune response is considered as a good indicator of innate immunocompetence (Smits et al. 1999; Martin et al. 2006) and it has been used as a proxy of immune response in various species including fish (Ardia and Clotfelter 2006; Tella et al. 2008; O'Connor et al. 2014). Because temperature could potentially hamper immunity, we expected a lower local immune response in immune challenged fish under high temperature, although immunoactivation or immunodepression can be observed depending on the temperature and species considered (Martins et al. 2011; Dittmar et al. 2014). In addition, depletion of energy reserves is expected under stress exposure, due to reallocation of energy to sustain anti-oxidative and immune defenses.

At the individual level, we focused on changes in energy allocation among energy reserves, reproduction or behaviour. Such changes are documented under single stressors,

but the effects of multiple stressors on these individual traits remain elusive. Temperature increase and immune challenges both mobilize energy reserves and decrease fish condition and reproduction indices (e.g. Fulton index, Hepatosomatic Index, Gonadosomatic Index) (Chellappa et al. 1995; Marentette and Corkum 2008; Gandar et al. 2017). In addition, behavioural changes are often the first responses to changes of the environment (Wong and Candolin 2015). For instance, increasing temperature generally increases fish activity, exploration and foraging to sustain energy expenditure (Johansen and Jones 2011; Bartolini et al. 2015; Colchen et al. 2016). Pathogens or immune challenges on the contrary generally trigger a typical sickness behaviour (i.e. a reduction in activity, exploration, foraging and also sociability) which could reduce infection risk and save energy for immunity (Johnson 2002; Bonneaud et al. 2003; Volkoff and Peter 2004). Thus, temperature and immune challenges are expected to have opposite effects (antagonistic) on most behavioural traits, but this hypothesis has been rarely tested. Finally, the immune challenge could potentially amplify the negative effects of temperature on fish survival (synergistic effects) since both stressors are energetically costly. Thus, several types of interaction between stressors could potentially occur (e.g. additive, synergistic or antagonistic) depending on the trait considered (Côté et al. 2016).

Most experimental studies on stressors effects have been performed on animals bred in captivity, which limits our understanding on realistic effects of stressors in the wild. However, wild populations might strongly vary in their responses to stressors depending on their past history of exposure. For instance Dittmar et al. (2014) showed that sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*) populations originating from warmer habitat were more able to cope with a heat wave event. This raises the possibility that populations evolving in stressful environments might develop specific abilities to cope with the same stressor (Crozier and Hutchings 2014). However, empirical studies testing this hypothesis are still rare.

In this study, we aimed at (1) testing how both abiotic (temperature increase) and biotic stressors (an immune challenge mimicking a parasite attack) could interact and shape fish responses across levels of biological organisation. We used multiple markers focusing on key traits that are expected to be affected by both stressors. In addition, we aimed at (2) investigating the inter-population variability in response of wild fish by comparing two wild populations having evolved in thermally contrasted environments.

To address these questions, we used an experimental approach on wild gudgeon fish *Gobio occitaniae* because this species is widely distributed and exposed to several environmental conditions in European rivers (Bervoets and Blust 2003; Shinn et al. 2015; Fourtune et al. 2016). We tested two wild gudgeon populations originating from two contrasted thermal regimes (16 and 24°C maximum summer temperature). We exposed fish to two environmentally relevant experimental temperatures: a control temperature (17°C) that is the optimum for this species or a high temperature mimicking a heat wave (24°C) that is expected to trigger stress responses. Half of the fish were conjointly exposed to an immune challenge mimicking a parasite attack to test the effects of multiple stressors. At the molecular and cellular levels, we expected interactive and potentially synergistic effects of temperature increase and immune challenge on oxidative stress, immunity, and energy reserve, because both stressors involve similar physiological pathways. At the individual level, we expected potentially antagonistic effects of combined stressors on behaviour because opposite effects of temperature and immune challenges are expected on behaviour. Synergistic effects were expected on fish survival because both stressors are energetically costly for organisms. Finally, we expected that the two populations should differ in their responses to experimental stressors, due to different past exposure to environmental conditions in the wild.

2. Material and Methods

2.1. MODEL SPECIES AND SAMPLING SITES

We used wild gudgeon (*Gobio occitaniae*) as a model species because it is widely distributed in South-West France and relatively sedentary thereby exposed to the same environmental stressors throughout their life (Keith et al. 2011). It has a low tolerance to increased temperature and displays a high prevalence of pathogens in the wild (for instance ectoparasites such as Gyrodactylids, Loot et al. 2007). The optimal temperatures of gudgeon range from 16 to 20°C, and lethal temperature is reached at 27°C (Tissot and Souchon 2010). Previous studies conducted on this species in the same region showed that gudgeon display contrasted phenotypic responses to physico-chemical conditions, including temperature (Shinn et al. 2015; Fourtune et al. 2016). We used the database

from Adour-Garonne Water agency (monthly measures) to select two capture sites (AUSEI and CAUSAL) that differed in mean and maximum summer temperature during 4 years but were relatively similar in other environmental conditions (Table 9). We chose a time period of 4 years because it should reflect the temperature experienced by gudgeon during their lifetime before capture (3 to 4 years of longevity; Keith 2011). Sites differed in mean and maximum summer temperature (Table 9) but did not differ in summer temperature variability among years (Coefficient of Variation CV, anova, $F = 2.1$; $p = 0.19$, see Table 9). Sites did not differ in parasite prevalence and intensity. An external and internal parasite inventory was performed on each fish after capture and only *Gyrodactylus sp.* parasites were detected and had similar prevalence (73% and 61% for AUSEI and CAUSAL respectively) and mean intensity (2.0 ± 2.3 and 1.4 ± 1.7 for AUSEI and CAUSAL respectively) (difference between sites: glm; prevalence: $\chi^2 = 1.05$, $p = 0.31$; intensity: $F = 1.15$, $p = 0.29$).

Table 9. Environmental characteristics of study sites (Adour-Garonne Water agency database from 2013 to 2016)

Site	Lat.	Long.	Elevation (m)	Water temperature \pm SD ($^{\circ}$ C)				
				Coefficient of variation	Mean Summer	Min Summer		Max Summer
AUSEI	43°41'48.67"N	1°21'29.64"E	116	12.5 \pm 4.7	20.1 \pm 3.8	14.7 \pm 0.5	24.0 \pm 1.8	Warm site
CAUSAL	43°55'52.61"N	2°09'58.74"E	160	8.6 \pm 2.7	15.5 \pm 1.4	14.3 \pm 0.7	16.1 \pm 1.5	Cold site

2.2. FISH SAMPLING AND ACCLIMATION

40 gudgeons (6 to 11 cm of length) were caught by electrofishing (EFKO-FEG 1500) on each study sites in March 2017 and brought to the laboratory. To eliminate potential parasites and standardize fish immune status prior to the experimentation, fish were treated using Praziquantel (Vetofish, France, purity = 1000mg.g⁻¹; concentration: 3 mg.L⁻¹). Fish were then acclimated during 30 days in 200L tanks containing gravel and shelters to reduce stress, equipped with oxygen pumps, mechanical filters, and temperature controllers. Temperature was gradually increased by 0.5°C every 24h to gradually reach experimental temperatures without triggering stress. During acclimation, physico-

chemical parameters were checked every week ($\text{pH} = 7.6 \pm 0.7$; $\text{Conductivity} = 314 \pm 17 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$; $\text{O}_2 \text{ dissolved} = 9.5 \pm 0.3 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) and half of the water was renewed every 2-days. Mortality rate was low (3.75%: 2 individuals from AUSEI and 1 from CAUSAL).

2.3. EXPERIMENTAL DESIGN

77 individuals in total were randomly exposed to 4 different treatments: control without stressor (17°C PBS: $n = 17$), temperature increase alone (24°C PBS: $n = 20$), immune challenge only (17°C AMIX: $n = 20$) and multiple stressors (temperature and immune challenge combined, 24°C AMIX: $n = 20$). Within these treatments, 2 populations were tested (AUSEI and CAUSAL) (7 to 10 individuals per treatments and population) (Fig. 33).

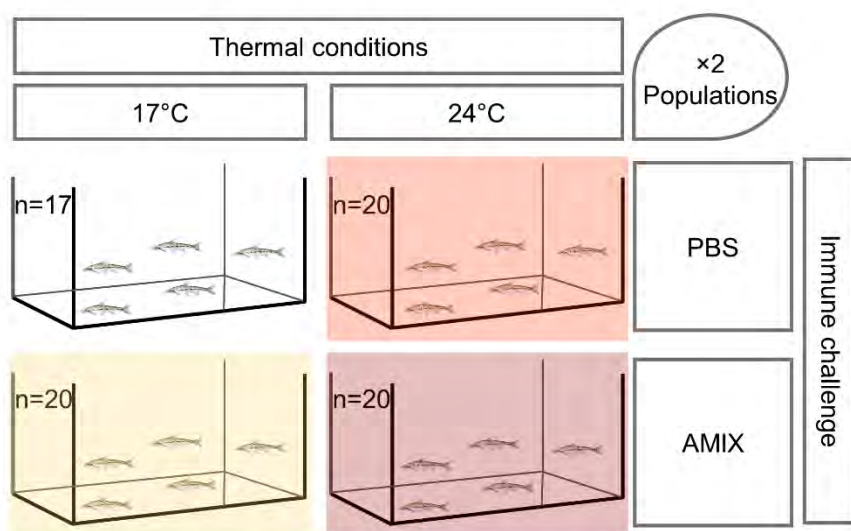


Figure 33. Experimental design. Fish were exposed either to control temperature 17°C (optimum) or to high temperature 24°C corresponding to the highest temperature recorded in the warmest population. Half of the fish was also exposed to an immune challenge caused by an antigen mixture (AMIX) or to a control injection of saline solution (PBS). 77 individuals in total were tested in 4 treatment groups: control without stressor (17°C-PBS, white: $n = 17$), thermal stress only (24°C PBS, orange: $n = 20$), immune challenge only (17°C AMIX, yellow: $n = 20$) and multiple stressors (24°C AMIX, red: $n = 20$). Fish were tested in groups of 5 fish, so that 2 replicate tanks per condition and per population were used.

We chose two environmentally relevant temperatures: 17°C, which is the optimal temperature for this species and corresponds to a common temperature found in one of the sites, or 24°C, which is maximum temperature recorded in the warmest site. In addition, 24°C is considered as a stressful temperature for gudgeon (lethal temperature: 27°C, Tissot and Souchon 2010). We chose a duration of exposure of 7-days to mimick the average duration of a heat wave in the environment (Beniston et al. 2007).

In order to standardize the immune challenge and mimick an infection by a wide range of pathogens, we injected half of the fish with an antigen mixture (AMIX) of phytohaemagglutinin (PHA) and *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) following previous studies in vertebrates, including fish (Tella et al. 2008; Toomey et al. 2010; Otálora-Ardila et al. 2016). The control saline-injected group was injected with a Phosphate Buffered Saline (PBS group) (Toomey et al. 2010). Fish were injected in the caudal peduncle with 10 μ L of PBS or of an antigenic solution mixture (AMIX group) of PHA (PHA, L8754 Sigma-Aldrich, 45 μ g.10 μ L⁻¹) and LPS (LPS, L2830 Sigma-Aldrich, 45 μ g.10 μ L⁻¹). Briefly, PHA is a standard lectin inducing a cell-mediated response (e.g. inflammatory response and proliferation of T-cells), reflecting a local cellular immune response against a wide range of ectoparasites (Martin et al. 2006; Tella et al. 2008). The LPS antigen is originating from the membrane of bacteria (*Escherichia coli*), and also triggers a local and systemic innate and adaptive immune response (Swain et al. 2008). The response to the mixture of both antigens is measured through a local skin swelling reflecting local cellular immunity. This skin swelling can easily be measured within 24 to 48 hours after injection (Martin et al. 2006; Tella et al. 2008). Antigen injection (AMIX) also triggers a long-lasting circulating immune activation during 4 to 8 days in fish (Le Guernic et al. 2016).

Because gudgeon fish are gregarious, they were placed and tested in groups of 5 fish per tank, so that 2 replicate tanks per condition and per population were used. Experimental tanks were 50x30x30cm with opaque glass containing 37L of water previously filtered at 0.2 μ m, treated on activated carbon, UV lamp and dechlorinated water. Each tank was equipped with temperature controller and mechanical water filtration. Oxygen supply was kept constant over every treatment using air pump in order to avoid the decrease of dissolved oxygen level in warmer tank (17°C: 17.4 \pm 0.3°C, O₂ (dissolved) = 10.2 \pm 0.2 mg.L⁻¹, n = 25; 24°C : 24.0 \pm 0.2°C, O₂ (dissolved) = 9.7 \pm 0.3 mg.L⁻¹, n = 25). During the exposure fish were sustained under a day/night cycle photoperiod of 12/12h. Fish were fed daily using thawed midges (*Chironomus sp.*). There was no difference of sex ratio ($\chi^2 = 0.44$, $p = 0.93$) and fish mass (6.5 \pm 0.2 g); and size (8.6 \pm 0.1cm) among treatments (Anova mass: F = 0.27, $p = 0.85$; Anova size: F = 0.49, $p = 0.69$).

2.4. SAMPLE COLLECTION

At the end of the experiment, fish were euthanized using anesthetic overdose (benzocaine, 150 mg.L⁻¹). Fish were then weighed, measured, and dissected for sex determination and further analyses on tissues. Blood samples were collected from the caudal vein in heparinised syringes (1mL Terumo syringe, 0.45x13mm needle) and 2µL of total blood fraction was collected, diluted at 1:100 in a cryopreservative buffer (250 mM sucrose, 40 mM trisodium citrate, 5% dimethylsulfoxide, pH 7.6 adjusted with 1 M citric acid), deep-frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C until measurement of primary DNA damage (genotoxicity assessment) in erythrocytes using the comet assay. The remaining blood was centrifuged (4°C, 2000g) for 10 min and plasma was kept at -20 °C for subsequent oxidative damage and anti-oxidant capacity assays. After dissection, the spleen, liver and gonad were weighed (+/- 1 mg) for body condition index calculation while fish muscles were immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C to assess fish energy reserves.

2.5. MOLECULAR LEVEL: OXIDATIVE STRESS INDEX

Following previous studies, we measured anti-oxidant capacity and oxidative damage in the plasma to calculate an oxidative stress index considered as the ratio of oxidative damage divided by the anti-oxidant capacity multiplied by 1000 (Costantini and Dell’Omo 2006; Herborn et al. 2011). Antioxidant capacity represents the anti-oxidant power of the plasma barrier composed of exogenous (e.g., tocopherols, carotenoids, and flavonoids) and endogenous (e.g., proteins, bilirubin, uric acid, cholesterol, and GSH) compounds (Isaksson 2013).

Specifically, OXY-adsorbent test (Diacron International, Grosseto, Italy) measure the anti-oxidant capacity of the plasma by quantifying the overall ability of compounds present in a plasmatic solution to cope with the *in vitro* oxidant action of hypochlorous acid (HOCl; an endogenously-produced oxidant) (Hoogenboom et al. 2012). In accordance with method from Bagni et al. (2007) and Hoogenboom et al. (2012), plasma was previously diluted (1:100) with ultrapure water. Then, 5 μL of the diluted plasma and 200 μL of HOCl solution was incubated in 96-well microplate for 10 min at 37 °C. The same relative volumes were used for certified standards and blanks. After incubation time, 5 μL of chromogen N, N-diethyl-p-phenylenediamine was added to each well and absorbance was read at 490nm using CLARIOstar® (BMG LABTECH). For anti-oxidant capacity assessment, intra- and interplate repeatabilities were $86.5 \pm 10.6 \%$ and $86.1 \pm 7.8 \%$ respectively.

Oxidative damage was analysed using d-ROM test (Diacron International, Grosseto, Italy). The d-ROM test allows to indirectly measure plasmatic hydroperoxides (ROOH), which is both considered as active oxidant and a reactive oxygen metabolite (ROM) resulting from the effect of ROS on organic substrates (carbohydrates, lipids, amino acids, proteins, nucleotides) (Beaulieu et al. 2010) and act as precursors of end-products of lipid peroxidation (Hoogenboom et al. 2012). This marker is thus considered to assess both active oxidants capacity as well as oxidative damage (Alberti et al. 2000). We used the method implemented for fish by Bagni et al. (2007) and Hoogenboom et al. (2012). 8 μL of undiluted plasma, 200 μL of 0.01 M acetic acid/sodium acetate buffer (pH 4.8) solution and 2 μL of chromogen (N, N-diethyl-p-phenylenediamine) was incubated in 96-well microplate for 75 min at 37 °C. The same relative volumes were used for certified standards and blanks. Incubation was made in 96-wells microplate and

centrifuged at 3500 rpm for 2 min. Clarified supernatant was then transferred in 96-wells microplate for absorbance reading at 490 nm using CLARIOstar® (BMG LABTECH). For ROM assessment, intra- and inter-plate repeatabilities were $95.9 \pm 3.9 \%$ and $93.7 \pm 2.5 \%$ respectively.

Finally, we calculated an oxidative stress index as the ratio of oxidative damage divided by the anti-oxidant capacity multiplied by 1000 (Costantini and Dell’Omo 2006; Herborn et al. 2011). Due to the difficulties of taking a large enough quantity of blood to carry out all our measurements, sample size among treatment was: control (17°C PBS): n=8; immune challenge only (17°C AMIX): n=10; thermal stress only (24°C PBS): n=13; combined stressors (24°C LPS): n=10).

2.6. MOLECULAR LEVEL: DNA DAMAGE

Oxidative stress can cause DNA disruption and genotoxicity. In order to assess genotoxicity, we used the alkaline comet assay which is one of the most used approaches (Santos et al. 2016). It allows to detect a wide array of primary DNA damage such as single and double-strand breaks, alkali-labile, incomplete repair sites, and DNA cross-links (Tice et al. 2000). Here, primary DNA damage was assessed using comet assay performed on cryopreserved erythrocytes in accordance with the method described by Singh et al. (1988) modified by Santos et al. (2014). Microscope slides were covered with melted normal agarose in PBS (0.8%) and dried overnight at 20 °C. Erythrocytes suspension was mixed with 1% low melting agarose made in HBSS (37°C) and 100 µL of the mix was scattered on the slides and placed at 4 °C for 10 min allowing the agarose polymerization. Slides were then incubated in a lysing solution for 1 h at 4 °C in a dark room (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, and 10% DMSO, pH 10) and put under dim yellow light in a horizontal electrophoresis tank filled with electrophoresis buffer (300 mM NaOH, 1 mM EDTA, pH >13) for 40 min at 4 °C allowing the unfolding of DNA before electrophoresis step (0.66 V.cm⁻¹, 24 min). Slides were then washed 3 times for 5 min with a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH7.5) and dried in absolute ethanol prior their staining using 0.02% ethidium bromide solution. Primary DNA damage of 100 randomly selected cells per slide was randomly analysed using an Axioskop epi-fluorescence microscope (Zeiss, Germany) and an image analysis system (Comet IV software, Perceptive Instruments, UK). We then recorded tail intensity

(percentage in tail DNA) as a proxy of DNA damage rate (Collins 2004). For this assay, sample size among treatment was: control (17°C PBS): n=16; immune challenge only (17°C AMIX): n=18; thermal stress only (24°C PBS): n=17; combined stressors (24°C LPS): n=13).

2.7. CELLULAR LEVEL: LOCAL IMMUNE RESPONSE

The local immune response caused by mixture of antigen (AMIX) or control saline (PBS) injection was measured as the skin swelling (thickness) of the caudal peduncle 48h after injection using a caliper following previous studies in fish (Ardia and Clotfelter 2006; O'Connor et al. 2014). The thickness of the caudal peduncle was measured 3 times and averaged before and after the antigenic injection using a thickness gauge (Elcometer® 124). A previous pilot study on gudgeon showed that this time lag was optimal to measure skin swelling in this species (unpublished data). Although antigen injection (AMIX) can reflect several components of the immune response, skin swelling has been validated as a reliable measure of local immune capacity across a variety of taxa, including fish. An important skin swelling response reflects a strong innate immune system and a high investment in immune defence (Ardia and Clotfelter 2006; Tella et al. 2008; O'Connor et al. 2014). The intensity of the local Immune Response was calculated as follow:

$$\text{Local Immune Response} = \frac{\text{Mean Caudal peduncle thickness}_{(t=48h)} - \text{Mean Caudal peduncle thickness}_{(t=0)}}{\text{Mean Caudal peduncle thickness}_{(t=0)}} \times 100$$

Intra-individual repeatability of the local immune response measurements (three repeated measures on the same individual) was very high ($99.4 \pm 0.3\%$ after injection). Sample size for immune local responses measurement among treatment was: control (17°C PBS): n=16; immune challenge only (17°C AMIX): n=19; thermal stress only (24°C PBS): n=18; combined stressors (24°C LPS): n=16).

2.8. CELLULAR LEVEL: AVAILABLE ENERGY

The available energy in muscles was calculated as the sum of total carbohydrates, lipid and protein contents. The amount of available energy in muscle cells is a good marker of energy status, because it is critical for the maintenance of biological functions of fish, especially under stress (Gomes et al. 2015; Gandar et al. 2016). We used protocol from De Coen and Janssen (1997) modified by Gandar et al. (2017). The 25mg of fish muscles were homogenized in 1mL of ultrapure water using Fastprep®-24 homogenizer. Muscle suspension was divided in 2 aliquots. The first aliquot was mixed with trichloroacetic acid (TCA) and incubated -20°C. Then, sample was centrifuged to split up the supernatant and the pellets. 50 µL of the supernatant was read at 492nm against glucose in TCA using CLARIOstar® (BMG LABTECH) for determination of total carbohydrate content ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ muscles wet weight). The pellet was resuspended in sodium hydroxide (NaOH, 1 M). Then, suspension was mixed with Bradford reagent before reading absorbance in triplicate at 595nm against bovine serum albumin in 0,2 M NaOH for total protein concentration determination ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ muscles wet weight).

The second aliquot was mixed with chloroform (CHCl_3), methanol (CH_3OH) and sulfuric acid (H_2SO_4) and centrifuged. The H_2SO_4 was added to the bottom phase and vanillin-phosphoric acid reagent was added before reading absorbance in triplicate at 525 nm against tripalmitin in chloroform for total lipid concentration determination ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ muscles wet weight). Concentrations of carbohydrate, protein and lipid were then transformed to energetic values using their enthalpy of combustion (17, 24 and 39.5 $\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively) and summed to obtain the available energy in muscles. Sample size for energy reserve among treatment was: control (17°C PBS): n=16; immune challenge only (17°C AMIX): n=19; thermal stress only (24°C PBS): n=18; combined stressors (24°C LPS): n=13).

2.9. INDIVIDUAL LEVEL: CONDITION INDICES

Four condition indices were calculated to reflect the general condition of the individual based on organ and whole body mass of fish. First, we measured the daily body mass change before and after the experiment (4 days before injection, and 7 days after injection) to measure changes in whole body condition. Then the splenosomatic index (SSI, spleen

mass corrected by the body mass x100) was calculated as a proxy of spleen contraction. The spleen contraction results in the release of erythrocytes and lymphocytes in the blood and thus play an important role in hematopoiesis and immune responses and is representative of the stress response (Nilsson 1983; Maule and Schreck 1990; Pearson and Stevens 1991). The hepatosomatic index (HSI, liver mass corrected by the body mass x100) is considered as a proxy of energy content in the liver (Chellappa et al. 1995). And finally the gonadosomatic index (GSI, gonad mass corrected by the body mass x100) is a proxy of the reproductive status (Marentette and Corkum 2008).

Because condition indices were partly correlated (Table S3), we used a PCA to extract a global condition index from the first and the second axis. The first axis representing fish global body condition index composed of GSI, HSI and daily body mass change while the second axis is represented mostly by SSI. The sum of the variance explained by both axes of the PCA was 70.8%. Hence, fish with a higher global body condition index had thus a lower body mass loss and a higher liver and gonad mass related to their body mass. Sample size for global condition index among treatment was: control (17°C PBS): n=16; immune challenge only (17°C AMIX): n=18; thermal stress only (24°C PBS): n=18; combined stressors (24°C LPS): n=12).

2.10. INDIVIDUAL LEVEL: BEHAVIOUR

At the individual level, fish behaviour was analysed at day 4 after the AMIX injection in their own experimental tank to avoid handling stress. For this purpose, fish were marked using a visible implant elastomer (Northwest Marine Technologies, Inc., Shaw Island, Washington) before the experiments to monitor behaviour. Videos were recorded by Sony HandyCam HD camera (50Hz; 1920×1080p) and analysed using JWatcher software (Blumstein et al. 2001) for 10 minutes based on previous studies (Jacquin et al. 2017; Lopez-Luna et al. 2017).

Four behavioural traits were chosen because they are commonly affected by temperature and pathogens: activity, exploration, foraging, and sociability. Activity was measured as the time spent swimming (Calfee et al. 2016). In order to measure fish exploration, the tank was divided in two main areas, i.e. a central area and a margin area corresponding to the border of the tank (8 first cm from the tank glass). Then, exploration was measured as the time spent in a central area of the tank (thigmotaxis) following previous studies (Rosemberg et al. 2011; Benhaïm et al. 2016). Foraging was measured

(Nowicki et al. 2012) as the number of foraging events (fish digs the substrate) and the latency to forage after distributing chironomids larvae (Winandy and Denoël 2015). Sociability was assessed using the number of encounters between individuals (number of times an individuals touch another individual with the head) and the average nearest neighbour distance (ANND). The ANND was calculated as the distance between the nearest neighbour and the focal individual (mean of 10 measures taken every 30 seconds during 5 minutes). Lower ANND reflects lower distances between individuals and thus higher sociability (Bartolini et al. 2015; Colchen et al. 2016).

Because these behavioural traits were correlated (Table S4), we used PCA to extract two synthetic variables named “general activity” (PCA1, 38.7% of variance explained) and “sociability” (PCA2, 19% of variance explained) for a total of 57.7% of the explained variance. Fish with a higher general activity index on the first PCA axis swam for a longer time and foraged more frequently (number of foraging events) with a lower latency to forage. Fish with a lower index on the second axis were more sociable, i.e. had more social contacts and stayed closer to their conspecifics (smaller ANND).

2.11. STATISTICS

To test the effects of treatments on fish traits across biological levels, we used linear mixed-effects models (lme4 package, Bates et al. 2015) on each trait: oxidative stress index (log-transformed), DNA damage, local immune response, available energy, general body condition index (first condition PCA axis, see Fig. S4), Splenic Index (second condition PCA axis, see Fig. S4), general activity (first behavioural PCA axis, log-transformed) and sociability (second behavioural PCA axis). The replicate tank was included as a random effect to take into account possible shared conditions in the same tank. Temperature treatment (17° vs 24°C), injection treatment (PBS vs AMIX injection), population of origin and their interactions were included as fixed factors. Survival was analysed using Generalized Linear Model with a binomial distribution. Best models were then selected by stepwise model selection approach by eliminating non-significant variables starting with interactions (see Table 10 for summary of the best final models). Triple interactions were not significant and removed from final models. Fish size and sex were added as covariates in all models but removed from final models when non-significant. When interactions were significant, we used contrast post-hoc analyses

(emmeans package, Lenth et al. 2017) with False Discovery Rate adjustment to analyze differences between groups. 5% was used as a significance threshold.

To compare the magnitude of stressor effects (single or multiple), we computed standardized effect sizes (compute.es package) Hedges' g and 95% confident interval (CI) from GLMM model outputs (e.g., z-values or t-value) following methods described in Hedges et al. (1999) and Del Re (2013). When 95% CI overlapped 0, treatment effect was considered as not significant. When effect size and its 95% CI was lower or higher than 0, treatment effect was significantly as negative or positive, respectively (Hedges et al. 1999). When the effect of multiple stressors was significant, we used an interactive effect analysis. We compared the magnitude of interactive vs additive effects of multiple stressors, following methods described in Côté et al. (2016) and Lange et al. (2018). The effect of multiple stressors (here 24°C-AMIX treatment group) was compared to the expected additive effects of both single stressors alone (i.e. the sum of the individual stressor effects) using standardized effect sizes Hedges' g and their 95% confident interval (CI) as follow:

$$g = \frac{(Y_{12} - Y_2) - (Y_1 - Y_{ct})}{2s} \times J(m)$$

where Y_{ct} , Y_1 , Y_2 , and Y_{12} correspond to the mean effect of control (no stressor), stressor 1 (temperature), stressor 2 (immune challenge) and multiple stressors (temperature and immune challenge), respectively. s corresponds to the pooled sampling variance and $J(m)$ is the correction for small sampling bias across all treatments groups following Gurevitch et al. (2000) and Lange et al. (2018). When the interactive effect of multiple stressors was significantly lower (no overlap of CI) than the expected additive effect of each stressor, it was considered as antagonistic. When the interactive effect was significantly higher, it was considered as synergistic (Gurevitch et al. 2000; Lange et al. 2018). All analyses were performed with R, version 3.3.3 (R Development Core Team, 2013).

3. Results

3.1. MOLECULAR LEVEL: OXIDATIVE INDEX AND DNA DAMAGE

Oxidative stress index and DNA damage rate did not significantly differ among treatments (Fig. 34A and Fig. 34B). However, fish from CAUSAL population had a higher oxidative stress index (1.8 ± 0.1 and 1.3 ± 0.2 respectively; $F = 5.11$, $p = 0.03$) and DNA damage rate (19.4 ± 1.1 and $15.1 \pm 1.0\%$, respectively, $F = 8.66$, $p < 0.01$) compared to fish from AUSEI population (Table 10).

3.2. CELL LEVEL: LOCAL IMMUNE RESPONSE

The local immune response was not significantly affected by temperature increase (Table 10). However, antigen-injected fish (AMIX) exhibited a significantly higher local immune response compared to saline-injected fish (PBS) (Table 10, Fig. 34C). The interaction between stressors and the population was not significant (Table 10). The effect size of the immune challenge on local immune response was large (1.23 [0.49; 1.97], Fig. 35A).

3.3. CELL LEVEL: AVAILABLE ENERGY

The available energy in fish muscles was not significantly different among treatments (Fig. 34D). However, CAUSAL fish had higher available energy in their muscles compared to AUSEI fish ($3.5 \times 10^3 \pm 0.2 \times 10^3$ and $2.5 \times 10^3 \pm 0.2 \times 10^3$ mj.mg⁻¹ of tissue respectively, effect of population $F = 12.25$, $p < 0.001$) (Table 10).

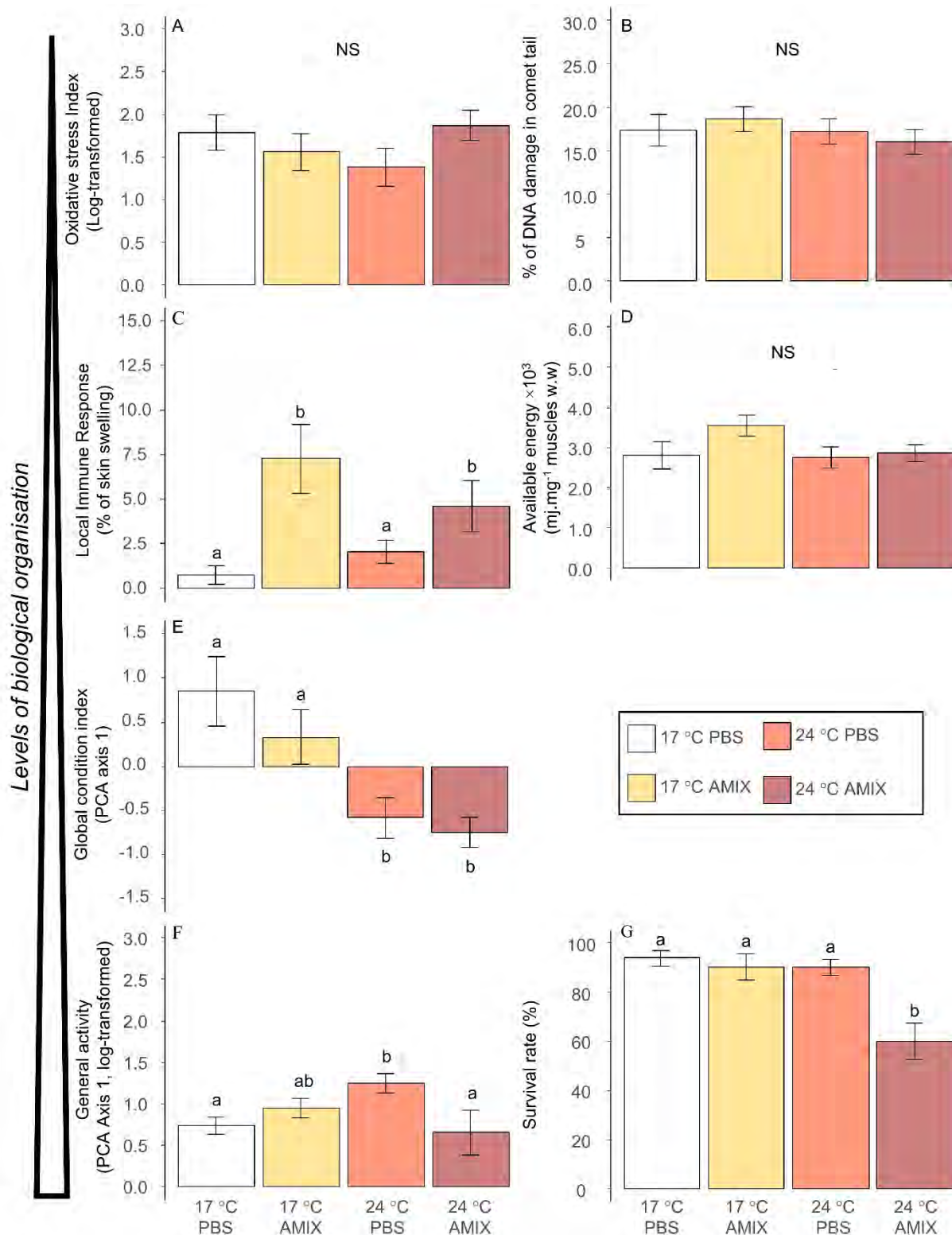


Figure 34. A) Oxidative stress index among treatments (control, white: 17°C PBS; thermal stress only, orange: 24°C PBS; immune challenge only, yellow: 17°C AMIX; combined stressors, red: 24°C AMIX). B) DNA damage (percentage of DNA in comet tail). C) Local Immune Response measured as the percentage of skin swelling at injection. D) Available energy measured in white muscles. E) Global condition index (PCA axis 1, reflecting mostly HSI, GSI, Daily mass change) F) General activity (PCA axis 1, reflecting mostly time in central area, time in water column, time swimming, latency to forage and foraging events). G) Survival rate (%). NS indicate non-significant differences among treatments while different letters above bars indicate significant differences after post-hoc contrast analyses.

Table 10. Best final mixed models explaining fish responses to stressors at different biological levels. Temperature (17° vs 24°C), immune challenge (PBS vs AMIX injection), population and their interactions were included as fixed factors. Sex and size were included as covariates but removed from most final models. Triple interactions were not retained in final models. Best models were selected by stepwise model selection. For each significant fixed factor reported, the summary of the statistical output of the best model is given as follows: Est. and SE correspond to the estimated fixed effect and its standard error respectively; the F and p value correspond to the Fisher F statistic (Type III Wald F test) and to the p-value of the fixed factor respectively.

Biological level	Response trait	Fixed factor	Est.	SE	F	p
<i>Molecular</i>	DNA damage	Population	4.32	1.47	8.66	0.005
	Oxidative stress Index	Population	0.47	0.21	5.11	0.030
<i>Cellular</i>	Immune Response	Immune challenge	0.20	0.05	13.78	<0.001
	Available Energy	Population	0.93	0.27	12.25	<0.001
<i>Individual</i>	Global body condition (PCA axis 1)	Temperature	-1.87	0.43	18.28	<0.001
		Sex	-1.35	0.38	11.93	<0.001
		Temperature : Sex	1.17	0.57	4.08	0.048
	General activity (PCA axis 1)	Temperature	0.50	0.17	8.81	0.004
		Immune challenge	0.72	0.21	11.66	<0.001
		Population	-0.14	0.17	0.74	0.394
		Immune challenge: Population	-0.98	0.24	16.62	<0.001
		Temperature : immune challenge	-0.74	0.24	9.39	0.003
	Sociability (PCA axis 2)	Immune challenge	1.13	0.39	8.58	0.005
		Population	1.05	0.37	7.79	0.007
		Immune challenge : Population	-1.28	0.53	5.67	0.020
	Survival rate	Temperature	0.58	1.27	0.21	0.65
Immune challenge		0.58	1.27	0.21	0.65	
Temperature : Immune challenge		2.37	1.27	6.17	0.04	

3.4. INDIVIDUAL LEVEL: GLOBAL BODY CONDITION INDEX

The global body condition (from PCA axis 1, see Fig. S4) was negatively affected by temperature alone, but not by the immune challenge alone nor the multiple stressors or population (Fig. 34E). More specifically, detailed analyses on each trait showed that fish lost more body mass per day ($17^{\circ}\text{C} = -0.50 \pm 0.08 \%$, $24^{\circ}\text{C} = -0.98 \pm 0.14$, $F = 9.1$, $p < 0.01$) and had a lower HSI ($17^{\circ}\text{C} = 0.91 \pm 0.06$, $24^{\circ}\text{C} = 0.66 \pm 0.05$, $F = 10.2$, $p < 0.01$) at 24°C compared to 17°C . Female GSI also decreased with temperature increase ($17^{\circ}\text{C} = 5.27 \pm 0.08$, $24^{\circ}\text{C} = 2.46 \pm 0.04$, $F = 19.2$, $p < 0.001$). The effect of temperature on the global body condition was large (-1.16 [-1.9 ; -0.42]). The Splenic Index (PCA axis 2, see Fig. S4) was not significantly affected by treatment nor population (Temperature: $F = 0.3$, $p = 0.6$; immune challenge: $F = 0.003$, $p = 1.0$; Population: $F = 0.7$, $p = 0.4$).

3.5. INDIVIDUAL LEVEL: BEHAVIOUR

General activity (PCA axis 1 on Fig. 36) was significantly affected by the interaction between temperature and immune challenge (Table 10). In control saline-injected fish, general activity increased with temperature (PCA axis 1, 17°C PBS vs 24°C PBS: $p = 0.015$) (Fig. 34F). On the contrary, in AMIX immune-challenged fish, temperature did not significantly affect the general activity (PCA axis 1, 17°C AMIX vs 24°C AMIX $p = 0.207$). Accordingly, the effect size of multiple stressors was significantly negative and large ($g = -0.93$ [-1.69 ; -0.16], Fig. 35A). Temperature and immune challenge had marginally antagonistic effects on the general activity (i.e. the immune challenge inhibited the effect of temperature) compared to additive effects as shown by the interactive effect analysis ($g = -0.73$ [-1.47 ; 0.01], Fig. 35B).

In addition, populations had different responses to the immune challenge as shown by the significant population-by-immune challenge interaction on general activity and sociability (Table 10). More specifically, immune challenge significantly decreased activity in CAUSAL fish (PBS CAUSAL vs AMIX CAUSAL: $t = 3.4$, $p = 0.002$), but not in AUSEI fish (PBS AUSEI vs AMIX AUSEI: $t = -1.8$, $p = 0.94$) (Fig. 36). On the contrary, immune challenge decreased sociability in AUSEI fish ($t = -2.9$, $p = 0.021$) but not in CAUSAL fish ($t = 0.4$, $p = 0.828$) as shown in Fig. 36.

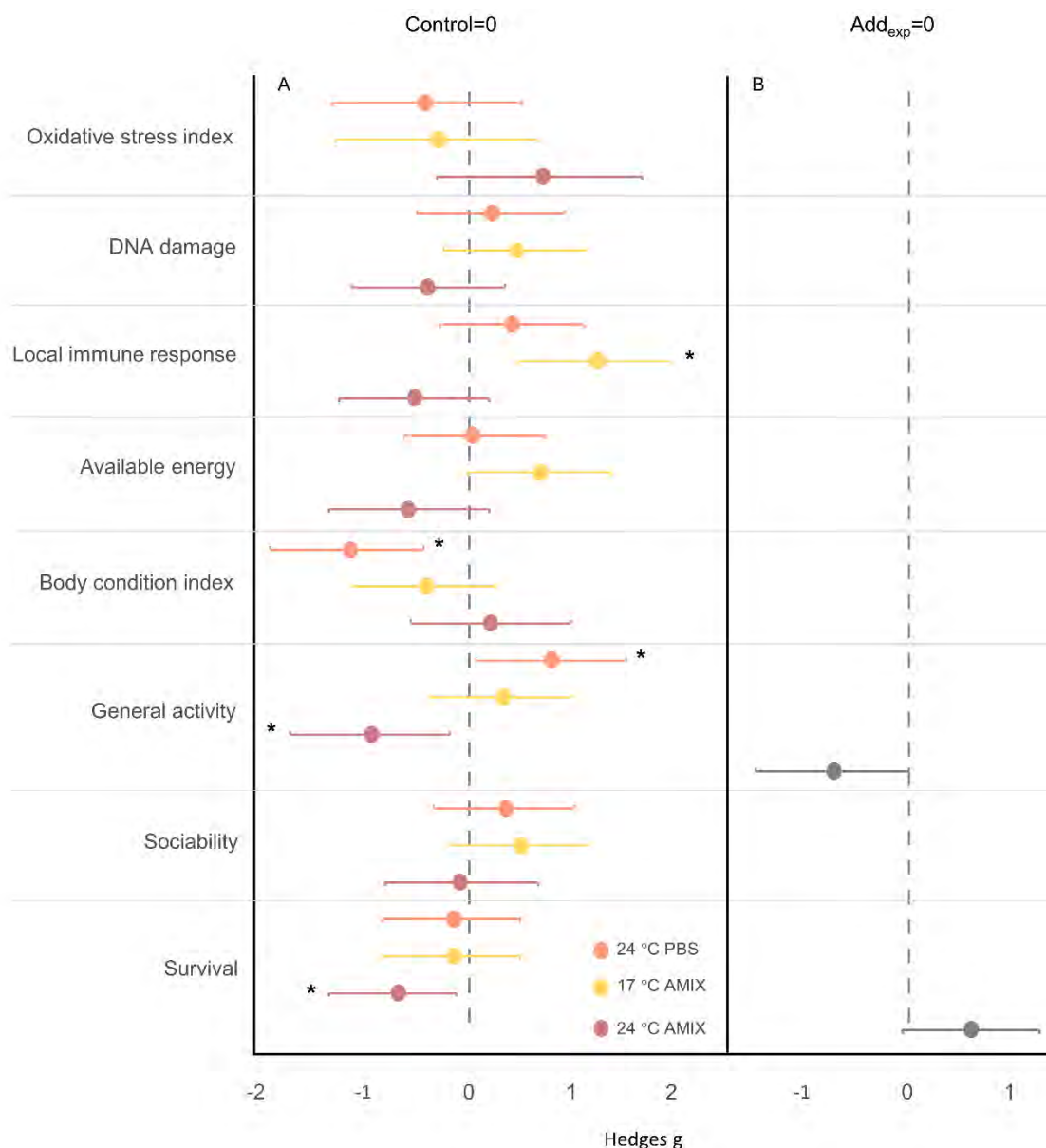


Figure 35. A Effect size (hedges g) and 95% confidence intervals (CI) of treatment effects (thermal stress only, orange: 24°C PBS; immune challenge only, yellow: 17°C AMIX; combined stressors, red: 24°C AMIX) relative to control, at different biological levels. Dashed line represent control treatment. When 95% CI did not overlap 0 (control), the effect of the treatment was significant. Asterisks indicate significant effect of treatment. B Interactive effects of multiple stressors compared to additive effects of single stressors (only on traits where multiple stressors effects were significant). When the interactive effect was significantly lower than the expected additive effect (95% CI did not overlap Add_{exp}=0), it was considered as antagonistic. When it was significantly higher, it was considered as synergistic (see methods).

3.6. INDIVIDUAL LEVEL: SURVIVAL

Survival was significantly lower in individuals exposed to combined stressors (60 ± 14%) compared to fish exposed to control (94 ± 6%) and single stressors (17°CAMIX: 90 ±

10%, 24 °C PBS: $90 \pm 6\%$) (Fig. 34G). Accordingly, the effect size of combined stressors on survival rate was significantly negative ($-0.68 [-1.35; -0.12]$) (Fig.35A). The interactive effect analysis shows that combined stressors had a marginally synergistic effect compared to the expected additive effects of both stressors ($g = 0.59 [-0.07; 1.25]$) (Fig. 35B).

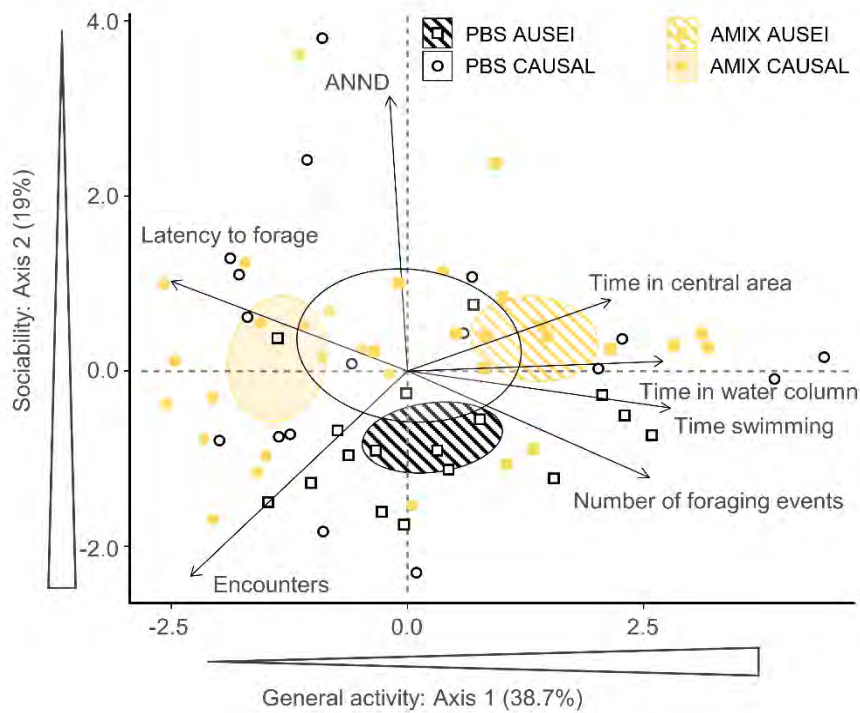


Figure 36. PCA of behaviour of fish exposed to multiple stressors (each dot represents an individual). Graphical representation shows the immune treatment and populations groups (temperatures are pooled). Open squares and dots represent control individuals (PBS) from AUSEI and CAUSAL population respectively; while yellow squares and dots represent immune challenge individual (AMIX) from AUSEI and CAUSAL population respectively. White and yellow ellipses represent the 95% confidence interval of immune treatment (control: PBS and immune challenge: AMIX, respectively) while open and hatched ellipses represent the population (CAUSAL and AUSEI population, respectively)

4. Discussion

In this study, we tested the effects of multiple stressors (temperature and immune challenge) on gudgeon across biological levels and the inter-population variability in fish responses. Combined stressors had interactive effects, but only at high levels of biological organisation (behaviour and survival) (summary in Table 11). More specifically, immune challenge inhibited the effects of temperature on activity, and fish exposed to multiple stressors had a decreased survival rate. In addition, populations differed strongly in their responses to stressors, showing that it is important to take into account inter-population variability of sensitivity in wild fish.

Table 11. Summary of results across biological levels. Interactive effects of multiple stressors were observed at the individual level only. In addition, populations (CAUSAL and AUSEI) differed depending on the trait considered. NS indicate non-significant effect.

Biological Level	Response trait	Treatment effect	Conclusion multiple stressors	Population variability	Conclusion on population variability	General conclusion
<i>Molecular</i>	Oxidative stress	NS	Basal damage was high, and not affected by treatments	CAUSAL > AUSEI	CAUSAL fish had higher damage than AUSEI, suggesting a higher sensitivity to captivity	No effect of treatment. Basal damage were high and different between populations
	DNA Damage	NS		CAUSAL > AUSEI		
<i>Cellular</i>	Local Immune response	Immune challenge alone	Immune challenged fish had a higher immune response	NS	No variability	Immune stressor triggered a significant immune response
	Available energy	NS	No treatment effect	CAUSAL > AUSEI	CAUSAL population had higher amount of available energy than AUSEI	No effect of treatments. Populations had different available energy
<i>individual</i>	General body condition index	Temperature alone	High temperature decreased condition	NS	No variability	High temperature decreased condition but populations did not vary in their response to temperature
	General activity (PCA axis1)	Temperature x Immune challenge	Multiple stressors effect: immune challenge inhibited the effect of temperature	Immune challenge x Population CAUSAL < AUSEI	Immune challenge decreased activity in CAUSAL but not in AUSEI fish	Marginally antagonistic effects of multiple stressors on activity and Inter-population variability.
	Sociability (PCA axis 2)	Immune challenge alone	Immune challenge decreased sociability (in AUSEI)	Immune challenge x Population CAUSAL > AUSEI	Immune challenge decreased sociability in AUSEI but not in CAUSAL fish	Immune stressor alone decreased sociability but high inter-population variability
	Survival	Temperature x Immune challenge	Multiple stressors effect only	NS	No variability	Multiple stressors had marginally synergistic effects on survival

4.1. SINGLE STRESSOR EFFECTS

Increased temperature alone had limited effects at the molecular and cellular level, but strong consequences at the individual level. More specifically, temperature alone did not affect oxidative stress, DNA damage, immune response nor available energy in muscles, contrary to our expectations (Vinagre et al. 2012; Madeira et al. 2013) (Dittmar et al. 2014; Gandar et al. 2017). It is possible that the experimental temperature alone and/or the duration of treatment were not high enough to trigger significant physiological responses because 24°C is slightly under the upper limit of the gudgeon (27°C). Alternatively, it is possible that captivity induced stress that would mask the effects of temperature, which is consistent with the high basal levels of oxidative stress and DNA

damage observed (17% of DNA damage rate compared to 5% usually found) (Anitha et al. 2000; Santos et al. 2014; Cheng et al. 2018). At the individual level, high temperature decreased body condition and increased activity as expected. This suggests that high temperature caused energy reallocation from the liver and gonads (decreased HSI and GSI) to maintain energy reserves in muscles (Anacleto et al. 2018), and sustain locomotion, foraging and survival (Gerry and Ellerby 2014; Bonneaud et al. 2016; Sacristán et al. 2017). Accordingly, in our study, survival rate did not decrease under high temperature alone.

The immune challenge alone caused a significant local immune response as expected (Ellis 2001). Although this immune challenge does not entirely reflect the pathogenic effects of parasites, it triggered a costly immune response that is likely to affect other traits across biological levels. However, the immune challenge did not influence oxidative stress index, available energy in muscles nor condition indices at the molecular and cellular levels. It is possible that the chosen immune challenge was not strong enough to cause significant physiological adjustments and/or that the timing of measure did not enable us to detect it. Whatever the underlying mechanism, this is consistent with the absence of increased DNA damage measured by the comet assay. This suggests either that the energetic cost of the immune challenge was limited and/or that individuals could compensate the increased energy demand by changing their behaviour (Wingfield 2003). Accordingly, at the individual level, the immune challenge triggered a decrease of general activity in fish from the CAUSAL population and decreased sociability in fish from the AUSEI population. This is consistent with a sickness behaviour, which usually allows saving energy for immunity (Volkoff and Peter 2004; Bonneaud et al. 2016; Kirsten et al. 2018) and avoid pathogen spread (i.e. “behavioural resistance”) (Barber et al. 2000). Survival was not affected by the immune challenge alone.

Taken together, these results suggest that single stressors (increased temperature or immune challenge alone) had limited detrimental effects at the molecular and cellular levels but triggered changes in energy allocation between traits and organs that could allow fish to maintain homeostasis and limit short-term mortality. This suggests that fish are able to set up adequate physiological responses to face environmentally realistic single stressors with limited effects on fitness. However, such physiological processes could be altered when facing multiple stressors.

4.2. MULTIPLE STRESSORS

Combined thermal and immune stressors caused complex interactive effects, but mostly at the individual level. At the molecular level, multiple stressors had no significant combined effects on oxidative stress nor DNA damage. In our study, the integrative oxidative stress index represents the ratio between damage caused by ROS and the non-enzymatic antioxidant capacity of the plasma. The level of both damage caused by ROS (i.e. ROM) and non-enzymatic antioxidant capacity was not significantly different among treatments. This suggests that in our study, fish exposed to multiple stressors appear capable to maintain the balance between anti-oxidant defences and ROS production. Nevertheless, measuring more precisely others traits related to the enzymatic antioxidant capacity of the plasma (such as superoxide dismutase, catalase or glutathione peroxidase activity) could reflect more accurately the antioxidant defences against ROS production during the stress response and highlight potential physiological adjustment at the molecular level. (e.g. Gandar et al. 2017)

At the cellular level, multiple stressors had no significant combined effects on the local immune response. This could be due to a low effect of each single stressor on the local immune response, or to the chosen immune trait that is not sensitive enough. In both cases, it would thus be interesting to measure other immune traits such as leukocyte counts, oxidative burst or immune gene expression that could be more sensitive to stress exposure (Dittmar et al. 2014; Jolly et al. 2014).

Interestingly, we found significant combined effect of stressors at high level of organisation. Behaviour was particularly sensitive: general activity (i.e. activity, exploration and foraging) decreased in fish exposed to combined stressors. More specifically, temperature strongly increased fish general activity in control saline-injected fish as expected, but this effect of temperature was not significant in immune-challenged fish. This suggests an antagonistic effect of temperature and immune challenge, which could be explained by opposite effects of both stressors on behaviour. Indeed, temperature generally increases activity, sociability and foraging due to increased metabolism (Johansen and Jones 2011; Bartolini et al. 2015; Colchen et al. 2016). On the contrary, pathogens and immune challenges generally decrease these traits due to sickness behaviour, allowing to save energy for immunity (Johnson 2002; Bonneaud et al. 2003; Volkoff and Peter 2004). In the wild, such antagonistic effects of multiple stressors could

have important consequences on population persistence. For instance, increased general activity caused by temperature increase allows fish to find more food to sustain the energetic demand of accelerated metabolism (Brett 1971; Nowicki et al. 2012). Our results suggest that concomitant exposure to pathogens and/or immune challenges could inhibit this behavioural response and potentially modify behavioural strategies set up to cope with single stressor exposure.

In this context, such antagonistic effects of multiple stressors could thus limit the ability of fish to sustain their energy expenditure and significantly reduce their fitness. Accordingly, in our study, we observed strong decrease in survival of fish exposed to combined stressors (30% decrease). Although further studies are needed to understand the underpinning mechanisms, our results suggest that multiple stressors effects could thus have far reaching consequences for individual fitness and population dynamics in the wild. For these reasons combined effects of stressors at individual level and mostly on behaviour should be considered in future studies.

In our study fish were not exposed to pathogens in order to standardise immune challenges and avoid potential pathogenic effects of parasites (Seppala and Jokela 2011). It is likely that pathogen effects would even be higher than immune challenge effects. In addition, high temperature can increase pathogen prevalence and virulence, which could also amplify detrimental effects of multiple stressors. Taken together, these results also underline the importance of taking into account biotic stressors (here pathogens), because they could strongly affect the response to other abiotic stressors (here temperature). This could help better predicting population responses to human-altered environments.

4.3. VARIABILITY BETWEEN POPULATIONS

Interestingly, the two chosen populations exhibited strong differences in basal physiological parameters and in physiological responses. More precisely, CAUSAL fish exhibited a higher level of oxidative stress and DNA damage compared to AUSEI fish. This suggests that CAUSAL fish could be more sensitive to captivity and/or have been exposed to higher levels of stressors in the wild before they were captured, but further studies on F1 and F2 fish are now necessary to explore the underlying mechanisms.

In addition, populations had different responses to immune challenge but not to temperature, contrary to our expectations. Thermal regime of capture sites could be too similar to induce differences, although we chose sites with similar contrasts as previous

studies (Dittmar et al. 2014). Alternatively, other environmental parameters could differ between sites, and further studies on a higher number of sites are now necessary. Interestingly, populations strongly differed in their response to the immune challenge. These differences could be due to different exposure or costs of infection in the wild (Scharsack et al. 2016), but sites had similar macroparasite prevalence and mean infection intensity which does not support this hypothesis. It is however possible that other parasites were not detected (microparasites).

Interestingly, populations differed in the behavioural traits responding to the immune challenge: CAUSAL fish decreased their general activity, while AUSEI fish reduced their sociability. Hence, our results suggest that different populations could have evolved different behavioural strategies and adjust different behavioural traits (activity/exploration or sociability) to face pathogens. Similarly, Dingemanse et al. (2007) and Bell et al. (2010) found that biotic stressors (predators) could shape behavioural response and syndrome among populations of three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). However, in our case the costs and benefits of such combinations of behavioural traits (i.e. behavioural syndromes) on fitness remains to be formally tested.

Whatever the underlying mechanisms, our results highlight the importance of taking into account the inter-population variability to better predict stressor effects in the wild. However, in our study, we only tested two populations and many other environmental factors besides temperature could differ between sites. Further studies on a higher number of replicate populations are now in progress to disentangle the effects of multiple environmental stressors.

5. Conclusion

We found significant interactive effects of multiple stressors (combined temperature and immune challenge) but only at high levels of biological organisation (i.e. on behaviour and survival). This suggests that multiple stressors could have unexpected antagonistic effects on behaviour, and potential synergistic detrimental effects on fish survival and fitness. However, the underlying mechanisms remain to be elucidated, because no interaction effect was found at the molecular and cellular levels on the studied traits. This

highlights the importance of taking into account biotic stressors such as pathogens to understand complex effect of multiple stressors on aquatic organisms. In addition, populations varied in their response to the immune challenge, suggesting alternative behavioural strategies to face pathogens. This highlights the importance of taking into account inter-population variability to better understand the effect of current and future stressors in the wild.

Compliance with ethical standards

All experimental procedures were conducted in compliance with French and European legislation for animal experimentation (European directive 2010/63/UE). Fish capture was conducted under the authorization PE 2017-001 and fish were treated for parasites according to the prescription 2529, VetoFish. Experimental procedures were conducted under the French animal handler's certificate (N° 31-103), the establishment approval for vertebrate experimentation N°A3113002, and were approved by the ethical committee n°073 (authorization n°8538).

Acknowledgements

We thank reviewers for constructive comments. This work was supported by a grant from the water agency Adour-Garonne and by the French national programme CNRS EC2CO-Ecodyn (PHYPAT). We thank Myriam Cousseau, Corinne Pautot, Sandrine Papillon, Michel le Hénaff, Sylvie Bony, Alain Devaux, Océane Morrisseau, Laura Madeline, and the technical service of INP-ENSAT for technical assistance. This work was financially supported by the water agency Adour-Garonne (Agence de l'Eau Adour-Garonne AEAG) and the CNRS french national program EC2CO-Ecodyn (PHYPAT project). QP was supported by doctoral grants of the French Ministry of Higher Education and Research. The EDB laboratory is part of the French Laboratory of Excellence "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest

References

- Alberti A, Bolognini L, Macciantelli D, Caratelli M (2000) Tanithahe radical cation of N, N-diethyl-para-phenylendiamine: a possible indicator of oxidative stress in biological samples. *Res Chem Intermed* 26:253–267. DOI: 10.1163/156856700X00769
- Anacleto P, Figueiredo C, Baptista M, et al (2018) Fish energy budget under ocean warming and flame retardant exposure. *Environ Res* 164:186–196. DOI: 10.1016/j.envres.2018.02.023
- Anitha B, Chandra N, Gopinath PM, Durairaj G (2000) Genotoxicity evaluation of heat shock in gold fish (*Carassius auratus*). *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen* 469:1–8. DOI: 10.1016/S1383-5718(00)00029-2
- Ardia DR, Clotfelter ED (2006) The novel application of an immunological technique reveals the immunosuppressive effect of phytoestrogens in *Betta splendens*. *J Fish Biol* 68:144–149. DOI:10.1111/j.1095-8649.2006.00962.x
- Bagni M, Civitareale C, Priori A, et al (2007) Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263:52–60. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2006.07.049
- Bakke TA, Cable J, Harris PD (2007) The Biology of Gyrodactylid Monogeneans: The “Russian-Doll Killers.” In: *Advances in Parasitology*. Elsevier, pp 161–460. DOI: 10.1016/S0065-308X(06)64003-7
- Barber I, Hoare D, Krause J (2000) Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Rev Fish Biol Fish* 10:131–165. DOI: 10.1023/A:1016658224470
- Bartolini T, Butail S, Porfiri M (2015) Temperature influences sociality and activity of freshwater fish. *Environ Biol Fishes* 98:825–832. DOI: 10.1007/s10641-014-0318-8
- Bates D, Maechler M, Bolker B, et al (2015) Package ‘lme4.’ Convergence 12. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/lme4/index.html>. Access date: September 2019
- Beaulieu M, Ropert-Coudert Y, Le Maho Y, et al (2010) Foraging in an oxidative environment: relationship between ¹³C values and oxidative status in Adelie penguins. *Proc R Soc B Biol Sci* 277:1087–1092. DOI: 10.1098/rspb.2009.1881
- Bell AM, Henderson L, Huntingford FA (2010) Behavioral and respiratory responses to stressors in multiple populations of three-spined sticklebacks that differ in predation pressure. *J Comp Physiol B* 180:211–220. DOI: 10.1007/s00360-009-0395-8
- Benhaïm D, Ferrari S, Chatain B, Bégout M-L (2016) The shy prefer familiar congeners. *Behav Processes* 126:113–120. DOI: 10.1016/j.beproc.2016.03.008

- Beniston M, Stephenson DB, Christensen OB, et al (2007) Future extreme events in European climate: an exploration of regional climate model projections. *Clim Change* 81:71–95. DOI: 10.1007/s10584-006-9226-z
- Bervoets L, Blust R (2003) Metal concentrations in water, sediment and gudgeon (*Gobio gobio*) from a pollution gradient: relationship with fish condition factor. *Environ Pollut* 126:9–19. DOI: 10.1016/S0269-7491(03)00173-8
- Birnie-Gauvin K, Costantini D, Cooke SJ, Willmore WG (2017) A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. *Fish Fish* 18:928–942. DOI: 10.1111/faf.12215
- Blumstein DT, Daniel JC, Bryant AA (2001) Anti-Predator Behavior of Vancouver Island Marmots: Using Congeners to Evaluate Abilities of a Critically Endangered Mammal. *Ethology* 107:1–14. DOI: 10.1046/j.1439-0310.2001.00631.x
- Bonneaud C, Mazuc J, Gonzalez G, et al (2003) Assessing the Cost of Mounting an Immune Response. *Am Nat* 161:367–379. DOI: 10.1086/346134
- Bonneaud C, Wilson RS, Seebacher F (2016) Immune-challenged fish up-regulate their metabolic scope to support locomotion. *PloS One* 11(11):e0166028. DOI:10.1371/journal.pone.0166028
- Brett JR (1971) Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Am Zool* 11:99–113
- Buchmann K, Lindenstrøm T (2002) Interactions between monogenean parasites and their fish hosts. *Int J Parasitol* 32:309–319. DOI: 10.1016/S0020-7519(01)00332-0
- Cable J, Barber I, Boag B, et al (2017) Global change, parasite transmission and disease control: lessons from ecology. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372:20160088. DOI: 10.1098/rstb.2016.0088
- Calfee RD, Puglis HJ, Little EE, et al (2016) Quantifying Fish Swimming Behavior in Response to Acute Exposure of Aqueous Copper Using Computer Assisted Video and Digital Image Analysis. *J Vis Exp*. DOI: 10.3791/53477
- Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY (1995) Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J Fish Biol* 47:775–787. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1995.tb06002.x
- Cheng C-H, Guo Z-X, Luo S-W, Wang A-L (2018) Effects of high temperature on biochemical parameters, oxidative stress, DNA damage and apoptosis of pufferfish (*Takifugu obscurus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 150:190–198. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.12.045
- Colchen T, Teletchea F, Fontaine P, Pasquet A (2016) Temperature modifies activity, inter-individual relationships and group structure in fish. *Curr Zool* zow048. DOI: 10.1093/cz/zow048
- Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair. *Mol Biotechnol* 26:249. DOI: 10.1385/MB:26:3:249

Cossins AR, Bowler K (1987) *Temperature Biology of Animals*. Springer Netherlands, Dordrecht

Costantini D, Dell’Omo G (2006) Effects of T-cell-mediated immune response on avian oxidative stress. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 145:137–142. DOI: 10.1016/j.cbpa.2006.06.002

Côté IM, Darling ES, Brown CJ (2016) Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proc R Soc B Biol Sci* 283:20152592. DOI: 10.1098/rspb.2015.2592

Crozier LG, Hutchings JA (2014) Plastic and evolutionary responses to climate change in fish. *Evol Appl* 7:68–87. DOI: 10.1111/eva.12135

De Coen WM, Janssen CR (1997) The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J Aquat Ecosyst Stress Recovery* 6:43–55. DOI: 10.1023/A:1008228517955

Del Re AC (2013) Compute.es: compute effect sizes. R package version 0.2–2. Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages/compute.es>. Access date: September 2019

Dingemanse NJ, Wright J, Kazem AJN, et al (2007) Behavioural syndromes differ predictably between 12 populations of three-spined stickleback. *J Anim Ecol* 76:1128–1138. DOI: 10.1111/j.1365-2656.2007.01284.x

Dittmar J, Janssen H, Kuske A, et al (2014) Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *J Anim Ecol* 83:744–757. DOI: 10.1111/1365-2656.12175

Eizaguirre C, Lenz TL, Sommerfeld RD, et al (2011) Parasite diversity, patterns of MHC II variation and olfactory based mate choice in diverging three-spined stickleback ecotypes. *Evol Ecol* 25:605–622. DOI: 10.1007/s10682-010-9424-z

Eizaguirre C, Yeates SE, Lenz TL, et al (2009) MHC-based mate choice combines good genes and maintenance of MHC polymorphism. *Mol Ecol* 18:3316–3329. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04243.x

Ellis AE (2001) Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol* 25:827–839. DOI: 10.1016/S0145-305X(01)00038-6

Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408:239–247. DOI: 10.1038/35041687

Fourtune L, Paz-Vinas I, Loot G, et al (2016) Lessons from the fish: a multi-species analysis reveals common processes underlying similar species-genetic diversity correlations. *Freshw Biol* 61:1830–1845. DOI: 10.1111/fwb.12826

Gandar A, Jean S, Canal J, et al (2016) Multistress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism. *Environ Sci Pollut Res* 23:3184–3194. DOI: 10.1007/s11356-015-5147-6

- Gandar A, Laffaille P, Canlet C, et al (2017) Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 188:60–72. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.089
- Gerry SP, Ellerby DJ (2014) Resolving shifting patterns of muscle energy use in swimming fish. *PloS One* 9(8):e106030. DOI: 10.1371/journal.pone.0106030
- Gomes S, Scott-Fordsmand J, Amorim M (2015) Cellular Energy Allocation to Assess the Impact of Nanomaterials on Soil Invertebrates (Enchytraeids): The Effect of Cu and Ag. *Int J Environ Res Public Health* 12:6858–6878. DOI: 10.3390/ijerph120606858
- Gurevitch J, Morrison JA, Hedges LV (2000) The Interaction between Competition and Predation: A Meta-analysis of Field Experiments. *Am Nat* 155:435–453. DOI: 10.1086/303337
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2015) *Free radicals in biology and medicine*. Fifth edition. Oxford University Press. Oxford, United Kingdom
- Hedges LV, Gurevitch J, Curtis PS (1999) The Meta-Analysis of Response Ratios in Experimental Ecology. *Ecology* 80:1150. DOI: 10.2307/177062
- Herborn KA, Coffey J, Larcombe SD, et al (2011) Oxidative profile varies with personality in European greenfinches. *J Exp Biol* 214:1732–1739. DOI: 10.1242/jeb.051383
- Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, et al (2010) The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. *Science* 330:1503–1509. DOI: 10.1126/science.1194442
- Hoogenboom MO, Metcalfe NB, Groothuis TGG, et al (2012) Relationship between oxidative stress and circulating testosterone and cortisol in pre-spawning female brown trout. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 163:379–387. DOI: 10.1016/j.cbpa.2012.07.002
- Isaksson C (2013) Opposing effects on glutathione and reactive oxygen metabolites of sex, habitat, and spring date, but no effect of increased breeding density in great tits (*Parus major*). *Ecol Evol* 3:2730–2738. DOI: 10.1002/ece3.663
- Jacquín L, Dybwad C, Rolshausen G, et al (2017) Evolutionary and immediate effects of crude-oil pollution: depression of exploratory behaviour across populations of Trinidadian guppies. *Anim Cogn* 20:97–108. DOI: 10.1007/s10071-016-1027-9
- Johansen JL, Jones GP (2011) Increasing ocean temperature reduces the metabolic performance and swimming ability of coral reef damselfishes: temperature effects on reef fish performance. *Glob Change Biol* 17:2971–2979. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2011.02436.x
- Johnson RW (2002) The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet Immunol Immunopathol* 87:443–450. DOI: 10.1016/S0165-2427(02)00069-7

- Jolly S, Jaffal A, Delahaut L, et al (2014) Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environ Sci Pollut Res* 21:13103–13117. DOI: 10.1007/s11356-014-3227-7
- Keith P, Persat H, Feunteun E, Allardi J (2011) *Les Poissons d'eau douce de France*. Second edition. Biotope. Paris, France
- Kirsten K, Fior D, Kreutz LC, Barcellos LJG (2018) First description of behavior and immune system relationship in fish. *Sci Rep* 8:846. DOI: 10.1038/s41598-018-19276-3
- Lange K, Bruder A, Matthaei CD, et al (2018) Multiple-stressor effects on freshwater fish: Importance of taxonomy and life stage. *Fish Fish* 19:974–983. DOI: 10.1111/faf.12305
- Le Guernic A, Sanchez W, Palluel O, et al (2016) Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25:1478–1499. DOI: 10.1007/s10646-016-1699-6
- Lenth R, Love J, Hervé M (2017) Package 'emmeans.' *Underst Stat* 34:216–21. Available from: <https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html>. Access date: September 2019
- Loot G, Reyjol Y, Poulet N, et al (2007) Effects of small weirs on fish parasite communities. *Parasitol Res* 101:1265–1276. DOI: 10.1007/s00436-007-0632-6
- Lopez-Luna J, Al-Jubouri Q, Al-Nuaimy W, Sneddon LU (2017) Impact of stress, fear and anxiety on the nociceptive responses of larval zebrafish. *PLOS ONE* 12(8):e0181010. DOI: 10.1371/journal.pone.0181010
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101:13–30. DOI: 10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Macnab V, Barber I (2012) Some (worms) like it hot: fish parasites grow faster in warmer water, and alter host thermal preferences. *Glob Change Biol* 18:1540–1548. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2011.02595.x
- Madeira D, Narciso L, Cabral HN, et al (2013) Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 166:237–243. DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.06.008
- Magnadóttir B (2006) Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol* 20:137–151. DOI: 10.1016/j.fsi.2004.09.006
- Malev O, Šrut M, Maguire I, et al (2010) Genotoxic, physiological and immunological effects caused by temperature increase, air exposure or food deprivation in freshwater crayfish *Astacus leptodactylus*. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* 152:433–443. DOI: 10.1016/j.cbpc.2010.07.006
- Marcogliese DJ, Brambilla LG, Gagné F, Gendron AD (2005) Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Dis Aquat Organ* 63:77–84. DOI: 10.3354/dao063077

- Marentette JR, Corkum LD (2008) Does the reproductive status of male round gobies (*Neogobius melanostomus*) influence their response to conspecific odours? *Environ Biol Fishes* 81:447–455. DOI: 10.1007/s10641-007-9240-7
- Martin LB, Han P, Lewittes J, et al (2006) Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. *Funct Ecol* 20:290–299. DOI: 10.1111/j.1365-2435.2006.01094.x
- Martins ML, Xu DH, Shoemaker CA, Klesius PH (2011) Temperature effects on immune response and hematological parameters of channel catfish *Ictalurus punctatus* vaccinated with live theronts of *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol* 31:774–780. DOI: 10.1016/j.fsi.2011.07.015
- Maule AG, Schreck CB (1990) Changes in Numbers of Leukocytes in Immune Organs of Juvenile Coho Salmon after Acute Stress or Cortisol Treatment. *J Aquat Anim Health* 2:298–304. DOI: 10.1577/1548-8667(1990)002<0298:CINOLI>2.3.CO;2
- Nilsson S (1983) *Autonomic Nerve Function in the Vertebrates*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg
- Nowicki JP, Miller GM, Munday PL (2012) Interactive effects of elevated temperature and CO₂ on foraging behavior of juvenile coral reef fish. *J Exp Mar Biol Ecol* 412:46–51. DOI: 10.1016/j.jembe.2011.10.020
- O'Connor CM, Reddon AR, Marsh-Rollo SE, et al (2014) A comparative study of an innate immune response in Lamprologine cichlid fishes. *Naturwissenschaften* 101:839–849. DOI: 10.1007/s00114-014-1225-8
- Otálora-Ardila A, Flores-Martínez JJ, Welch Jr KC (2016) Metabolic cost of the activation of immune response in the fish-eating myotis (*Myotis vivesi*): the effects of inflammation and the acute phase response. *PloS One* 11(10):e0164938. DOI: 10.1371/journal.pone.0164938
- Pearson MP, Stevens ED (1991) Size and hematological impact of the splenic erythrocyte reservoir in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Physiol Biochem* 9:39–50. DOI: 10.1007/BF01987610
- Preston DL, Mischler JA, Townsend AR, Johnson PTJ (2016) Disease Ecology Meets Ecosystem Science. *Ecosystems* 19:737–748. DOI: 10.1007/s10021-016-9965-2
- Preynat-Seauve O, Coudurier S, Favier A, et al (2003) Oxidative stress impairs intracellular events involved in antigen processing and presentation to T cells. *Cell Stress Chaperones* 8:162. DOI: 10.1379/1466-1268(2003)008<0162:OSIIEI>2.0.CO;2
- R Core Team (2013). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <http://www.R-project.org/>. Access date: September 2019
- Rosemberg DB, Rico EP, Mussulini BHM, et al (2011) Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments. *PLoS ONE* 6(5):e19397. DOI: 10.1371/journal.pone.0019397

- Sacristán HJ, Rodríguez YE, De los Angeles Pereira N, et al (2017) Energy reserves mobilization: Strategies of three decapod species. PLOS ONE 12(9):e0184060. DOI: 10.1371/journal.pone.0184060
- Santos R, Aude J, Olivier P, et al (2016) Characterization of a genotoxicity biomarker in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): Biotic variability and integration in a battery of biomarkers for environmental monitoring. Environ Toxicol 31:415–426. DOI: 10.1002/tox.22055
- Santos R, Mélissa P-L, Aurélien B, et al (2014) Kinetic response of a genotoxicity biomarker in the three-spined stickleback and implication for environmental monitoring. Ecotoxicol Environ Saf 102:6–11. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.01.006
- Scharsack JP, Franke F, Erin NI, et al (2016) Effects of environmental variation on host–parasite interaction in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). Zoology 119:375–383. DOI: 10.1016/j.zool.2016.05.008
- Schinegger R, Palt M, Segurado P, Schmutz S (2016) Untangling the effects of multiple human stressors and their impacts on fish assemblages in European running waters. Sci Total Environ 573:1079–1088. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2016.08.143
- Schreck CB, Tort L, Farrell AP, Brauner CJ (2016) Biology of stress in fish. First edition. Academic Press. Amsterdam, Netherlands
- Seppala O, Jokela J (2011) Immune defence under extreme ambient temperature. Biol Lett 7:119–122. DOI: 10.1098/rsbl.2010.0459
- Shinn C, Blanchet S, Loot G, et al (2015) Phenotypic variation as an indicator of pesticide stress in gudgeon: Accounting for confounding factors in the wild. Sci Total Environ 538:733–742. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2015.08.081
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res 175:184–191. DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0.
- Smits JE, Bortolotti GR, Tella JL (1999) Simplifying the phytohaemagglutinin skin-testing technique in studies of avian immunocompetence. Funct Ecol 13:567–572. doi: 10.1046/j.1365-2435.1999.00338.x
- Stumbo AD, Goater CP, Hontela A (2012) Parasite-induced oxidative stress in liver tissue of fathead minnows exposed to trematode cercariae. Parasitology 139:1666–1671. DOI: 10.1017/S0031182012001023
- Sulmon C, van Baaren J, Cabello-Hurtado F, et al (2015) Abiotic stressors and stress responses: What commonalities appear between species across biological organization levels? Environ Pollut 202:66–77. DOI: 10.1016/j.envpol.2015.03.013
- Swain P, Nayak S, Nanda P, Dash S (2008) Biological effects of bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) in fish: A review. Fish Shellfish Immunol 25:191–201. DOI: 10.1016/j.fsi.2008.04.009

- Swindle EJ, Metcalfe DD (2007) The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunol Rev* 217:186–205. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00513.x
- Tella JL, Lemus JA, Carrete M, Blanco G (2008) The PHA Test Reflects Acquired T-Cell Mediated Immunocompetence in Birds. *PLoS ONE* 3(9):e3295. DOI: 10.1371/journal.pone.0003295
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206–221. DOI: 10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J
- Tissot L, Souchon Y (2010) Synthèse des tolérances thermiques des principales espèces de poissons des rivières et fleuves de plaine de l'ouest européen. *Hydroécologie Appliquée* 17:17–76. DOI: 10.1051/hydro/2010004
- Toomey MB, Butler MW, McGraw KJ (2010) Immune-system activation depletes retinal carotenoids in house finches (*Carpodacus mexicanus*). *J Exp Biol* 213:1709–1716. DOI: 10.1242/jeb.041004
- Vélez-Espino LA, Fox MG, McLaughlin RL (2006) Characterization of elasticity patterns of North American freshwater fishes. *Can J Fish Aquat Sci* 63:2050–2066. DOI: 10.1139/f06-093
- Vinagre C, Madeira D, Narciso L, et al (2012) Effect of temperature on oxidative stress in fish: Lipid peroxidation and catalase activity in the muscle of juvenile seabass, *Dicentrarchus labrax*. *Ecol Indic* 23:274–279. DOI: 10.1016/j.ecolind.2012.04.009
- Volkoff H, Peter RE (2004) Effects of lipopolysaccharide treatment on feeding of goldfish: role of appetite-regulating peptides. *Brain Res* 998:139–147. DOI: 10.1016/j.brainres.2003.11.011
- Winandy L, Denoël M (2015) The aggressive personality of an introduced fish affects foraging behavior in a polymorphic newt. *Behav Ecol* 26:1528–1536. DOI: 10.1093/beheco/arv101
- Wingfield JC (2003) Control of behavioural strategies for capricious environments. *Anim Behav* 66:807–816. DOI: 10.1006/anbe.2003.2298
- Wong BBM, Candolin U (2015) Behavioral responses to changing environments. *Behav Ecol* 26:665–673. DOI: 10.1093/beheco/aru183

Supporting materials

*Table S3. Correlation, mean and standard error of body condition indices. GSI=Gonadosomatic Index, HSI=Hepatosomatic index, SSI= Splenosomatic index and daily mass change represent the percentage change of mass between start and end of exposure (7-days). p-values are computed using spearman rank correlation test and adjusted by Bonferroni correction. p-value thresholds are represented by stars as follow : $p < 0.001 = ***$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.05 = *$*

		n	Mean	se	Correlations		
					1	2	3
1	GSI	64	2.16	0.28			
2	HSI	64	0.79	0.04	0.33**		
3	SSI	64	0.16	0.009	0.01	0.1	
4	Daily mass change	64	-0.60	0.06	0.09	0.49***	0.06

Table S4. Correlation, mean and standard error of behavioral traits. p-values are computed using spearman rank correlation test and adjusted by bonferroni correction. p-value thresholds are represented by stars as follow : $p < 0.001 = ***$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.05 = *$

	n	Mean	Se	Correlations					
				1	2	3	4	5	6
1 Time spent on swimming	67	28.87	1.94						
2 Time spent in central area	67	3.03	0.47	0.47***					
3 Number of encounter between individuals	67	18.09	1.47	-0.29*	-0.55***				
4 Time spent in water column	67	1.97	0.58	0.66***	0.32**	-0.40***			
5 Latency to foraging	67	81.78	9.75	-0.27*	-0.41***	0.31**	-0.35**		
6 Number of foraging event	67	3.30	0.17	0.36***	0.39**	-0.22	0.32**	-0.55***	
7 Average Nearest Neighbor distance (ANND)	67	8.64	0.64	-0.06	0.13	-0.36**	0.03	0.09	-0.15

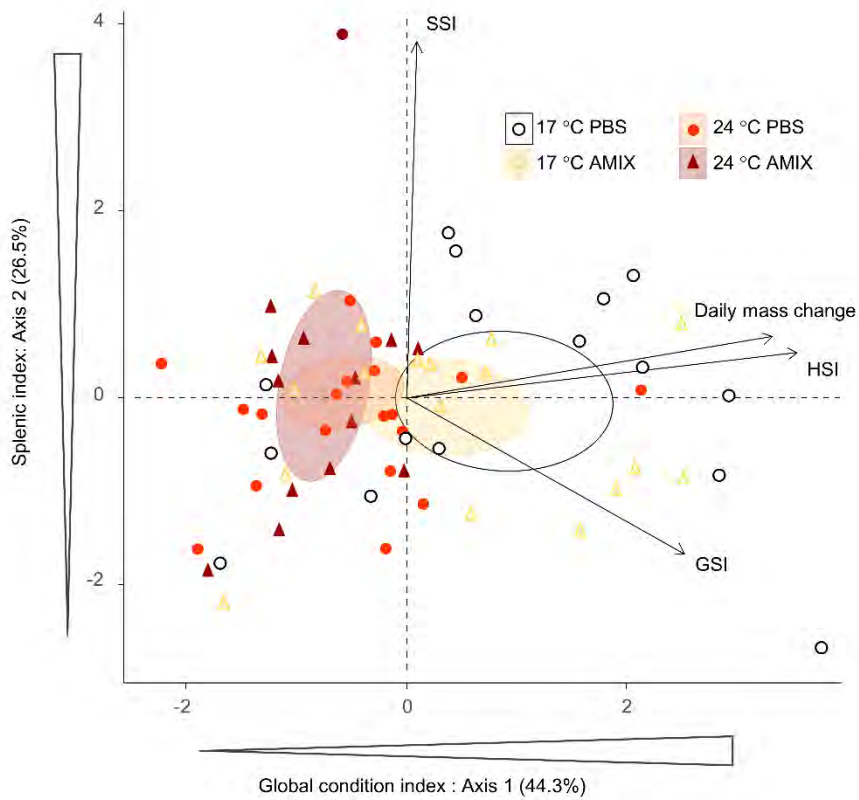



Figure S4. PCA of body condition indices of fish exposed to multiple stressors (each dot represents an individual). Graphical representation shows the temperature and immune treatment groups (populations are pooled). Dots and triangles represent individuals exposed to treatments (Control, white dots: 17°C PBS; thermal stress only, orange dots: 24°C PBS; immune challenge only, yellow triangles: 17°C AMIX; combined stressors, red triangles: 24°C AMIX). ellipses represent the 95% confidence interval of each treatments groups



CHAPITRE 6

COMBINED EFFECTS OF CONTAMINANTS AND IMMUNE CHALLENGE IN GUDGEON POPULATIONS



Résumé du chapitre

Dans les chapitres précédents nous avons montré que le challenge immunitaire, mimant une attaque parasitaire, induisait le déclenchement de la réponse immunitaire des poissons et modulait leur comportement. De plus, le challenge immunitaire interagissait avec la température de l'eau, en particulier aux échelles d'organisation élevées (i.e. échelle individuelle, comportement et survie) en inhibant les ajustements comportementaux des poissons, suggérant en partie la mise en place d'une stratégie de conservation.

Dans ce chapitre, nous avons testé les effets combinés d'un challenge immunitaire et de la contamination par des éléments trace métalliques (ETMs). Les ETMs sont, avec la température, parmi les facteurs de stress les plus observés dans les hydro-systèmes d'eau douce (Hamilton et al., 2017). Parmi ces contaminants, nous nous sommes focalisés sur le cadmium (Cd), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn), car ils s'agissaient des métaux les plus couramment retrouvés dans les cours d'eau étudiés. De plus, ces métaux sont connus pour leur effets immunotoxiques (Khangarot et al., 1999; Lugo et al., 2006; Zelikoff et al., 1995), pro-oxydants (Jena et al., 2009; Roméo et al., 2000; Sanchez et al., 2005), et leurs effets sur le métabolisme énergétique (Pistole et al., 2008; Ransberry et al., 2015) et le comportement des poissons (Ellgaard et al., 1978; Henry and Atchison, 1986). La contamination est donc susceptible d'interagir avec le challenge immunitaire de manière inattendue. De plus, des études ont montré que l'historique d'exposition des poissons pouvaient moduler leur sensibilité à la contamination (Whitehead et al., 2017).

Ce chapitre vise à évaluer les effets combinés d'une contamination réaliste de l'eau par un mélange d'ETMs et un challenge immunitaire mimant une attaque parasitaire dans différentes populations de poissons prélevées le long d'un gradient de contamination. Nous avons émis l'**hypothèse** que les facteurs de **stress simples** induiraient la mise en place d'une **stratégie de compensation** (i.e. effets sur l'immunité, les réserves énergétiques, le stress oxydant mais peu d'effets sur la survie). Au contraire, dans le cadre d'une exposition aux **stress multiples**, nous nous attendons à la mise en place d'une **stratégie de conservation** (i.e.,


inhibition des réponses physiologiques des poissons et présence d'effets complexes à l'échelle individuelle, notamment sur le comportement). Enfin, une **forte variabilité de réponses entre populations** est attendue en réponse à la contamination, potentiellement en lien avec l'historique d'exposition des populations de poissons.

Afin de tester ces hypothèses, nous avons échantillonné 4 populations de goujons (*Gobio occitaniae*) le long du gradient de contamination (peu contaminé à très contaminé) décrit dans le chapitre 3 et d'une cinquième population provenant de pisciculture (i.e. milieu de référence non contaminé). Les poissons ont ensuite été exposés à un mélange de Cd-Cu-Zn à des concentrations environnementales réalistes et/ou à un challenge immunitaire (i.e. mixture d'antigènes PHA et LPS) en suivant un plan factoriel complet. Une mesure de traits sélectionnés a été réalisée à différentes échelles d'organisation biologique, à savoir : aux échelles cellulaire (i.e. bioaccumulation, immunité, stress oxydant, réserves énergétiques) ainsi qu'à l'échelle individuelle (i.e. comportement et survie).

Les résultats indiquent que la contamination aux ETMs seule entraînait la production de stress oxydant et, bien que population dépendante, une perte de masse et une stimulation de l'activité et de l'exploration des poissons significatives. En outre, le challenge immunitaire seul, induisait le déclenchement de la réponse immunitaire ainsi que la production de stress oxydant, avec des conséquences délétères sur le comportement et la survie des poissons. Ces résultats sont partiellement en accord avec la mise en place d'une **stratégie de compensation face à un stress simple**. Néanmoins le taux de mortalité significatif (8%) observé sous l'influence du challenge immunitaire seul suppose que le stress immunitaire subi est relativement fort et peut donc aussi avoir des effets délétères.

Au contraire, l'exposition aux **stress multiples** n'avait que peu d'effets aux échelles d'organisation les plus fines, mais affectait l'**activité** des poissons de manière **antagoniste**. Plus particulièrement, et en accord avec les résultats du chapitre 5, le challenge immunitaire inhibait l'effet des contaminants sur l'activité de nage des poissons, et ce chez toutes les populations. Ces résultats ne sont que partiellement en accord avec la mise en place d'une **stratégie de conservation sous stress combinés**.

En résumé, nous avons trouvé peu d'effets combinés des facteurs de stress par rapport à nos attentes, en particulier au niveau des échelles d'organisation fines mais les stress multiples altéraient les réponses comportementales des poissons de manière significative, en accord avec le chapitre 5. Ces résultats suggèrent que les stress multiples tendent à inhiber la réponse comportementale des poissons. De plus, les réponses des populations face à un stress simple peuvent fortement varier, potentiellement en lien avec l'histoire évolutive des populations. Des



tests complémentaires sont maintenant nécessaires afin de confirmer le lien entre l'historique d'exposition des populations et le caractère adaptatif de ces réponses. Dans tous les cas, cette étude souligne l'importance de prendre en compte le comportement, et la variabilité de réponses entre populations afin de mieux comprendre les effets des stress simples sur les poissons. Enfin, l'exposition aux stress multiples annulait certaines réponses plastiques observées sous stress simples. Ces résultats suggèrent la mise en place de réponses plastiques maladaptatives sous stress multiples, avec des conséquences délétères attendues sur la persistance des populations.

Combined effects of metals mixture and immune challenge in 5 gudgeon populations.

Quentin Petitjean^{1,2}, Lisa Jacquin², Louna Riem^{1,2}, Mathilde Pitout¹, Annie Perrault¹, Myriam Cousseau¹, Pascal Laffaille¹, Séverine Jean¹

¹ Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement, UMR5245 Ecolab, Université de Toulouse, CNRS, INPT, UPS, 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

² Laboratoire Evolution et Diversité Biologique, UMR5174 EDB, Université de Toulouse, CNRS, IRD, UPS, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France.

ABSTRACT

Wild organisms are increasingly exposed to multiple anthropogenic and natural stressors that can interact in complex ways and lead to unexpected effects. In aquatic ecosystems, contamination by trace metals has deleterious effects on fish health and commonly co-occurs with pathogens, which affect similar physiological and behavioral traits. However, the combined effects of metal contamination and parasitism are still poorly known. In addition, the sensitivity to multiple stressors could be highly variable among different fish populations depending on their evolutionary history, but this intraspecific variability is rarely taken into account in existing ecotoxicological studies. Here, we investigated i) the interactive effects of metal contamination (i.e., realistic mixture of Cd, Cu and Zn) and immune challenge mimicking a parasite attack on fish health across biological levels. In addition, we compared ii) the physiological and behavioral responses among five populations of gudgeon fish (*Gobio occitaniae*) having evolved along a gradient of metal contamination. Results show that single stressors exposure resulted in an increase of immune defenses and oxidative stress at the expense of body mass (contamination) or fish swimming activity (immune challenge). Multiple stressors had fewer interactive effects than expected, especially on physiological traits, but mainly resulted in antagonistic effects on fish swimming activity. Indeed, the immune challenge modified or inhibited the effects of contamination on fish behavior in most populations, suggesting that multiple stressors could reduce behavioral plasticity. Interestingly, the effects of stressors were highly variable among populations, with lower deleterious effects of metal contamination in populations from highly contaminated environments, although the underlying evolutionary mechanisms remain to be investigated. This study highlights the importance of considering multiple stressors effects and intraspecific variability of sensitivity to refine our ability to predict the effects of environmental contaminants on aquatic wildlife.

Keywords : Multiple Stressors; Evolutionary-Ecotoxicology; Metabolic strategy; Fish Behavior; Human-altered rivers

1. Introduction

Aquatic vertebrates such as freshwater fish are increasingly impacted by human activities (Harrison et al., 2018; WWF, 2018). Recent studies suggest that this could be related to the co-occurrence of multiple stressors in human-altered ecosystems (Reid et al., 2019), such as contaminants and nutrients inputs, temperature increase and emerging pathogens (Birk et al., 2020; Nõges et al., 2016; Schäfer et al., 2016; Schinegger et al., 2016). Indeed, multiple stressors can have complex interactive effects on individuals and ecosystems and result in more severe or mitigated consequences than single stressors, leading to unexpected effects (Christensen et al., 2006; Lange et al., 2018; Schinegger et al., 2016). For instance, concomitant exposure to organic contaminants and parasites may synergistically decrease fish survival (Kelly et al., 2010). On the contrary, the negative effect of organic contaminants on amphibians' metamorphosis may be inhibited by nutrient enrichment resulting in antagonistic effects (Boone and Bridges-Britton, 2006).

Among the most frequent stressors identified in aquatic systems, contamination by organic and inorganic compounds is recognized as a major threat to wild fish populations (Hamilton et al., 2017). More particularly, trace metal elements such as Cadmium (Cd), Copper (Cu) and Zinc (Zn) used for industrial purposes and pest management are continuously released into the environment. Metal contamination of water and sediments has deleterious effects on fish physiology (e.g., immune response, oxidative stress, energy use) (Guardiola et al., 2013; Lushchak, 2011; Pretto et al., 2014; Xu et al., 2018), body condition (Hopkins et al., 2004), behavior (Jacquin et al., 2020; Scott and Sloman, 2004) and ultimately survival (Wood et al., 2012, 2011). In addition, global changes (e.g., climate change, invasive species, contamination) can also affect the occurrence and severity of infection by emerging and re-emerging pathogens in aquatic environments (Mennerat et al., 2010; Peeler and Feist, 2011). For instance, temperature increase due to climate change and the introduction of new disease agents due to invasive species might increasingly expose fish to pathogens (Marcogliese, 2001; Peeler and Feist, 2011) and hence to costly immune challenges (Lochmiller and

Deerenberg, 2000; Sheldon and Verhulst, 1996). Although the effects of parasites and their associated immune challenges have been extensively studied in fish (Magnadóttir, 2010), their combined effects with contamination are still overlooked (but see Defo et al., 2019; Marcogliese et al., 2005; Renick et al., 2016; H. Zhao et al., 2020), thereby hindering our ability to reliably predict the impact of multiple stressors in the wild.

Because contaminants and parasitism may affect the same physiological and behavioral traits, they are expected to have complex interactive effects (see chapter 1: Introduction). For instance, metal contamination can either stimulate (Khangarot et al., 1999; Le Guernic et al., 2016; Prabakaran et al., 2006) or depress fish immune response (Aliko et al., 2018; Dautremepuits et al., 2004; Jolly et al., 2014), while parasitism generally has an immunostimulatory effect associated with a costly inflammatory response (Bonneaud et al., 2003; Magnadóttir, 2006; Sheldon and Verhulst, 1996). More globally, physiological defenses against both metal contamination and immune challenges induce oxidative stress and are energetically demanding (Lushchak, 2011; Marcogliese and Pietrock, 2011). The combination of contamination and immune challenge might thus result in complex interactive effects and induce synergistic (i.e., amplifying), or antagonistic (i.e., inhibiting) changes in immunity, oxidative stress and energy reserves, with ultimate consequences for fish survival and fitness.

Fish behavior is also expected to be very sensitive to multiple stressors (Scott and Sloman, 2004; Wong and Candolin, 2015). Indeed, contamination can alter fish swimming activity and sociability (Martin et al., 2017; Tomkins et al., 2018; Zhou and Weis, 1998) due to neurotoxic, endocrine-disrupting effects and energy reallocations (Clotfelter et al., 2004; Jacquin et al., 2020; J. Zhao et al., 2020). Likewise, immune challenges generally trigger a "sickness behavior" (Adelman and Martin, 2009; Dantzer, 2004; Johnson, 2002), resulting in a reduction of investment in routine behaviors such as swimming activity, foraging, and sociability, which could save energy for costly immune responses (Kirsten et al., 2018; Volkoff and Peter, 2004). The combination of contamination and immune challenges is thus likely to result in complex interactive effects on behavior, depending on stress levels, individuals' energy state, and past exposure to stressors (Barber and Wright, 2005; Montiglio and Royauté, 2014).

However, the type of interaction (e.g., synergistic, antagonistic) and the expected outcomes of multiple stressors for fish survival and fitness remain challenging to predict. Over the last decade, a conceptual framework has been proposed to characterize the effects of moderate or single vs. acute or multiple stressors on fish based on metabolism and energy management (McEwen and Wingfield, 2010; Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013). First, under moderate or single stress, a "compensation strategy" could be set up resulting in energy reallocation towards physiological defenses (e.g., immunity and antioxidants) at the expense of energy reserves and routine behaviors (Bonneaud et al., 2003; King and Swanson, 2013; Pi et al., 2016). Although potentially costly, mounting efficient physiological defenses is expected to maintain homeostasis and limit the adverse effects of stressors on fish survival and fitness (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013).

In contrast, under acute or multiple stressors, the energetic demand for physiological defenses could exceed the organism's aerobic capacity, resulting in metabolic depression (Guppy and Withers, 1999; Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013). This "conservation strategy" is characterized by an inhibition of physiological defenses, a reduction in metabolic activity, and limited depletion of energy reserves, with potentially detrimental consequences on cell damage and fish survival on a longer time scale (Petitjean et al., 2019; Sokolova et al., 2012; Sokolova, 2013). However, few empirical studies experimentally tested these predictions, especially in a multistress framework (but see Gandar et al., 2017, 2016).

Besides, this theoretical framework does not take into account the intraspecific variability of stress responses among wild populations, especially when they have evolved in environments with contrasted contamination levels. For instance, Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations having evolved under various environmental conditions display different sensitivity to inorganic (Klerks and Weis, 1987) and organic contamination (Whitehead et al., 2017), temperature, salinity and pH (Schulte, 2014). These differences in sensitivity can be due to the selection of particular genotypes (Reid et al., 2016) and/or to different phenotypic plasticity, which can sometimes result in local adaptation to contamination (Mulvey et al., 2003; Nacci et al., 1999). However, intraspecific variability in stress responses is still rarely considered, and its consequences for adaptation to multiple stressors are largely unknown.

In this study, we investigated the interactive effects of a realistic metal contamination (i.e., mixture of Cd, Cu, Zn found in a contaminated river) and immune challenge (i.e., antigen mixture mimicking a parasite attack) on several key physiological (i.e., metal bioaccumulation, immunity, oxidative stress, energy reserves) and behavioral traits (i.e., swimming activity, sociability, foraging), as well as their consequences for fish survival using an experimental approach. We also tested the intraspecific variability of responses to these multiple stressors by comparing the responses of five gudgeon (*Gobio occitaniae*) populations having evolved along a gradient of metal contamination. Following the "metabolic strategy" framework, we expected single stressors to trigger a "compensation strategy", i.e., increased investment in physiological defenses at the expense of energy reserves or behavior. We also expected multiple stressors to trigger a "conservation strategy", i.e., inhibition of physiological and/or behavioral adjustments, with deleterious effects on fish survival. Besides, we expected fish from the most contaminated sites to be less sensitive to experimental contamination.

2. Material and Methods

2.1. MODEL SPECIES AND SAMPLING SITES

The gudgeon (*Gobio occitaniae*) is a widely distributed fish species in the Garonne watershed (South-West France). Within this area, gudgeons populations are exposed to various levels of contaminants (mostly trace metal elements and, to a lesser extent, pesticides) (see Chapter 2: Materiel & Methodes and Shinn et al., 2015) and parasitism (mostly monogenean ectoparasites such as gyrodactylids and to a lesser extent copepods and nematodes) (Loot et al., 2007), which can contribute to phenotypic variability (Knapen et al., 2004; Shinn et al., 2015). We used the database from Adour-Garonne Water Agency (SIE, 2016) to calculate a Toxic Unit based on metals concentrations measured between 2012 and 2016 in a set of 16 sampling sites previously characterized (see Chapter 2: Materiel & Methodes). Among them, we selected four sampling sites (ARIMAS, CELCAB, AUSEI and RIOU) that differed in terms of metal contamination, mostly due to different levels of Cd, Cu and Zn contamination (Table 2 from the Chapter 2: Materiel & Methodes and Table S5). We

also added a reference population originating from a fish farm where metal concentrations are low (Les Viviez de Haute Correze, VHC, Le Bourg, 19340 Courteix, France, named FARM) (Table 12).

Table 12. Characteristics of the sampling site and sample sizes in each population and experimental treatment. Mean water Cd, Cu and Zn water concentrations over 4 years (corresponding to the life duration of gudgeon) were obtained from the Water Agency

Sampling sites	Lat.	Long.	Trace metal concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$) \pm SD				Experimental treatment and sample sizes			
			Cd	Cu	Zn	TU	Control (NC-PBS)	Contamination alone (C-PBS)	Immune challenge alone (NC-AMIX)	Multiple stressors (C-AMIX)
FARM	2°20'9.125 5" E	45°38'50.02 69" N	0.007 \pm 0.002	2.05 \pm 0.96	5.95 \pm 2.83	-0.9	20	20	20	20
ARIMAS	1°22'26.14 94" E	43°5'2.4677 " N	0.05 \pm 0.06	1.49 \pm 1.31	4.54 \pm 2.35	-0.9	15	20	20	20
CELCAB	1°39'27.80 50" E	44°30'27.58 36" N	0.05 \pm 0.02	0.99 \pm 0.92	5.73 \pm 5.27	-0.8	10	15	10	15
AUSEI	1°19'38.29 22" E	43°39'11.35 98" N	0.05 \pm 0.03	6.47 \pm 12.7	25.6 \pm 27.5	-0.3	30	30	35	45
RIOU	2°12'41.36 80" E	44°33'55.45 80" N	13.2 \pm 8.87	2.57 \pm 1.84	629 \pm 521	1.3	15	15	20	15

Contamination treatment corresponds to a metal mixture of Cd, Cu and Zn with adjusted concentrations reaching the highest concentrations recorded at contaminated sites (RIOU and AUSEI): 14 $\mu\text{g. L}^{-1}$, 10 $\mu\text{g. L}^{-1}$ and 600 $\mu\text{g. L}^{-1}$, respectively

Immune challenge corresponds to a mixture of two antigens (90 μg of LPS and 90 μg of PHA in 10 μL) injected at the caudal peduncle of fish

2.2. EXPERIMENTAL DESIGN

A total of 516 gudgeons were caught and brought to the laboratory in early spring 2018. Among them, 169, 88, 94, and 68 gudgeons were caught by electrofishing using an EFKO-FEG 1500 in AUSEI, ARIMAS, RIOU, and CELCAB, respectively, and 97 fish were collected in a fish farm (FARM). Fish were then acclimated for 30 days and treated using Praziquantel (Vetofish, France, purity: 1000 mg.g^{-1} ; concentration: 3 mg.L^{-1}) to eliminate most commonly detected parasites (i.e., monogenean) and standardize their immune status. After acclimation (30 days), 106 fish were not involved in the experiment because they were too small (< 6cm) or died during acclimation or tagging. Hence, 410 remaining fish between 6 and 14 cm of length were involved in the experiment (140, 75, 65, 50, and 80 fish from AUSEI, ARIMAS, RIOU, CELCAB, and FARM, respectively). During the experimental procedure, fish were held by groups of five individuals in experimental tanks (50x30x30 cm) at a constant temperature (17-

18°C) under a day: night cycle photoperiod of 12:12h. Fish were fed daily (about 1% of biomass per tank) (Flammarion et al., 1998; Kestemont et al., 1991) with commercial fish food (JBL Propond Sterlet S pellets). Fish were randomly exposed to four different treatments (Table 12): The control group without stressor (NC-PBS: n = 90) was not exposed to contamination (NC) and was injected with a neutral Phosphate Buffered Saline solution (PBS); the contamination alone group (C-PBS: n = 100, see below for details); the immune challenge alone group, was challenged with a mixture of antigens (see below for details) (NC-AMIX: n = 105); and the multiple stressors group exposed to both contamination and immune challenge (C-AMIX: n = 115). There was no difference in fish sex ratio ($\chi^2 = 2.53$, $p = 0.47$), mass (8.64 ± 4.77 g; Anova: $F = 0.21$, $p = 0.89$) nor size (9.4 ± 1.7 cm; Anova: $F = 0.57$, $p = 0.63$) among treatments.

For the contamination treatment, we used a mixture of the three trace metal elements that contributed the most to the Toxic Unit in a set of 16 sampling sites previously studied (see Table 2 from the Chapter 2: Materiel & Methodes and Table S5). The metal mixture was composed of Cd, Cu and Zn chloride (CdCl_2 , CuCl_2 and ZnCl_2 , Thermo fisher scientific, purity: 99.99%) and concentrations were adjusted to approximately reach the highest concentrations recorded at contaminated sites (RIOU and AUSEI): $14 \mu\text{g. L}^{-1}$, $10 \mu\text{g. L}^{-1}$ and $600 \mu\text{g. L}^{-1}$, respectively (Table 12). Half of the water was renewed every two days to ensure constant contamination levels under static exposure. The experimental contamination's reliability was checked by measuring exposure concentrations in random water samples for both non-contaminated (n = 29) and contaminated (n = 47) tanks. In non-contaminated tanks, Cd, Cu and Zn average concentrations reached $0.007 \pm 0.005 \mu\text{g.L}^{-1}$, $0.62 \pm 0.15 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $4.06 \pm 0.79 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively. In contaminated tanks, contamination levels reached $13.5 \pm 1.31 \mu\text{g.L}^{-1}$, $9.96 \pm 1.50 \mu\text{g.L}^{-1}$ and $551 \pm 45.2 \mu\text{g.L}^{-1}$ respectively.

Seven days after the exposure to metal contamination, half of the fish were exposed to an immune challenge using $10 \mu\text{L}$ of a mixture of antigens (AMIX) injected in the caudal peduncle to mimic parasite attack. These fish were injected with an antigen mixture (AMIX) of phytohaemagglutinin (PHA, Phaseolus vulgaris phytohaemagglutinin-P, L8754 Sigma-Aldrich - $90 \mu\text{g.} 10 \mu\text{L}^{-1}$) and lipopolysaccharide (LPS, Escherichia coli, serotype: O111: B4, L2830 Sigma-Aldrich - $90 \mu\text{g.} 10 \mu\text{L}^{-1}$) following previous studies in vertebrates, including fish (Ardia and Clotfelter, 2006;

Otálora-Ardila et al., 2016; Toomey et al., 2010). Seven days later, fish were weighed, measured and euthanized using an anesthetic overdose (benzocaine, 150 mg.L⁻¹) and blood and organs were collected for sex determination and further analyses. Fish blood was sampled at the caudal vein in heparinized syringes (1 mL Terumo syringe, 0.45x13 mm needle). Immediately after blood collection, blood smears were made in order to count immune cells (Neutrophils/Lymphocytes ratio). The remaining amount of blood was centrifuged (4°C, 2000g) for 10 min to retrieve blood plasma. Plasma was kept at -20 °C for subsequent oxidative damage and antioxidant capacity assays. Liver and gonad were weighed (+/- 1 mg) to calculate condition indices. The fish muscle was aliquoted and the first part was kept at -20 °C for measurement of metal bioaccumulation while the second part was immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for measurement of available energy. The survival rate was recorded at the end of the experiment (14-days).

In total, 10 to 45 fish per treatment and population were measured (Table 12). However, due to differential survival rates among treatments and populations and difficulties in collecting blood or tissue on small individuals, sample sizes can vary across treatment (see Table S6 for detailed sample size) and populations.

2.3. CELLULAR-LEVEL

2.3.1. Metal bioaccumulation in muscle

For metal assay, muscle was freeze-dried, homogenized using Fastprep®-24 homogenizer and analyzed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Agilent 7500ce) after hot acidic mineralization in HNO₃ (67-69%, Trace Metal Grade, Fisher Chemical). We assessed the reliability of the analyses using TORT-3 certified reference material. Metal recovery reached an average of 105 ± 6.1%, 82 ± 15.2%, 107 ± 5.7% for Cd, Cu, and Zn, respectively.

2.3.2. Neutrophils/Lymphocytes immune ratio

We used the Neutrophils/Lymphocytes ratio (N/L immune ratio) in fish blood as a marker of immune response because neutrophils are important modulators of inflammation (Rosales, 2018) and the number of neutrophils increases and lymphocytes

decreases under stress and infection (reviewed in Davis et al., 2008). The relative abundance of neutrophils and lymphocytes was assessed using blood smears stained with May Grunwald-Giemsa solution as described in (see Chapter 3: direct and indirect effects of stressors on gudgeon health).

2.3.3. Local immune response

An important skin swelling caused by antigen injection reflects high investments in immune defense (i.e., inflammation and T-cells proliferation) and is recognized as a reliable measure of local immunocompetence (i.e., local immune response) in a variety of vertebrates, including fish (Ardia and Clotfelter, 2006; O'Connor et al., 2014; Tella et al., 2008). Skin swelling was assessed by measuring the caudal peduncle's thickness in each fish following a previous study in gudgeon (see Chapter 4: cost of immune response). The intra-individual repeatability of thickness measurement reached $99.6 \pm 0.8\%$ and $99.8 \pm 1.3\%$ before and after injection, respectively.

2.3.4. Oxidative stress index

We measured the antioxidant capacity and oxidative damage (OXY and DROM tests respectively, Diacron International, Grosseto, Italy) in fish plasma following previous studies in fish (Bagni et al., 2007; Hoogenboom et al., 2012 and Chapter 5: combined effects of temperature and immune challenge in gudgeon populations). For OXY test intra- and inter-plate repeatability were $91.1 \pm 7.3\%$ and $89.7 \pm 6.7\%$, respectively. For DROM test intra- and inter-plate repeatability were $84.9 \pm 12.5\%$ and $89.7 \pm 10.3\%$, respectively. We then calculated an index of oxidative stress using the ratio between oxidative damage divided by the antioxidant capacity (x1000) (Costantini and Dell'Omo, 2006; Herborn et al., 2011 and Chapter 5: combined effects of temperature and immune challenge in gudgeon populations)

2.3.5. Available energy in muscle

The available energy was assessed as the sum of total carbohydrates, lipid and protein contents in fish muscle following previous studies (De Coen and Janssen, 1997; Gandar

et al., 2017, 2016; Smolders et al., 2004). Concentrations of carbohydrate, protein and lipid were then transformed into energetic values using their enthalpy of combustion (17, 24 and 39.5 kJ.g⁻¹ respectively) and summed to obtain the available energy in muscle.

2.4. INDIVIDUAL-LEVEL

2.4.1. Condition index

Three condition indices were calculated to reflect fish general condition: the daily body mass change during the experiment, the hepatosomatic index (Chellappa et al., 1995), and the gonadosomatic index (Marentette and Corkum, 2008).

Because condition indices were partly correlated, we used a PCA to extract an integrative condition index from the first axis composed of the daily body mass change, HSI and GSI (51.5% of variance explained, see Fig. S5). Hence, fish with a higher condition index had a lower body mass loss and a higher HSI and GSI.

2.4.2. Behavioral traits

Fish behavior was analyzed using BORIS software (Friard and Gamba, 2016) four days after the immune challenge (AMIX injection), according to a previous study investigating behavioral effects of immune challenge in gudgeons (see Chapter 4: cost of immune response). Three behavioral traits were selected because they are commonly affected by stressors: swimming activity, foraging and sociability (Barber et al., 2000; Jacquin et al., 2017; Kirsten et al., 2018; Koltes, 1985; Little and Finger, 1990).

Briefly, fish were tagged using visible implant elastomers (Northwest Marine Technologies, Inc., Shaw Island, Washington) before the experiment in order to allow individual identification. Four days after the immune challenge (AMIX or PBS injection) fish behavior was measured in their experimental tank to limit stress. For this purpose, two sets of videos were recorded in a row using Webcam Logitech C922 Pro Stream (30 fps, 1080p) and analyzed using Boris software (Friard and Gamba, 2016). The first set of video records started after 5 minutes of acclimation and allowed to measure fish swimming activity and sociability for 10 minutes based on previous

studies (Jacquin et al., 2017; Lopez-Luna et al., 2017). The tank was virtually divided in 6 areas of 25 cm² to measure fish activity as the time spent swimming, the number of crossed lines (the 6 area borders) and the number of visited areas for 10 minutes (Calfee et al., 2016; Jacquin et al., 2017). Sociability was assessed using the number of encounters between individuals (i.e., number of times an individual touches another individual with the head) and the average nearest neighbor distance (ANND) (Bartolini et al., 2015; Colchen et al., 2016). The ANND corresponds to the average distance between the nearest neighbor and the focal individual on 21 measures (one measure every 30 seconds for 10 minutes). So that, a lower ANND reflects lower distances between individuals and hence higher sociability (Bartolini et al., 2015; Colchen et al., 2016). The second set of video records started with the distribution of a standardized quantity of fish food (i.e., 15 items) in each tank in order to measure fish foraging behavior (Nowicki et al., 2012; Winandy and Denoël, 2015). Foraging behavior was assessed by counting the number of pellets eaten by each fish and the latency to forage after food distribution (Winandy and Denoël, 2015).

Because behavioral traits were partly correlated, we used a PCA to extract three synthetic indices. The first behavioral index was named "general activity" (PCA axis 1, 41% of variance explained, see Fig. S6). Fish with a higher general activity index on the first PCA axis swam for a longer time and across more areas. The second behavioral index was named "Foraging" (PCA axis 2 multiplied by -1, 20.6% of variance explained, see Fig. S6). Hence, fish with a higher foraging index displayed a higher motivation to feed (i.e., low latency to forage time) and a higher number of food items ingested. The third synthetic index was named "Sociability" (PCA axis 3 multiplied by -1, 16.7% of variance explained, see Fig. S7). Hence, fish with a higher sociability index displayed a higher number of contacts with their counterparts and a lower ANND, reflecting higher sociability.

2.5. STATISTICS

To test the effects of treatments and populations, we used linear mixed-effect models (LMM; lme4 package, Bates et al., 2015) on each trait: metal (i.e., Cd, Cu, Zn) bioaccumulation (log-transformed and scaled), N/L immune ratio (log-transformed), local immune response (skin swelling), available energy in fish muscle (log-

transformed), general condition index (first condition PCA axis), oxidative stress index (sqrt-transformed), behavioral traits (i.e., general activity, foraging and sociability). The effect of treatments on survival was tested using generalized linear mixed-effects models with a binomial distribution (lme4 package, Bates et al., 2015). The trial and the replicate tank were included as random effects in models. Contamination treatment (Non-Contaminated - NC vs. Contaminated - C), immune challenge treatment (PBS vs. AMIX injection), the population of origin and third and second-order interactions were included as fixed factors. Best models were then selected by eliminating non-significant variables starting with interactions (stepwise model selection; see Table 13). Body size and sex were also added as covariates in all models but removed from final models when non-significant. When interactions were significant, we used contrast posthoc analyses (emmeans package, Lenth et al., 2017) with False Discovery Rate adjustment to analyze pairwise differences between fish groups (Benjamini and Hochberg, 1995) with 5% as a significance threshold.

To compare the effects-size of single vs. multiple stressors, we computed standardized effect sizes (compute.es package) Hedge's *g* and 95% confident interval (CI) from LMM model outputs (e.g., *z*-values or *t*-value) following methods described in Hedges et al. (1999) and Del Re (2013). When the interaction between stressors was significant, we also compared the magnitude of interactive vs. additive effects of multiple stressors following methods described in (Lange et al., 2018) in order to characterize the type of interaction involved (i.e., additive, synergistic or antagonistic) (see Chapter 5: combined effects of temperature and immune challenge in gudgeon populations). When interactions were reversal, corresponding to "mitigating synergism" (sensu Jackson et al., 2016; Piggott et al., 2015) we considered them as antagonistic since in both cases, the interactions resulted in an inhibition of single stressors effects (Crain et al., 2008; Folt et al., 1999). When multiple stressors effects varied among populations (i.e., triple interaction: contamination × immune challenge × population), we characterized the type of interaction by running separate models for each population. All analyses were performed with R, version 3.5.2 (R Development Core Team, 2018).

3. Results

3.1. CELLULAR-LEVEL

3.1.1. Metal bioaccumulation in muscle

At the cellular level, metal bioaccumulation was affected by the contamination alone in interaction with the population of origin (Fig. 37 and Table 13). Cu and Zn were not significantly accumulated (ANOVA, estimates (scaled log) = 0.002 ± 0.02 , $F = 0.006$, $p = 0.94$ and ANOVA, estimates (scaled log) = 0.001 ± 0.05 , $F = 0.0004$, $p = 0.99$, respectively). However, Cd bioaccumulation was significant in fish exposed to the experimental contamination, but this effect depended on the population considered (ANOVA, $F = 2.35$, $p = 0.059$) (Fig. 37 and Table 13). More specifically, contrast posthoc analyses show that fish originating from the farm (FARM) and the least contaminated site (ARIMAS) displayed a significant increase of Cd concentration in their muscle when exposed to the experimental contamination compared to the control group (FARM-NC-PBS mean (scaled log): 0.50 ± 0.06 vs FARM-C-PBS mean (scaled log): 0.66 ± 0.12 , estimates (scaled log) = 0.48 ± 0.15 , $p = 0.01$ and ARIMAS-NC-PBS mean (scaled log): 0.42 ± 0.05 vs ARIMAS-C-PBS mean (scaled log): 0.87 ± 0.14 , estimates (scaled log) = 0.35 ± 0.14 , $p = 0.046$, respectively). In contrast, populations from the most contaminated sites (CELCAB; AUSEI, RIOU) displayed no significant accumulation of metals in their muscle when exposed to the experimental contamination (Fig. 38 A).

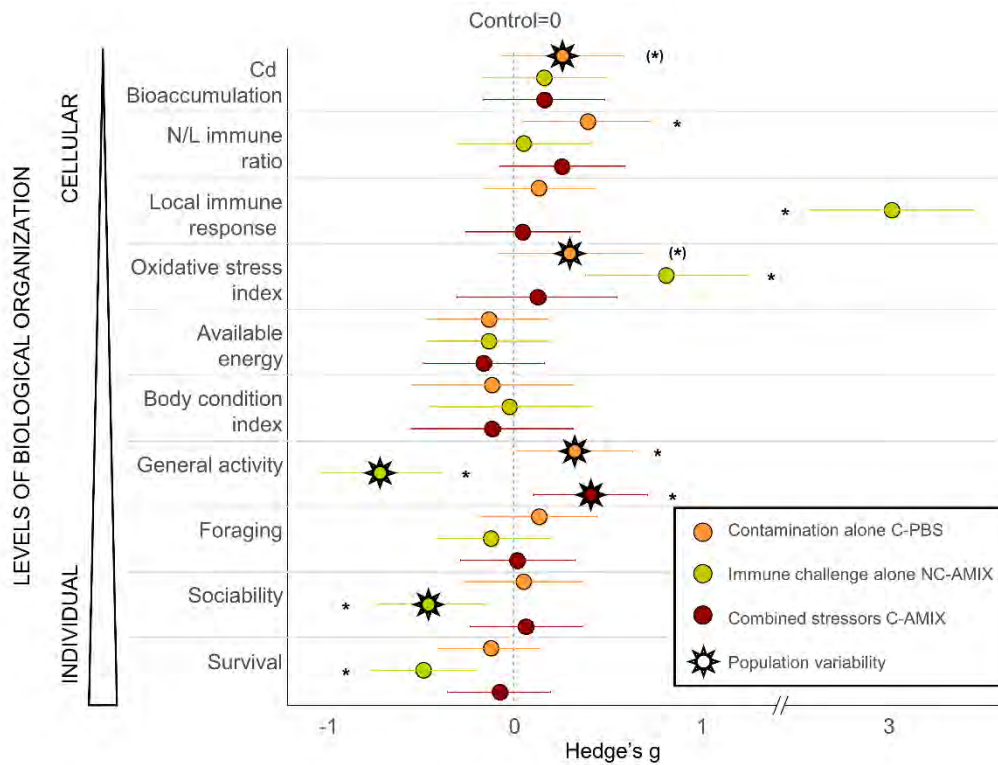


Figure 37. Effect size (hedge's g) and 95% confidence intervals (CI) of experimental treatments (contamination alone in orange: C-PBS; immune challenge alone in green: NC-AMIX; multiple stressors in red: C-AMIX) relative to the control group (NC-PBS: dashed vertical line), across biological levels from cells to the whole organism. When the 95% CI did not overlap 0 (control group), the treatment's effect was significant, as indicated by an asterisk. The asterisk between brackets indicates a marginally significant effect (lower bound: $-0.1 < 95\% \text{ CI} < 0.1$). Stars indicate significant variability among populations (population-by-treatment interaction).

3.1.2. Neutrophils/Lymphocytes immune ratio

The N/L immune ratio was affected by the contamination alone (Fig. 37 and Table 13). More particularly, fish exposed to contamination displayed an increase of neutrophils (ANOVA, estimate (log) = 0.27 ± 0.12 , $F = 5.4$, $p = 0.03$) and a decrease of lymphocytes count (ANOVA, estimate = -6.98 ± 2.47 , $F = 7.8$, $p = 0.01$), resulting in a significant increase of the N/L immune ratio (ANOVA, estimate (log) = 0.34 ± 0.15 , $F = 4.9$, $p = 0.03$).

Table 13. Summary of the results of linear mixed effect models testing the treatment and population effects across biological levels

Biological level	Trait	Statistics	Fixed factors						
			Contam.	Imm.	Pop.	Contam. : Pop	Imm.: Pop	Contam. : Imm.	Contam. : Imm.: Pop
<i>Cellular-level</i>	Cd bioaccumulation n = 301	F p	5.78 0.02	0.96 0.331	13.77 < 0.001	2.35 0.059	- -	- -	- -
	N/L immune ratio n = 273	F p	4.92 0.03	0.07 0.79	1.65 0.16	- -	- -	- -	- -
	Local immune response n = 362	F p	0.72 0.4	389 < 0.001	4.71 0.001	- -	- -	- -	- -
	Oxidative stress n = 188	F p	1.50 0.23	15 0.001	4.87 < 0.001	2.38 0.056	- -	- -	- -
	Available energy n = 302	F p	0.48 0.49	1.72 0.19	1.16 0.33	- -	- -	- -	- -
<i>Individual-level</i>	Condition index n = 311	F p	0.31 0.58	0.02 0.9	3.39 0.01	- -	- -	- -	- -
	General activity (PCA axis 1) n = 339	F p	11.42 < 0.001	0.04 0.9	12.3 < 0.001	9.11 < 0.001	4.58 0.001	4.08 0.045	6.92 < 0.001
	Foraging (PCA axis 2) n = 339	F p	0.7 0.4	0.6 0.4	1.5 0.2	- -	- -	- -	- -
	Sociability (PCA axis 3) n = 339	F p	0.06 0.8	1.5 0.2	12 < 0.001	- -	8.3 < 0.001	- -	- -
	Survival n = 410	χ^2 p	0.6 0.44	21.4 < 0.001	27.6 < 0.001	- -	- -	- -	- -

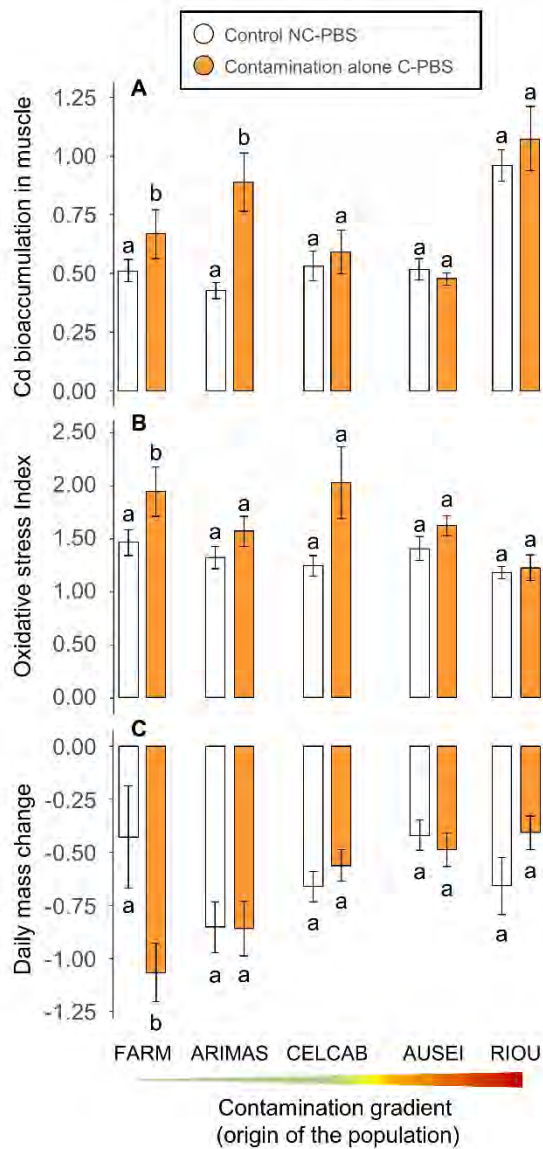


Figure 38. Effects of contamination alone (white bars, NC-PBS; orange bars, C-PBS) in different fish populations along a gradient of contamination. The contamination gradient in each population was determined using the toxic unit (TU), which ranged from -0.9 for the least contaminated FARM population to 1.3 for the most contaminated RIOU population (Table 12). A. Cd bioaccumulation in fish muscle (log-transformed and scaled $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), B. oxidative stress index (sqrt transformed index), and C. daily mass change of fish (percent changes per day). Error bars correspond to the SEM. Different letters above or below bars indicate significant differences between control and contamination treatments within each population after contrast posthoc analyses.

3.1.3. Local immune response

The local immune response was significantly affected by the immune challenge alone (Fig. 37 and Table 13). Indeed, fish injected with AMIX solution had a higher local immune response (i.e., skin swelling) than fish injected with control saline solution (PBS) whatever the population considered (ANOVA, estimate = 44.4 ± 2.2 , $F = 389$, $p < 0.001$).

3.1.4. Oxidative stress index

The oxidative stress index was significantly affected by single stressors (contamination and immune challenge alone) but not by multiple stressors (Fig. 37 and Table 13). The oxidative stress index increased marginally and in a population dependent manner in fish exposed to contamination (ANOVA, $F = 2.38$, $p = 0.056$) and significantly in immune-challenged fish (ANOVA, estimate (sqrt) = 0.44 ± 0.97 , $F = 15$, $p = 0.001$).

More particularly, contamination increased the level of oxidative damage (ANOVA, estimates = 0.16 ± 0.03 , $F = 24.9$, $p < 0.001$) but had no significant effect on the level of anti-oxidant defenses in fish plasma (ANOVA, estimates (sqrt) = 0.29 ± 0.41 , $F = 0.47$, $p = 0.5$). In addition, the effect of contamination differed among populations (Fig. 37 and Table 13). Indeed, only the FARM population displayed a significant increase of oxidative stress index through an increase of oxidative damage (Farm-NC-PBS mean (sqrt): 1.46 ± 0.12 vs Farm-C-PBS mean (sqrt): 1.94 ± 0.23 , estimates (sqrt): 0.79 ± 0.22 , $p = 0.002$) (Fig. 38 B). The immune challenge also increased the level of oxidative damage (ANOVA, estimates (log) = 0.15 ± 0.03 , $F = 18.1$, $p < 0.001$) but also decreased the level of anti-oxidant defenses in fish plasma (ANOVA, estimates (sqrt) = -0.78 ± 0.37 , $F = 3.9$, $p = 0.05$) and this effect was the same whatever the population considered (Fig. 37 and Table 13).

3.1.5. Available energy in muscle

The amount of total available energy (sum of lipids, proteins and carbohydrates) in fish muscle was not significantly affected by any stressor (Fig. 37 and Table 13). However, fish exposed to contamination alone had a higher amount of carbohydrates in their muscle (NC-PBS mean (log): 3.5 ± 0.09 vs C-PBS mean (log): 3.74 ± 0.08 , ANOVA, estimates (log) = 0.27 ± 0.08 , $F = 12$, $p = 0.002$) whatever the population considered.

3.2. INDIVIDUAL-LEVEL

3.2.1. Condition index

The integrative condition index was not significantly affected by any stressor (Fig. 37 and Table 13). However, contamination decreased body mass compared to control fish, but in a population-dependent manner (ANOVA, $F = 3.5$, $p = 0.009$). More specifically, the FARM population was the only population displaying a higher body mass loss when exposed to the experimental contamination compared to the control group (FARM-NC-PBS mean (sqrt): -0.43 ± 0.24 vs FARM-C-PBS mean (sqrt): -1.06 ± 0.14 , estimates (sqrt): -0.14 ± 0.04 , $p = 0.002$) (Fig. 38 C).

3.2.2. General activity

The general activity index was significantly affected by single and multiple stressors, but behavioral responses depended on the population considered (contamination \times immune challenge \times population interaction, Fig. 37 and Table 13). More particularly, the contamination alone (C-PBS) did not affect general activity in the least contaminated FARM and ARIMAS populations, but the experimental contamination increased fish general activity in CELCAB and the most contaminated AUSEI and RIOU populations compared to the control group (Fig. 39). The immune challenge alone decreased general activity in all populations except CELCAB and AUSEI (Fig. 39).

The effects of multiple stressors (C-AMIX group) were very variable depending on the population considered. There was no interactive effect of multiple stressors in FARM fish due to a dominant effect of the immune challenge (Hedge's $g = 0.53$, CI [-0.28; 1.34]) (Fig. 39). There was antagonistic interactions of multiple stressors in the CELCAB and AUSEI populations (CELCAB: Hedge's $g = -5.23$, CI [-7.18; -3.29]; AUSEI: Hedge's $g = -1.95$, CI [-2.54; -1.37]) and a "mitigating synergism" in ARIMAS (ARIMAS: Hedge's $g = 3.4$, CI [2.35; 4.50]), both resulting in a non-significant difference in general activity between fish exposed to multiple stressors compared to control (i.e., inhibiting effect), which is considered as antagonistic effect (Fig. 39). Finally, there was an additive effect of multiple stressors in the RIOU population (Hedge's $g = 0.23$ CI [-0.56; 1.02]). More specifically, both contamination and immune challenge had opposite effects on general activity in RIOU fish, resulting in similar swimming activity levels between the control (NC-PBS) and multiple stress (C-AMIX) group in RIOU fish (Fig. 39).

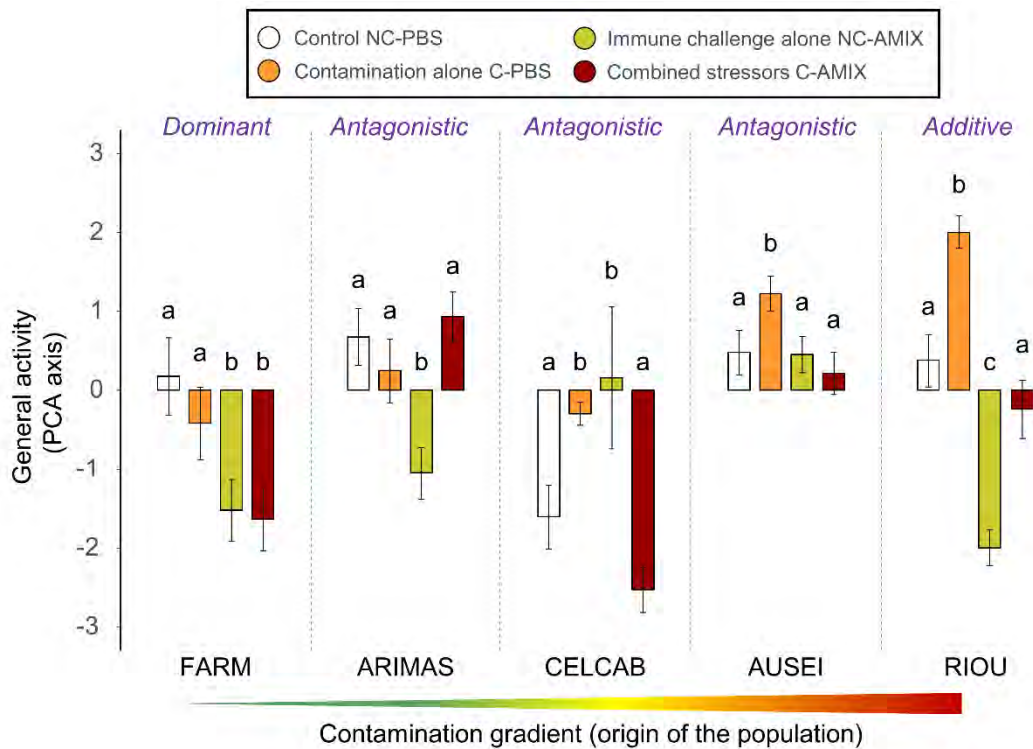


Figure 39. Mean (\pm SEM) general activity (first axis of PCA reflecting the time spent swimming, the number of lines crossed and the number of visited areas) of fish exposed to control condition (white bars, NC-PBS), contamination alone (orange bars, C-PBS), immune challenge alone (green bars, NC-AMIX), or combined contamination and immune challenge (red bars, C-AMIX) among fish populations. The fish populations were ranked according to the level of contamination recorded in their sampling site (contamination gradient determined using the toxic unit, ranged from -0.9 (FARM) to 1.3 (RIOU), Table 12). Different letters indicate significant differences between treatments within each population according to contrast analyses. The type of interaction (additive, antagonistic, synergistic) was tested following Lange et al. (2018) (see methods).

3.2.3. Foraging behavior

Foraging behavior index was not significantly affected by any treatment (Fig. 37 and Table 13). However, additional analyses on each trait indicate that the latency to forage increased in immune challenged fish (NC-PBS mean (log): 5.84 ± 0.12 vs NC-AMIX mean (log): 5.95 ± 0.15 , ANOVA, estimates (log) = 0.35 ± 0.13 , $F = 6.4$, $p = 0.01$) whatever the population considered. Similarly, the number of food items ingested by fish marginally decreased with the immune challenge (NC-PBS mean (log): 1.02 ± 0.10 vs NC-AMIX mean (log): 0.82 ± 0.09 , ANOVA, estimates (log) = -0.19 ± 0.09 , $F = 3.9$, $p = 0.054$).

3.2.4. Sociability behavior

Fish sociability index was affected by the immune challenge alone, but this effect varied among populations (ANOVA, $F = 8.3$, $p < 0.001$) (Fig. 37 and Table 13). More particularly, posthoc analyses show that sociability decreased in AMIX-injected fish from CELCAB (PCA axis 3, CELCAB-NC-PBS mean: 0.25 ± 0.15 vs CELCAB-NC-AMIX mean: -1.11 ± 0.54 , estimates = -1.58 ± 0.34 , $p < 0.001$) while it increased for fish from RIOU (PCA axis 3, RIOU-NC-PBS mean: -0.52 ± 0.36 vs RIOU-NC-AMIX mean: 0.32 ± 0.13 , estimates = 0.87 ± 0.31 , $p < 0.01$). Sociability was not significantly affected by any stressor in other populations.

3.2.5. Survival

Fish survival was significantly affected by the immune challenge alone but not by the contamination nor multiple stressors (Fig. 37 and Table 13). Indeed, AMIX-injected fish had a lower survival compared to control fish whatever the contamination treatment and whatever the population considered (NC-PBS: 81.1%, C-PBS: 85.0%, NC-AMIX: 69.5%, C-AMIX: 71.3%; ANOVA, estimates = -1.47 ± 0.32 , $\chi^2 = 21.4$, $p < 0.001$).

4. Discussion

In this study, we tested the effects of multiple stressors (i.e., metal contamination and immune challenge) on gudgeon health from cells to the whole organism in different populations having evolved along a gradient of metal contamination. Results show that each single stressors affected different key physiological and behavioral traits and that combined stressors had limited interactive effects excepted on behavior. In addition, there was a high interpopulation variability of physiological and behavioral responses to stressors (Table 14).

Table 14. Summary of the main results. Interactive effects of multiple stressors were observed at the individual level only. Populations responses differed depending on the trait considered.

Trait	Variable	Treatment effect	Population variability	Conclusion
Bioaccumulation	Cd bioaccumulation	Contamination	Yes	Contamination increased Cd bioaccumulation but only in the least contaminated FARM and ARIMAS populations
Immunity	N/L immune ratio	Contamination	No	Contamination alone increased N/L immune ratio whatever the population
	Local immune response	Immune challenge	No	Immune challenge increased local immune response whatever the population
Oxidative stress	Oxidative stress index	Contamination & immune challenge	Yes	Both contamination and immune challenge increased oxidative stress but in an independent manner, especially in the least contaminated FARM population
Energy reserves	Available energy in muscle	No effect	No	There was no effect of any treatment on the total available energy whatever the population
	Condition index	Contamination	Yes	Contamination decreased body mass in fish, especially in the FARM population
Behavior	General activity	Contamination : Immune challenge	Yes	Contamination and immune challenge had complex interactive effects on activity depending on the population (FARM & RIOU : no interaction ARIMAS, CELCAB & AUSEI: antagonism)
	Foraging	Immune challenge	No	The immune challenge alone increased the latency to forage whatever the population
	Sociability	Immune challenge	Yes	The immune challenge affected fish sociability depending on the population (decrease in CELCAB, increase in RIOU)
Fitness	Survival	Immune challenge	No	The immune challenge decreased fish survival whatever the population

4.1. SINGLE STRESSOR EFFECTS

The theoretical framework of metabolic strategies predicts that organisms react to a moderate or single stressor by setting up a "compensation strategy" characterized by increased investment in physiological defenses (immunity and antioxidant defense) at the expense of depletion of energy reserves and/or decrease in routine behaviors (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012). Our results do not show direct energetic costs of stressors but show significant physiological and behavioral changes, although some responses varied according to the population.

First, fish exposed to single stressors had increased immune defenses. Indeed, the experimental contamination alone increased the N/L immune ratio in all populations, as well as the bioaccumulation of Cd in the muscle of some populations. This suggests that the experimental contamination triggered an inflammatory response involving the recruitment of neutrophils due to the accumulation of toxic metals as shown in previous experimental studies (e.g., Aliko et al., 2018; Dautremepuits et al., 2004; Jolly et al., 2014; Xu et al., 2018) and in a previous field study in the same species (see Chapter 3: direct and indirect effects of stressors on gudgeon health). Similarly, the immune challenge alone triggered a significant local inflammatory response (i.e., skin swelling) reflecting a local infiltration of immune cells at the site of injection (Ardia and Clotfelter, 2006). However, no effect was detected on the N/L immune ratio, maybe because we missed the peak of immune cell recruitment at 7 days (Afonso et al., 1998; von Gersdorff Jørgensen, 2016). These results suggest that the exposure to a single stressor (i.e., experimental contamination or immune challenge alone) had an immunostimulatory effect and elicited a significant inflammatory response. This is likely to incur significant costs since inflammation is one of the most costly physiological defense (Bonneaud et al., 2003; Lochmiller and Deerenberg, 2000; Sheldon and Verhulst, 1996) in terms of oxidative stress production (Costantini and Dell’Omo, 2006; Costantini and Møller, 2009) and/or on energy reserves depletion (Bonneaud et al., 2003; Lochmiller and Deerenberg, 2000).

Accordingly, the fish exposed to both single stressors displayed a significant increase in oxidative stress index, mainly due to increased oxidative damage, which

was consistent with previous studies (Costantini and Møller, 2009; Fatima et al., 2000; Le Guernic et al., 2016). We also found that antioxidant defenses decreased in immune-challenged fish, suggesting that the immune challenge can trigger oxidative stress, with potential detrimental effects on fitness. Further studies are now needed to measure specifically other enzymatic antioxidant components (e.g., Catalase, Super-Oxide Dismutase), but our results suggest that exposure to single stressors incur a significant oxidative cost with potential consequences for fish fitness.

According to the “compensation strategy”, we expected depletion of energy reserves due to increased investment in physiological defenses. However, results were quite different depending on the stress considered. Indeed, the immune challenge alone had no effects on energy reserves and condition indices, suggesting limited energetic costs. In contrast, contamination alone caused a decrease in body mass, although only in FARM fish, without depleting available energy in muscle but instead increased carbohydrates. This might be explained by an increase in gluconeogenesis and/or glucose mobilization towards muscle to support locomotion under stressful conditions, as suggested in previous studies (Philp et al., 2005; Pretto et al., 2014; Weber et al., 2016).

Under a "compensation strategy", we also expected a decrease in routine behaviors to save energy for physiological defenses. Accordingly, the immune challenge decreased fish swimming activity and sociability, although in a population dependant manner, which could enable fish to save energy for immunity (i.e., "sickness behavior"; Adelman and Martin, 2009; Dantzer, 2004; Johnson, 2002). In contrast, contamination had the opposite effect and increased fish swimming activity, at least in some populations (i.e., CELCAB, AUSEI, RIOU). This increase in swimming activity under experimental contamination could be due to neurotoxic effects (Jacquin et al., 2020) but could also be linked to the increase in carbohydrates content in fish muscle and probably to cortisol secretions, as suggested in previous studies (Brun et al., 2019). Increased swimming activity could potentially have an adaptive value by increasing food acquisition in the wild, potentially compensating for the costs of detoxification, but this hypothesis remains to be tested.

Overall, our results show an increased investment in immune and antioxidant defenses with limited costs, which differ among the studied traits and the stress considered (i.e., body mass for contamination, swimming activity for immune challenge alone). This brings only partial support for the “compensation strategy” hypothesis. In addition, fish exposed to the immune challenge had decreased survival, suggesting that stress-induced physiological changes had significant fitness costs despite potential compensation. Also, body mass changes related to contamination depended on fish populations and fish involved in all experimental treatments, including the control group, lost weight during the experiment, suggesting that captivity itself might be significantly stressful for fish (Calisi and Bentley, 2009). Further in-situ approaches within rivers would be useful to investigate the costs of stressors in a realistic context.

4.2. MULTIPLE STRESSORS EFFECTS

Under multiple stressors exposure, the "conservation strategy" hypothesis predicts that the energy demand for physiological defenses would be too high, resulting in a metabolic depression. This "conservation strategy" is generally characterized by limited investment in immune and antioxidant defenses and few or no changes in energy reserves and behaviors, resulting in interactive antagonistic (i.e., inhibiting) effects of multiple stressors (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012). However, contrary to these predictions, combined metal contamination and immune challenge had few interactive effects excepted on behavior, but behavioral responses to multiple stressors were dependent on the population considered.

More particularly, we did not find any significant interactive effect of multiple stressors on immune and antioxidant defenses. For instance, local (i.e., skin swelling) and circulating (i.e., N/L immune ratio in fish blood) immune responses were not affected by multiple stressors, likely because both stressors affected different immune traits. Further studies focusing on other components, such as the phagocytic capacity and the oxidative burst activity, would be necessary to decipher the underpinning immune effects of multiple stressors (Jolly et al., 2014; Le Guernic et al., 2016). In addition, multiple stressors had no interactive effects on oxidative stress, although

changes in other antioxidants molecules that were not measured in our study are still possible (Lushchak, 2011). Whatever the underlying mechanisms, we found no interactive effects of multiple stressors on fish physiological traits, suggesting that the metabolic capacity of fish is not overwhelmed by multiple stressors and/or that the selected traits were not integrative enough to uncover interactive effects.

We also expected antagonistic (i.e., inhibiting) effects on energy reserves and/or behavior. We found no effect of multiple stressors on energy reserves nor condition indices, but the exposure to combined contamination and immune challenge inhibited the behavioral plasticity of fish. Indeed, we found no difference in swimming activity between groups exposed to multiple stressors and control groups due to inhibiting effects (i.e., "mitigating synergism" for ARIMAS, antagonism for CELCAB and AUSEI) or opposite additive effects of combined stressors (i.e., RIOU). In other words, in most populations, the immune challenge inhibited the effects of contamination on fish behavior resulting in lower behavioral responses to multiple stressors compared to single stressors. This result highlights the need to consider parasitism and other stressors in behavioral-based ecotoxicological tests to avoid misinterpretation. In addition, it suggests that labile traits such as behaviors may be particularly sensitive to multiple stressors, with potential implications for fish fitness by altering reproduction or ability to escape predators in the wild (Scott, 2003; Wingfield, 2003; Wong and Candolin, 2015).

Overall, only few results support the hypothesis that fish would follow a "conservation strategy" when exposed to multiple stressors. Indeed, only behavior was affected by multiple stressors, and effects had no consequences on physiology or survival, suggesting that multiple stressors are not more deleterious than single stressors for fish fitness, although we only tested short term responses under controlled laboratory conditions. Results also underscore that fish responses strongly depend on stressors type and the origin of the population considered. Studies investigating fish metabolism and the long-term fitness consequences of multiple stressors in a more realistic context, such as cross transplantation in the field, are now needed to better understand the effects of multiple stressors in the wild.

4.3. POPULATION VARIABILITY OF RESPONSES TO STRESSORS

There was high variability of response to single and multiple stressors among populations, underlining the need to take into account intraspecific variability to better predict the effects of environmental stressors on aquatic wildlife, especially in ecotoxicological tests. First, the bioaccumulation of Cd was significant only in fish from the least contaminated sites (i.e. FARM and ARIMAS). One potential explanation is that populations from contaminated sites already had high levels of metals in muscle due to previous pollution exposure in their natural environment (Faucher et al., 2008; Goto and Wallace, 2010; Klaassen et al., 1999). Accordingly, fish from the most contaminated site (i.e. RIOU) displayed a higher basal level of Cd in their muscle than other populations. Other organs such as liver and kidney were used for another study and could not be analyzed here. Although fish muscle is not the first recipient of metal accumulation (Bervoets et al., 2009; Creti et al., 2010; Rajotte and Couture, 2002), our results indicate that the experimental contamination led to significant bioaccumulation of Cd (but not Zn and Cu) in muscles. This suggests that Cd could reach a much higher concentration in target organs such as liver and kidney and explain the observed responses, especially in FARM fish.

Second, oxidative stress increased and body mass decreased significantly in the least contaminated FARM population in response to contamination, but not in other populations. This suggests that fish from the least contaminated FARM site may be more sensitive to metal contamination than other populations, which is consistent with recent findings in several fish species (M. Oziolor et al., 2016; Oziolor et al., 2014; Reid et al., 2016).

Third, we found a strong variability in fish behavioral responses to stressors, especially on fish swimming activity. In our study, the experimental contamination alone had no effects on the two least contaminated populations (FARM and ARIMAS) but increased other populations' swimming activity (CELCAB, AUSEI, RIOU). This suggests that contamination could induce plastic hyperactivity in fish from the most contaminated sites (Ellgaard et al., 1978; Steele, 1983), maybe because of neurotoxic or endocrine-disrupting effects (Drummond and Russom, 1990; Renick et al., 2016;

Weis et al., 2001) and/or energy reallocations under stressful conditions, which could increase food acquisition (Pyke et al., 1977). Nevertheless, anthropogenic activities and other factors not accounted here could also explain these behavioral differences (e.g., domestication in the FARM population: Johnsson et al., 2014, predator presence/absence in some populations: Bell et al., 2010). Further studies on a higher number of replicate populations are hence necessary to specifically disentangle the environmental factors explaining these interpopulation differences. Whatever the determinants of these interpopulation differences, our results underscore the need to consider the variability of behavioral responses among wild populations within the emerging field of behavioral ecotoxicology (Jacquin et al., 2020).

To sum up, our results are in accordance with previous studies showing that different fish populations could differ in their sensitivity to stressors depending on their history of contamination in the wild (e.g., Bélanger-Deschênes et al., 2013; Bourret et al., 2008; Hamilton et al., 2017; Oziolor et al., 2014; Reid et al., 2016). Differences in genetic and plastic-based ability of detoxification, physiological, and behavioral adjustments could enable fish to better mitigate the effects of contaminants depending on past selection in stressful environments. Further analyses comparing the genetic structure of F0 fish and experiments on F1 and F2 generations would be necessary to investigate the potential genetic basis explaining this interpopulation variability. Whatever the underpinning mechanisms, this variability of responses among fish populations could lead to misinterpretation of contaminants' threats since ecological risk assessment is generally derived from ecotoxicity tests performed on a single laboratory raised population (Brady et al., 2017). Hence, our study suggests that ecotoxicology should take into account the evolutionary history of populations to better predict the effects of environmental stressors in an evolutionary ecotoxicology framework (M. Oziolor et al., 2016).

Compliance with ethical standards

This research was conducted in compliance with French and European legislation for animal experimentation (European directive 2010/63/UE). Fish sampling was conducted under local authorities' authorization, and fish were treated for parasites according to the prescription 2529, VetoFish. Experimental procedures were conducted

under the establishment approval for vertebrate experimentation N°A3113002, and were approved by the ethical committee n°073 (authorization n°8538).

Acknowledgements

We thank Emilie Rojas, Corinne Pautot, Sandrine Papillon, Michel le Hénaff, Flavien Garcia, Melissa Izard, Alexianne Damien, Leo Bottisagio, Pauline Madec, Camille Courcoul, Bruno Galle, Elisa Su Fu, Jessica Côte, and the technical service of INP-ENSAT for assistance at different stages of this study. We thank the GET platform, Camille Duquenoy, Gaël Leroux and David Baqué for help with trace metal analyses. We are grateful to Christel Lefrançois and Patrice Couture for helpful comments on an earlier version of this manuscript. This work was supported by a grant from the water agency Adour-Garonne (Agence de l'Eau Adour-Garonne), the French national program CNRS EC2CO-Ecodyn (PHYPAT) and the LTSER ZA PYGAR. QP was supported by a doctoral grant of the French Ministry of Higher Education and Research. The EDB laboratory is part of the French Laboratory of Excellence "TULIP" (ANR-10-LABX-41; ANR-11-IDEX-0002-02).

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest

References

- Adelman, J.S., Martin, L.B., 2009. Vertebrate sickness behaviors: Adaptive and integrated neuroendocrine immune responses. *Integr. Comp. Biol.* 49, 202–214. <https://doi.org/10.1093/icb/icp028>
- Afonso, A., Lousada, S., Silva, J., Ellis, A.E., Silva, M.T., 1998. Neutrophil and macrophage responses to inflammation in the peritoneal cavity of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. A light and electron microscopic cytochemical study. *Dis. Aquat. Organ.* 34, 27–37. <https://doi.org/10.3354/dao034027>
- Aliko, V., Qirjo, M., Sula, E., Morina, V., Faggio, C., 2018. Antioxidant defense system, immune response and erythron profile modulation in gold fish, *Carassius auratus*, after acute manganese treatment. *Fish Shellfish Immunol.* 76, 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2018.02.042>

Ardia, D.R., Clotfelter, E.D., 2006. The novel application of an immunological technique reveals the immunosuppressive effect of phytoestrogens in *Betta splendens*. *J. Fish Biol.* 68, 144–149. <https://doi.org/10.1111/j.0022-1112.2006.00962.x>

Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G., Marino, G., 2007. Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263, 52–60. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.07.049>

Barber, I., Hoare, D., Krause, J., 2000. Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 131–165. <https://doi.org/10.1023/A:1016658224470>

Barber, I., Wright, H.A., 2005. Effects of parasites on fish behaviour: interactions with host physiology. *Fish Physiol.* 24, 109–149.

Bartolini, T., Butail, S., Porfiri, M., 2015. Temperature influences sociality and activity of freshwater fish. *Environ. Biol. Fishes* 98, 825–832. <https://doi.org/10.1007/s10641-014-0318-8>

Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R.H.B., Singmann, H., Dai, B., Grothendieck, G., 2015. Package ‘lme4.’ *Convergence* 12.

Bélanger-Deschênes, S., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2013. Evolutionary change driven by metal exposure as revealed by coding SNP genome scan in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Ecotoxicology* 22, 938–957. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1083-8>

Bell, A.M., Henderson, L., Huntingford, F.A., 2010. Behavioral and respiratory responses to stressors in multiple populations of three-spined sticklebacks that differ in predation pressure. *J. Comp. Physiol. B* 180, 211–220. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0395-8>

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* 57, 289–300.

Bervoets, L., Van Campenhout, K., Reynders, H., Knapen, D., Covaci, A., Blust, R., 2009. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 720–728. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.10.008>

Birk, S., Chapman, D., Carvalho, L., Spears, B.M., Andersen, H.E., Argillier, C., Auer, S., Baattrup-Pedersen, A., Banin, L., Beklioglu, M., Bondar-Kunze, E., Borja, A., Branco, P., Bucak, T., Buijse, A.D., Cardoso, A.C., Couture, R.-M., Cremona, F., de Zwart, D., Feld, C.K., Ferreira, M.T., Feuchtmayr, H., Gessner, M.O., Gieswein, A., Globevnik, L., Graeber, D., Graf, W., Gutiérrez-Cánovas, C., Hanganu, J., Işkın, U., Järvinen, M., Jeppesen, E., Kotamäki, N., Kuijper, M., Lemm, J.U., Lu, S., Solheim,

A.L., Mischke, U., Moe, S.J., Nöges, P., Nöges, T., Ormerod, S.J., Panagopoulos, Y., Phillips, G., Posthuma, L., Pouso, S., Prudhomme, C., Rankinen, K., Rasmussen, J.J., Richardson, J., Sagouis, A., Santos, J.M., Schäfer, R.B., Schinegger, R., Schmutz, S., Schneider, S.C., Schülting, L., Segurado, P., Stefanidis, K., Sures, B., Thackeray, S.J., Turunen, J., Uyarra, M.C., Venohr, M., von der Ohe, P.C., Willby, N., Hering, D., 2020. Impacts of multiple stressors on freshwater biota across spatial scales and ecosystems. *Nat. Ecol. Evol.* 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1216-4>

Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G., 2003. Assessing the Cost of Mounting an Immune Response. *Am. Nat.* 161, 367–379. <https://doi.org/10.1086/346134>

Boone, M.D., Bridges-Britton, C.M., 2006. Examining multiple sublethal contaminants on the gray treefrog (*Hyla versicolor*): Effects of an insecticide, herbicide, and fertilizer. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3261–3265. <https://doi.org/10.1897/06-235r.1>

Bourret, V., Couture, P., Campbell, P.G.C., Bernatchez, L., 2008. Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquat. Toxicol.* 86, 76–90. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.10.003>

Brady, S.P., Richardson, J.L., Kunz, B.K., 2017. Incorporating evolutionary insights to improve ecotoxicology for freshwater species. *Evol. Appl.* 10, 829–838. <https://doi.org/10.1111/eva.12507>

Brun, N.R., van Hage, P., Hunting, E.R., Haramis, A.-P.G., Vink, S.C., Vijver, M.G., Schaaf, M.J.M., Tudorache, C., 2019. Polystyrene nanoplastics disrupt glucose metabolism and cortisol levels with a possible link to behavioural changes in larval zebrafish. *Commun. Biol.* 2, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0629-6>

Calisi, R.M., Bentley, G.E., 2009. Lab and field experiments: Are they the same animal? *Horm. Behav.* 56, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.02.010>

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

Christensen, M.R., Graham, M.D., Vinebrooke, R.D., Findlay, D.L., Paterson, M.J., Turner, M.A., 2006. Multiple anthropogenic stressors cause ecological surprises in boreal lakes. *Glob. Change Biol.* 12, 2316–2322. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2006.01257.x>

Clotfelter, E.D., Bell, A.M., Levering, K.R., 2004. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Anim. Behav.* 68, 665–676. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2004.05.004>

- Colchen, T., Teletchea, F., Fontaine, P., Pasquet, A., 2016. Temperature modifies activity, inter-individual relationships and group structure in fish. *Curr. Zool.* zow048. <https://doi.org/10.1093/cz/zow048>
- Costantini, D., Dell’Omo, G., 2006. Effects of T-cell-mediated immune response on avian oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 145, 137–142. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.06.002>
- Costantini, D., Møller, A.P., 2009. Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 153, 339–344. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.010>
- Crain, C.M., Kroeker, K., Halpern, B.S., 2008. Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* 11, 1304–1315. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01253.x>
- Creti, P., Trinchella, F., Scudiero, R., 2010. Heavy metal bioaccumulation and metallothionein content in tissues of the sea bream *Sparus aurata* from three different fish farming systems. *Environ. Monit. Assess.* 165, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s10661-009-0948-z>
- Dantzer, R., 2004. Cytokine-induced sickness behaviour: a neuroimmune response to activation of innate immunity. *Eur. J. Pharmacol.* 500, 399–411. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.040>
- Dautremepuits, C., Betoulle, S., Paris-Palacios, S., Vernet, G., 2004. Humoral immune factors modulated by copper and chitosan in healthy or parasitised carp (*Cyprinus carpio* L.) by *Ptychobothrium* sp. (Cestoda). *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 68, 325–338. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.003>
- Davis, A.K., Maney, D.L., Maerz, J.C., 2008. The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists. *Funct. Ecol.* 22, 760–772. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2008.01467.x>
- De Coen, W.M., Janssen, C.R., 1997. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular energy allocation: a new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations. *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recovery* 6, 43–55. <https://doi.org/10.1023/A:1008228517955>
- Defo, M.A., Gendron, A.D., Head, J., Pilote, M., Turcotte, P., Marcogliese, D.J., Houde, M., 2019. Cumulative effects of cadmium and natural stressors (temperature and parasite infection) on molecular and biochemical responses of juvenile rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 217, 105347. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105347>
- Del Re, A.C., 2013. Compute.es: compute effect sizes. R package version 0.2–2. Available from: <http://cran.r-project.org/web/packages/compute.es>.

- Drummond, R.A., Russom, C.L., 1990. Behavioral toxicity syndromes: A promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 37–46. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090106>
- Ellgaard, E.G., Tusa, J.E., Malizia, A.A., 1978. Locomotor activity of the bluegill *Lepomis macrochirus*: hyperactivity induced by sublethal concentrations of cadmium, chromium and zinc. *J. Fish Biol.* 12, 19–23. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1978.tb04146.x>
- Fatima, M., Ahmad, I., Sayeed, I., Athar, M., Raisuddin, S., 2000. Pollutant-induced over-activation of phagocytes is concomitantly associated with peroxidative damage in fish tissues. *Aquat. Toxicol.* 49, 243–250. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00086-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00086-7)
- Faucher, K., Fichet, D., Miramand, P., Lagardère, J.-P., 2008. Impact of chronic cadmium exposure at environmental dose on escape behaviour in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.; Teleostei, Moronidae). *Environ. Pollut.* 151, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.02.017>
- Flammarion, P., Migeon, B., Urios, S., Morfin, P., Garric, J., 1998. Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.* 42, 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00046-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00046-0)
- Folt, C.L., Chen, C.Y., Moore, M.V., Burnaford, J., 1999. Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. Oceanogr.* 44, 864–877.
- Friard, O., Gamba, M., 2016. BORIS: a free, versatile open-source event-logging software for video/audio coding and live observations. *Methods Ecol. Evol.* 7, 1325–1330. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12584>
- Gandar, A., Jean, S., Canal, J., Marty-Gasset, N., Gilbert, F., Laffaille, P., 2016. Multistress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3184–3194. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5147-6>
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., Gress, L., Mormède, P., Tapie, N., Budzinski, H., Jean, S., 2017. Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 188, 60–72. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.089>
- Goto, D., Wallace, W.G., 2010. Metal intracellular partitioning as a detoxification mechanism for mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) living in metal-polluted salt marshes. *Mar. Environ. Res.* 69, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2009.09.008>
- Guardiola, F.A., Cuesta, A., Meseguer, J., Martínez, S., Martínez-Sánchez, M.J., Pérez-Sirvent, C., Esteban, M.A., 2013. Accumulation, histopathology and immunotoxicological effects of waterborne cadmium on gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol.* 35, 792–800. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2013.06.011>

- Guppy, M., Withers, P., 1999. Metabolic depression in animals: physiological perspectives and biochemical generalizations. *Biol. Rev.* 74, 1–40. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.1999.tb00180.x>
- Hamilton, P.B., Rolshausen, G., Uren Webster, T.M., Tyler, C.R., 2017. Adaptive capabilities and fitness consequences associated with pollution exposure in fish. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160042. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0042>
- Harrison, I., Abell, R., Darwall, W., Thieme, M.L., Tickner, D., Timboe, I., 2018. The freshwater biodiversity crisis. *Science* 362, 1369–1369. <https://doi.org/10.1126/science.aav9242>
- Hedges, L.V., Gurevitch, J., Curtis, P.S., 1999. The Meta-Analysis of Response Ratios in Experimental Ecology. *Ecology* 80, 1150. <https://doi.org/10.2307/177062>
- Herborn, K.A., Coffey, J., Larcombe, S.D., Alexander, L., Arnold, K.E., 2011. Oxidative profile varies with personality in European greenfinches. *J. Exp. Biol.* 214, 1732–1739. <https://doi.org/10.1242/jeb.051383>
- Hoogenboom, M.O., Metcalfe, N.B., Groothuis, T.G.G., de Vries, B., Costantini, D., 2012. Relationship between oxidative stress and circulating testosterone and cortisol in pre-spawning female brown trout. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 163, 379–387. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.07.002>
- Hopkins, W.A., Staub, B.P., Snodgrass, J.W., Taylor, B.E., DeBiase, A.E., Roe, J.H., Jackson, B.P., Congdon, J.D., 2004. Responses of benthic fish exposed to contaminants in outdoor microcosms—examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests. *Aquat. Toxicol.* 68, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.01.021>
- Jackson, M.C., Loewen, C.J.G., Vinebrooke, R.D., Chimimba, C.T., 2016. Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Glob. Change Biol.* 22, 180–189. <https://doi.org/10.1111/gcb.13028>
- Jacquin, L., Dybwad, C., Rolshausen, G., Hendry, A.P., Reader, S.M., 2017. Evolutionary and immediate effects of crude-oil pollution: depression of exploratory behaviour across populations of Trinidadian guppies. *Anim. Cogn.* 20, 97–108. <https://doi.org/10.1007/s10071-016-1027-9>
- Jacquin, L., Petitjean, Q., Côte, J., Laffaille, P., Jean, S., 2020. Effects of Pollution on Fish Behavior, Personality, and Cognition: Some Research Perspectives. *Front. Ecol. Evol.* 8. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00086>
- Johnson, R.W., 2002. The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 87, 443–450. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(02\)00069-7](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(02)00069-7)
- Johnsson, J.I., Brockmark, S., Näslund, J., 2014. Environmental effects on behavioural development consequences for fitness of captive-reared fishes in the wild: behaviour

and fitness of captive-reared fishes. *J. Fish Biol.* 85, 1946–1971. <https://doi.org/10.1111/jfb.12547>

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

Kelly, D.W., Poulin, R., Tompkins, D.M., Townsend, C.R., 2010. Synergistic effects of glyphosate formulation and parasite infection on fish malformations and survival. *J. Appl. Ecol.* 47, 498–504. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01791.x>

Kestemont, P.P., Van Driessche, I., Mélard, C., 1991. Etude du cycle reproducteur du goujon, *Gobio gobio*, L.: 3. Maturation des gonades sous regimes thermiques ovulatoire et sub-ovulatoire. *J. Appl. Ichthyol.* 7, 205–216. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.1991.tb00598.x>

Khengarot, B.S., Rathore, R.S., Tripathi, D.M., 1999. Effects of chromium on humoral and cell-mediated immune responses and host resistance to disease in a freshwater catfish, *Saccobranchus fossilis* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43, 11–20.

King, M.O., Swanson, D.L., 2013. Activation of the immune system incurs energetic costs but has no effect on the thermogenic performance of house sparrows during acute cold challenge. *J. Exp. Biol.* 216, 2097–2102. <https://doi.org/10.1242/jeb.079574>

Kirsten, K., Fior, D., Kreutz, L.C., Barcellos, L.J.G., 2018. First description of behavior and immune system relationship in fish. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19276-3>

Klaassen, C.D., Liu, J., Choudhuri, S., 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39, 267–294. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.39.1.267>

Klerks, P.L., Weis, J.S., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. *Environ. Pollut.* 45, 173–205. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(87\)90057-1](https://doi.org/10.1016/0269-7491(87)90057-1)

Knapen, D., Bervoets, L., Verheyen, E., Blust, R., 2004. Resistance to water pollution in natural gudgeon (*Gobio gobio*) populations may be due to genetic adaptation. *Aquat. Toxicol.* 67, 155–165. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.12.001>

Koltés, K.H., 1985. Effects of Sublethal Copper Concentrations on the Structure and Activity of Atlantic Silverside Schools. *Trans. Am. Fish. Soc.* 114, 413–422. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1985\)114<413:EOSCCO>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1985)114<413:EOSCCO>2.0.CO;2)

Lange, K., Bruder, A., Matthaei, C.D., Brodersen, J., Paterson, R.A., 2018. Multiple-stressor effects on freshwater fish: Importance of taxonomy and life stage. *Fish Fish.* 19, 974–983. <https://doi.org/10.1111/faf.12305>

- Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Floriani, M., Turies, C., Chadili, E., Vedova, C.D., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., Porcher, J.-M., Geffard, A., Betoulle, S., Gagnaire, B., 2016. Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25, 1478–1499. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1699-6>
- Lenth, R., Love, J., Hervé, M., 2017. Package ‘emmeans.’ *Underst Stat* 34, 216–21.
- Little, E.E., Finger, S.E., 1990. Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 13–19. <https://doi.org/10.1002/etc.5620090103>
- Lochmiller, R.L., Deerenberg, C., 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88, 87–98. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880110.x>
- Loot, G., Reyjol, Y., Poulet, N., Simkova, A., Blanchet, S., Lek, S., 2007. Effects of small weirs on fish parasite communities. *Parasitol. Res.* 101, 1265–1276. <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0632-6>
- Lopez-Luna, J., Al-Jubouri, Q., Al-Nuaimy, W., Sneddon, L.U., 2017. Impact of stress, fear and anxiety on the nociceptive responses of larval zebrafish. *PLOS ONE* 12, e0181010. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181010>
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>
- M. Oziolor, E., De Schampelaere, K., Matson, C.W., 2016. Evolutionary toxicology: Meta-analysis of evolutionary events in response to chemical stressors. *Ecotoxicology* 25, 1858–1866. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1735-6>
- Magnadottir, B., 2010. Immunological Control of Fish Diseases. *Mar. Biotechnol.* 12, 361–379. <https://doi.org/10.1007/s10126-010-9279-x>
- Magnadóttir, B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish Shellfish Immunol.* 20, 137–151. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2004.09.006>
- Marcogliese, D.J., 2001. Implications of climate change for parasitism of animals in the aquatic environment. *Can. J. Zool.* 79, 1331–1352. <https://doi.org/10.1139/z01-067>
- Marcogliese, D.J., Brambilla, L.G., Gagné, F., Gendron, A.D., 2005. Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Dis. Aquat. Organ.* 63, 77–84.
- Marcogliese, D.J., Pietrock, M., 2011. Combined effects of parasites and contaminants on animal health: parasites do matter. *Trends Parasitol.* 27, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.11.002>

- Marentette, J.R., Corkum, L.D., 2008. Does the reproductive status of male round gobies (*Neogobius melanostomus*) influence their response to conspecific odours? *Environ. Biol. Fishes* 81, 447–455. <https://doi.org/10.1007/s10641-007-9240-7>
- Martin, J.M., Saaristo, M., Bertram, M.G., Lewis, P.J., Coggan, T.L., Clarke, B.O., Wong, B.B.M., 2017. The psychoactive pollutant fluoxetine compromises antipredator behaviour in fish. *Environ. Pollut.* 222, 592–599. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.10.010>
- McEwen, B.S., Wingfield, J.C., 2010. What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Horm. Behav.* 57, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2009.09.011>
- Mennerat, A., Nilsen, F., Ebert, D., Skorping, A., 2010. Intensive Farming: Evolutionary Implications for Parasites and Pathogens. *Evol. Biol.* 37, 59–67. <https://doi.org/10.1007/s11692-010-9089-0>
- Montiglio, P.-O., Royauté, R., 2014. Contaminants as a neglected source of behavioural variation. *Anim. Behav.* 88, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2013.11.018>
- Mulvey, M., Newman, M.C., Vogelbein, W.K., Unger, M.A., Ownby, D.R., 2003. Genetic structure and mtDNA diversity of *Fundulus heteroclitus* populations from polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 671–677.
- Nacci, D., Coiro, L., Champlin, D., Jayaraman, S., McKinney, R., Gleason, T.R., Munns Jr., W.R., Specker, J.L., Cooper, K.R., 1999. Adaptations of wild populations of the estuarine fish *Fundulus heteroclitus* to persistent environmental contaminants. *Mar. Biol.* 134, 9–17. <https://doi.org/10.1007/s002270050520>
- Nöges, P., Argillier, C., Borja, Á., Garmendia, J.M., Hanganu, J., Kodeš, V., Pletterbauer, F., Sagouis, A., Birk, S., 2016. Quantified biotic and abiotic responses to multiple stress in freshwater, marine and ground waters. *Sci. Total Environ.* 540, 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.045>
- Nowicki, J.P., Miller, G.M., Munday, P.L., 2012. Interactive effects of elevated temperature and CO₂ on foraging behavior of juvenile coral reef fish. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 412, 46–51. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.10.020>
- O'Connor, C.M., Reddon, A.R., Marsh-Rollo, S.E., Hellmann, J.K., Ligocki, I.Y., Hamilton, I.M., Balshine, S., 2014. A comparative study of an innate immune response in Lamprologine cichlid fishes. *Naturwissenschaften* 101, 839–849. <https://doi.org/10.1007/s00114-014-1225-8>
- Otálora-Ardila, A., Flores-Martínez, J.J., Welch Jr, K.C., 2016. Metabolic cost of the activation of immune response in the fish-eating myotis (*Myotis vivesi*): the effects of inflammation and the acute phase response. *PloS One* 11, e0164938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164938>

- Oziolor, E.M., Bigorgne, E., Aguilar, L., Usenko, S., Matson, C.W., 2014. Evolved resistance to PCB- and PAH-induced cardiac teratogenesis, and reduced CYP1A activity in Gulf killifish (*Fundulus grandis*) populations from the Houston Ship Channel, Texas. *Aquat. Toxicol.* 150, 210–219. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.012>
- Peeler, E.J., Feist, S.W., 2011. Human intervention in freshwater ecosystems drives disease emergence. *Freshw. Biol.* 56, 705–716. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2011.02572.x>
- Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P., Jacquin, L., 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Sci. Total Environ.* 684, 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>
- Philp, A., Macdonald, A.L., Watt, P.W., 2005. Lactate – a signal coordinating cell and systemic function. *J. Exp. Biol.* 208, 4561–4575. <https://doi.org/10.1242/jeb.01961>
- Pi, J., Li, X., Zhang, T., Li, D., 2016. Effects of Acute Exposure to Sublethal Waterborne Cadmium on Energy Homeostasis in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 497–503. <https://doi.org/10.1007/s00128-016-1896-2>
- Piggott, J.J., Townsend, C.R., Matthaei, C.D., 2015. Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecol. Evol.* 5, 1538–1547. <https://doi.org/10.1002/ece3.1465>
- Prabakaran, M., Binuramesh, C., Steinhagen, D., Michael, R.D., 2006. Immune response and disease resistance of *Oreochromis mossambicus* to *Aeromonas hydrophila* after exposure to hexavalent chromium. *Dis. Aquat. Organ.* 68, 189–196.
- Pretto, A., Loro, V.L., Morsch, V.M., Moraes, B.S., Menezes, C., Santi, A., Toni, C., 2014. Alterations in carbohydrate and protein metabolism in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 100, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.11.004>
- Pyke, G.H., Pulliam, H.R., Charnov, E.L., 1977. Optimal Foraging: A Selective Review of Theory and Tests. *Q. Rev. Biol.* 52, 137–154.
- R Development Core Team, 2018. R: A Language and Environment for Statistical Computing (Version 3.5.2, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2018).
- Rajotte, J.W., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 59, 1296–1304. <https://doi.org/10.1139/f02-095>

Reid, A.J., Carlson, A.K., Creed, I.F., Eliason, E.J., Gell, P.A., Johnson, P.T.J., Kidd, K.A., MacCormack, T.J., Olden, J.D., Ormerod, S.J., Smol, J.P., Taylor, W.W., Tockner, K., Vermaire, J.C., Dudgeon, D., Cooke, S.J., 2019. Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol. Rev.* 94, 849–873. <https://doi.org/10.1111/brv.12480>

Reid, N.M., Proestou, D.A., Clark, B.W., Warren, W.C., Colbourne, J.K., Shaw, J.R., Karchner, S.I., Hahn, M.E., Nacci, D., Oleksiak, M.F., Crawford, D.L., Whitehead, A., 2016. The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish. *Science* 354, 1305–1308. <https://doi.org/10.1126/science.aah4993>

Renick, V.C., Weinersmith, K., Vidal-Dorsch, D.E., Anderson, T.W., 2016. Effects of a pesticide and a parasite on neurological, endocrine, and behavioral responses of an estuarine fish. *Aquat. Toxicol.* 170, 335–343. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.010>

Rosales, C., 2018. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front. Physiol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00113>

Schäfer, R.B., Kühn, B., Malaj, E., König, A., Gergs, R., 2016. Contribution of organic toxicants to multiple stress in river ecosystems. *Freshw. Biol.* 61, 2116–2128. <https://doi.org/10.1111/fwb.12811>

Schinegger, R., Palt, M., Segurado, P., Schmutz, S., 2016. Untangling the effects of multiple human stressors and their impacts on fish assemblages in European running waters. *Sci. Total Environ.* 573, 1079–1088. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.143>

Schulte, P.M., 2014. What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J. Exp. Biol.* 217, 23–34. <https://doi.org/10.1242/jeb.089722>

Scott, G.R., 2003. Cadmium disrupts behavioural and physiological responses to alarm substance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J. Exp. Biol.* 206, 1779–1790. <https://doi.org/10.1242/jeb.00353>

Scott, G.R., Sloman, K.A., 2004. The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.03.016>

Sheldon, B.C., Verhulst, S., 1996. Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Trends Ecol. Evol.* 11, 317–321. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10039-2](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10039-2)

Shinn, C., Blanchet, S., Loot, G., Lek, S., Grenouillet, G., 2015. Phenotypic variation as an indicator of pesticide stress in gudgeon: Accounting for confounding factors in the wild. *Sci. Total Environ.* 538, 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.081>

SIE, 2016. SIEAG-database. Agence de l'eau ADOUR-GARONNE.

Smolders, R., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., 2004. Cellular energy allocation in zebra mussels exposed along a pollution gradient: linking cellular effects to higher levels of biological organization. *Environ. Pollut.* 129, 99–112. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.027>

Sokolova, I.M., 2013. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53, 597–608. <https://doi.org/10.1093/icb/ict028>

Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A.A., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003>

Steele, C.W., 1983. Effects of exposure to sublethal copper on the locomotor behavior of the sea catfish, *Arius felis*. *Aquat. Toxicol.* 4, 83–93. [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(83\)90063-2](https://doi.org/10.1016/0166-445X(83)90063-2)

Tella, J.L., Lemus, J.A., Carrete, M., Blanco, G., 2008. The PHA Test Reflects Acquired T-Cell Mediated Immunocompetence in Birds. *PLoS ONE* 3, e3295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003295>

Tomkins, P., Saaristo, M., Bertram, M.G., Michelangeli, M., Tomkins, R.B., Wong, B.B.M., 2018. An endocrine-disrupting agricultural contaminant impacts sequential female mate choice in fish. *Environ. Pollut.* 237, 103–110. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.02.046>

Toomey, M.B., Butler, M.W., McGraw, K.J., 2010. Immune-system activation depletes retinal carotenoids in house finches (*Carpodacus mexicanus*). *J. Exp. Biol.* 213, 1709–1716. <https://doi.org/10.1242/jeb.041004>

Volkoff, H., Peter, R.E., 2004. Effects of lipopolysaccharide treatment on feeding of goldfish: role of appetite-regulating peptides. *Brain Res.* 998, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2003.11.011>

von Gersdorff Jørgensen, L., 2016. The dynamics of neutrophils in zebrafish (*Danio rerio*) during infection with the parasite *Ichthyophthirius multifiliis*. *Fish Shellfish Immunol.* 55, 159–164. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.05.026>

Weber, J.-M., Choi, K., Gonzalez, A., Omlin, T., 2016. Metabolic fuel kinetics in fish: swimming, hypoxia and muscle membranes. *J. Exp. Biol.* 219, 250–258. <https://doi.org/10.1242/jeb.125294>

Weis, J.S., Smith, G., Zhou, T., Santiago-Bass, C., Weis, P., 2001. Effects of Contaminants on Behavior: Biochemical Mechanisms and Ecological Consequences Killifish from a contaminated site are slow to capture prey and escape

predators; altered neurotransmitters and thyroid may be responsible for this behavior, which may produce population changes in the fish and their major prey, the grass shrimp. *BioScience* 51, 209–217. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0209:EOCOBB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0209:EOCOBB]2.0.CO;2)

Whitehead, A., Clark, B.W., Reid, N.M., Hahn, M.E., Nacci, D., 2017. When evolution is the solution to pollution: Key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evol. Appl.* 10, 762–783. <https://doi.org/10.1111/eva.12470>

Winandy, L., Denoël, M., 2015. The aggressive personality of an introduced fish affects foraging behavior in a polymorphic newt. *Behav. Ecol.* 26, 1528–1536. <https://doi.org/10.1093/beheco/arv101>

Wingfield, J.C., 2003. Control of behavioural strategies for capricious environments. *Anim. Behav.* 66, 807–816. <https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2298>

Wong, B.B.M., Candolin, U., 2015. Behavioral responses to changing environments. *Behav. Ecol.* 26, 665–673. <https://doi.org/10.1093/beheco/aru183>

Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2012. *Homeostasis and Toxicology of Essential Metals*. Academic Press.

Wood, C.M., Farrell, A.P., Brauner, C.J., 2011. *Homeostasis and Toxicology of Non-essential Metals*. Academic Press.

WWF, 2018. *Living Planet Report 2018: Aiming Higher* (Eds M. Grooten and R. E. A. Almond). WWF International, Gland, Switzerland.

Xu, H., Zhang, X., Li, H., Li, C., Huo, X.-J., Hou, L.-P., Gong, Z., 2018. Immune response induced by major environmental pollutants through altering neutrophils in zebrafish larvae. *Aquat. Toxicol.* 201, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.06.002>

Zhao, H., Wang, Y., Guo, M., Mu, M., Yu, H., Xing, M., 2020. Grass carps co-exposed to environmentally relevant concentrations of cypermethrin and sulfamethoxazole bear immunodeficiency and are vulnerable to subsequent *Aeromonas hydrophila* infection. *Environ. Pollut.* 266, 115156. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115156>

Zhao, J., Zhang, Q., Zhang, B., Xu, T., Yin, D., Gu, W., Bai, J., 2020. Developmental exposure to lead at environmentally relevant concentrations impaired neurobehavior and NMDAR-dependent BDNF signaling in zebrafish larvae. *Environ. Pollut.* 257, 113627. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113627>

Zhou, T., Weis, J.S., 1998. Swimming behavior and predator avoidance in three populations of *Fundulus heteroclitus* larvae after embryonic and/or larval exposure to methylmercury. *Aquat. Toxicol.* 43, 131–148. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(98\)00052-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(98)00052-6)

Supporting materials

Table S5. Mean contribution of each trace metal elements measured in water samples to compute the gradient of toxic risk (Toxic Unit: TU) for fish between 2012 and 2016. Cd, Cu and Zn reached a mean contribution higher than 5%.

Study sites	Sum of [Me]/C150	TU	Al	As	Cd	Cr	Co	Cu	Ni	Pb	Zn
GIVAB	0.096	-1.0	NA	0.138	41.517	0.027	0.095	9.841	0.395	9.436	38.551
GARMAR	0.125	-0.9	3.773	0.121	32.067	0.022	0.09	6.295	0.359	8.6	48.673
VOLPLA	0.125	-0.9	NA	0.088	32.09	0.024	NA	7.25	0.419	8.898	51.23
CELFIG	0.133	-0.9	8.005	0.24	37.467	0.008	0.015	5.107	0.131	1.499	47.529
FARM	0.120	-0.9	-2.118	7.572	0.067	8.311	0.004	0.022	12.621	0.075	0.680
ARIMAS	0.138	-0.9	NA	0.077	36.16	0.02	NA	7.982	0.376	8.481	46.904
CELCAB	0.146	-0.8	3.016	0.189	34.146	0.014	0.016	5.008	0.156	1.552	55.902
GARCAZ	0.148	-0.8	3.182	0.093	33.812	0.019	0.076	7.113	0.308	7.193	48.206
GARPOR	0.153	-0.8	2.572	0.113	32.781	0.018	0.091	6.896	0.474	6.854	50.202
CAUSAL	0.206	-0.7	NA	0.057	48.625	0.014	NA	5.511	0.13	6.277	39.386
SAVGRE	0.251	-0.6	NA	0.066	19.921	0.01	0.035	3.896	0.134	3.767	72.171
VENSAL	0.279	-0.6	1.687	0.168	21.504	0.009	0.063	3.611	0.12	3.258	69.58
GARBLA	0.338	-0.5	NA	0.435	41.39	0.007	NA	25.359	0.708	0.215	31.887
SAUPOR	0.46	-0.3	1.382	0.031	8.702	0.006	0.038	2.014	0.07	1.978	85.779
AUSEI	0.531	-0.3	2.648	0.053	9.418	0.005	0.055	9.027	0.071	1.901	76.822
GARBOU	0.566	-0.2	0.946	0.027	49.487	0.005	0.027	2.252	0.064	2.249	44.943
RIOU	22.176	1.3	0.034	0.001	59.298	0	0.001	0.086	0.024	0.068	40.488
Mean contribution to the TU (%)	-	-	2.724	0.119	33.649	0.013	0.05	6.703	0.246	4.514	53.016

Table S6. Detailed sample size (populations pooled) for each measured trait among the four experimental treatments. Sample size varies across traits and experimental treatments due to differential survival rates among treatments and populations and difficulties in collecting blood or tissue on some small individuals.

Experimental treatment and sample sizes

Measured trait	Control (NC-PBS)	Contamination alone (C-PBS)	Immune challenge alone (NC-AMIX)	Multiple stressors (C-AMIX)
Metal bioaccumulation in muscle	70	77	72	82
N/L immune ratio	61	74	61	77
Local immune response	77	95	89	101
Anti-oxidant capacity (OXY test)	47	59	46	42
Oxidative damage (DROM test)	57	64	58	58
Available energy in muscle	68	79	70	85
Condition index	72	85	73	81
General activity index	75	91	80	93
Foraging index	75	91	80	93
Sociability index	75	91	80	93

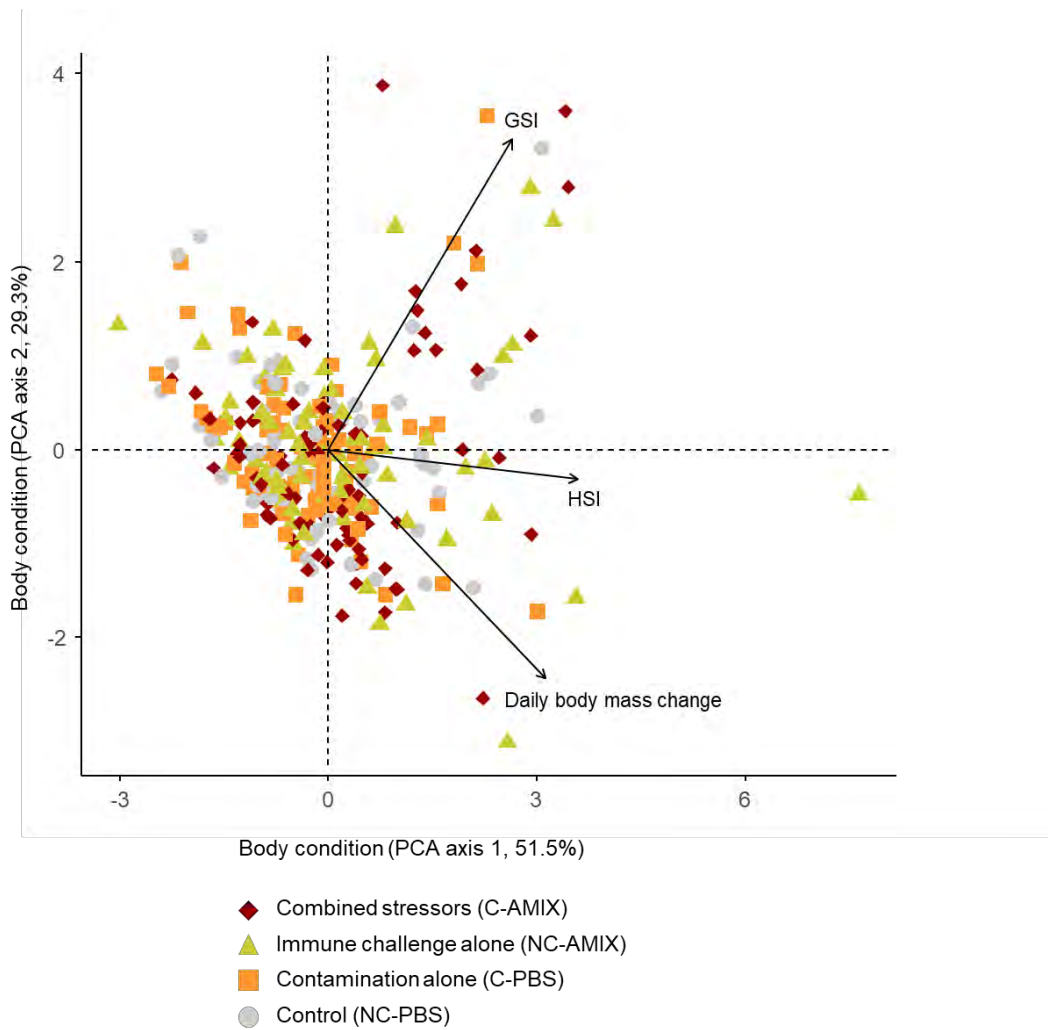


Figure S5. PCA of condition indices of fish exposed to multiple stressors (each triangle represents an individual). Graphical representation shows the Contamination and immune challenge treatment groups (populations are pooled). Coloured triangles represent individuals exposed to treatments (control, grey triangles: NC-PBS; contamination alone, orange triangles: C-PBS; immune challenge alone, green triangles: NC-AMIX; combined stressors, red triangles: C-AMIX). The first axis explains 51.5% of the variance in the dataset and was retained as condition index for further analyses.

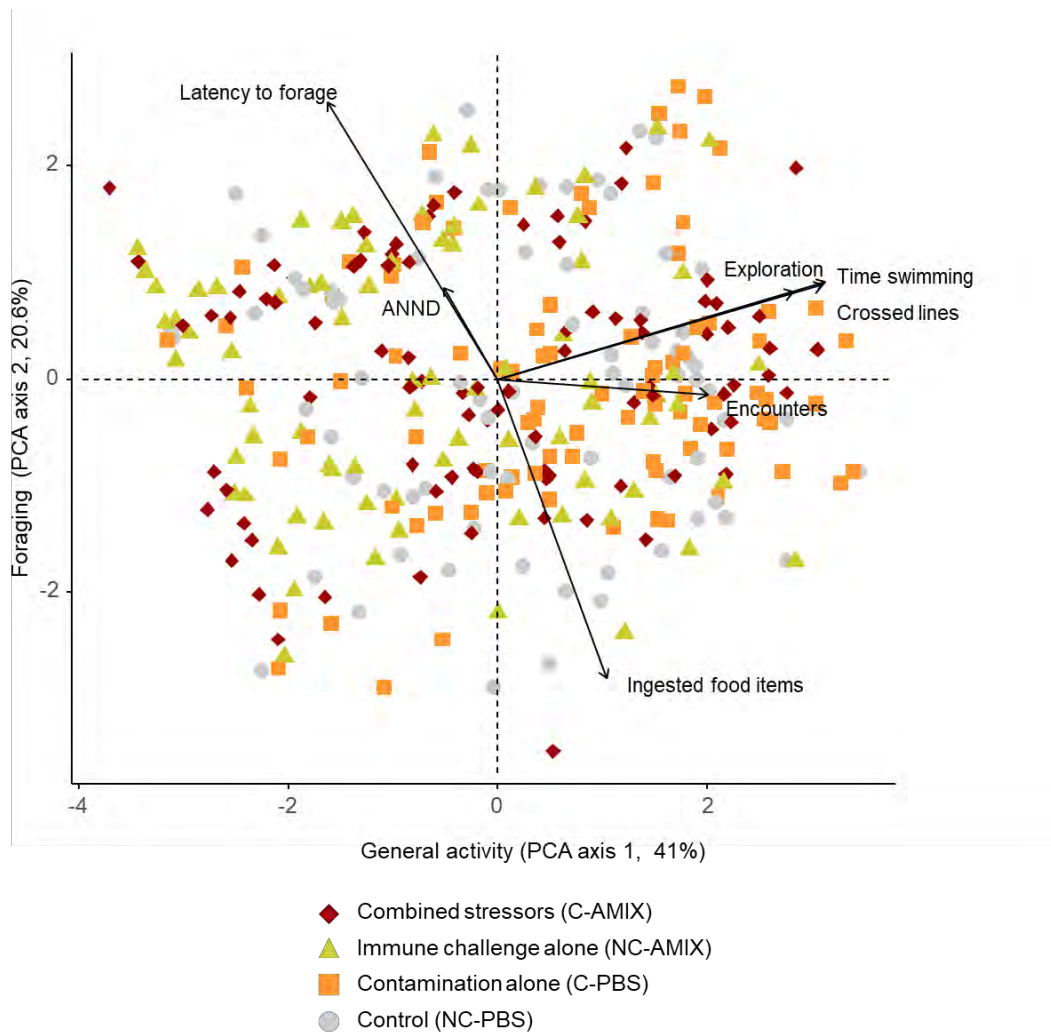


Figure S6. PCA of behavioural traits of fish exposed to multiple stressors (each triangle represents an individual). Graphical representation shows the Contamination and immune challenge treatment groups (populations are pooled). Coloured triangles represent individuals exposed to treatments (control, grey triangles: NC-PBS; contamination alone, orange triangles: C-PBS; immune challenge alone, green triangles: NC-AMIX; combined stressors, red triangles: C-AMIX). The first and the second axes explain 41% and 20.6% of the variance in the dataset respectively. These two axes were retained as general activity and foraging indices for further analyses

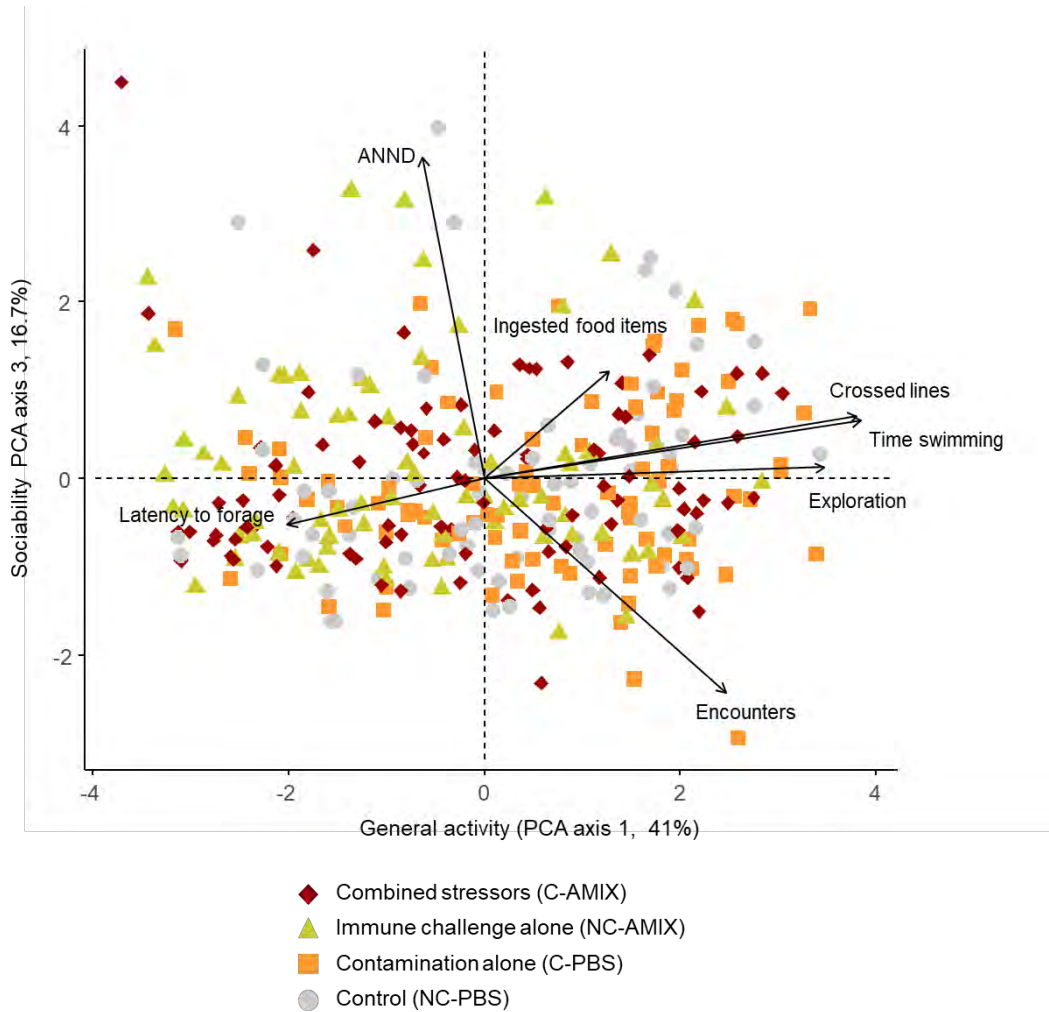


Figure S7. PCA of behavioural traits of fish exposed to multiple stressors (each triangle represents an individual). This PCA is made from the same data than Figure S6, thus graphical representation shows the Contamination and immune challenge treatment groups (populations are pooled). Coloured triangles represent individuals exposed to treatments (control, grey triangles: NC-PBS; contamination alone, orange triangles: C-PBS; immune challenge alone, green triangles: NC-AMIX; combined stressors, red triangles: C-AMIX). Here, the first and the third axes explain 41% and 16.7% of the variance in the dataset respectively. These two axes were retained as general activity and sociability indices for further analyses.



CHAPITRE 7

SYNTHESE ET DISCUSSION GENERALE

Les vertébrés aquatiques, en particulier les poissons, sont parmi les organismes les plus affectés par les stress multiples engendrés par les **changements globaux** (e.g. augmentation des températures de l'eau, contamination des milieux, propagation de pathogènes) (Dudgeon et al., 2006; Reid et al., 2019). Dans les hydro-systèmes d'eau douce, les facteurs de stress n'agissent que rarement de manière isolée (Crain et al., 2008; Folt et al., 1999). Il a d'ailleurs été récemment démontré que l'occurrence des interactions entre facteurs de stress sur les poissons peuplant les rivières européennes atteignait 42%. Parmi ces 42%, environ 60% des réponses aux stress multiples sont représentées par des interactions antagonistes ou synergiques (Fig. 40; Schinegger et al., 2016). Ainsi, l'une des préoccupations actuelles majeure est d'améliorer les connaissances des effets combinés des stress sur l'intégrité et l'état de santé des organismes aquatiques afin d'améliorer les actions de conservation des populations (Côté et al., 2016; Schinegger et al., 2016; Teichert et al., 2016).

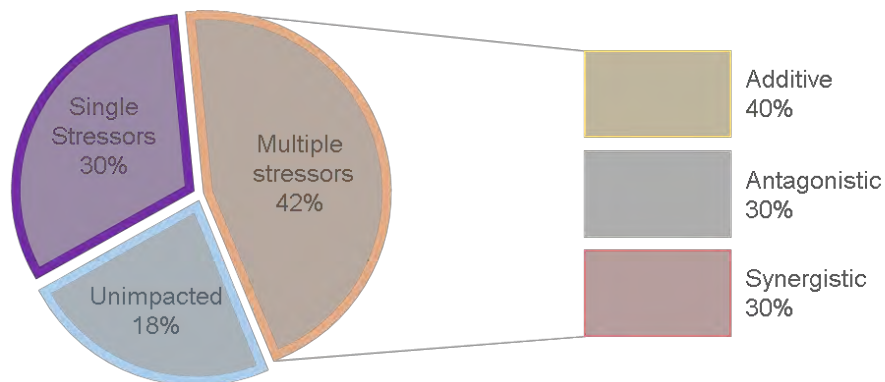


Figure 40. Occurrence des effets interactifs observés chez des poissons échantillonnés sur plus de 3100 cours d'eau européens. Les cours d'eau ou les poissons sont impactés par les stress multiples sont majoritaires (42%). Parmi ces effets multiples, plus de 60% sont attribués à des effets synergiques ou antagonistes. Adapté de Schinegger et al. 2016.

Parmi les combinaisons de facteurs de stress recensés dans les hydro-systèmes d'eau douce, l'interaction entre la température de l'eau et la contamination du milieu est déjà bien étudiée dans la littérature (e.g. Gandar et al., 2016; Jacquin et al., 2019; Noyes et al., 2009). En revanche, les parasites (et les challenges immunitaires associés) sont rarement pris en compte dans les études existantes.

En conséquence, les interactions entre parasitisme et température de l'eau, et entre parasitisme et contamination du milieu sont encore très peu connues. Ce travail de recherche de doctorat a donc eu pour objectif de répondre à deux questions majeures :

I.A) quels sont les effets de la combinaison de facteurs de stress abiotique (i.e. augmentation de la température de l'eau ou contamination de l'eau) et biotique (i.e. parasitisme) sur l'état de santé de poissons d'eau douce ?

et I.B) quels traits et à quelle(s) échelle(s) d'organisation biologique les effets de ces facteurs de stress sont-ils observables ?

Ces questions sont principalement abordées dans les chapitres 3, 5, et 6. Le chapitre 4, quant à lui, vise à évaluer le coût de la réponse à un challenge immunitaire déclenché par un mélange d'antigène. Cette étape de mise au point a permis de valider l'utilisation de ce mélange d'antigène en vue de mimer une attaque parasitaire dans le cadre des expérimentations menées dans les chapitres suivants.

De plus, il apparaît que l'histoire évolutive des populations peut influencer la réponse des individus face à un stress (e.g. Fangue, 2006; Schulte, 2014; Whitehead et al., 2017). Il est donc indispensable de tenir compte de cette variabilité entre populations en vue d'améliorer les prédictions en matière d'effet des stress multiples sur des populations naturelles. Ainsi cela soulève deux nouvelles questions : **II.A) l'origine (i.e. l'exposition passée à un facteur de stress chronique) modifie-t-elle la réponse des populations face aux stress multiples ? Et II.B) cette variabilité résulte-t-elle de processus d'adaptation locale ?** Ces questions sont principalement abordées dans les chapitres 5 et 6.

Cette discussion générale vise à synthétiser l'ensemble des résultats et éléments de discussion des différents chapitres afin d'en tirer des conclusions générales et des perspectives de recherche. L'ensemble de ces résultats a par ailleurs été synthétisés dans la Table 15. De plus, les résultats préliminaires d'une expérience de translocation réciproque entre rivières contaminées et peu contaminées seront intégrés dans cette discussion générale pour aborder la question II.B concernant l'adaptation locale des populations.

1. Stress simples





























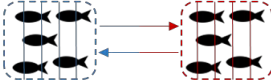
1.1. EFFETS D'UNE AUGMENTATION DE TEMPERATURE

Tout d'abord ces chapitres de thèse ont permis de dégager des résultats intéressants sur les effets des stress simples (Table 15). Au cours des dernières décennies les températures des eaux de surfaces ont augmenté, et les projections pour les années à venir montrent que cette tendance risque de s'intensifier (chapitre 1). La température est un facteur déterminant pour les organismes ectothermes dont font partie les poissons. En effet, les réactions métaboliques et les réponses physiologiques des poissons sont fortement influencées par la température du milieu (Fry, 1947; Pörtner, 2010; Pörtner and Farrell, 2008). Cette partie a pour objectif de discuter des effets d'une augmentation de température réaliste (i.e. en accord avec les projections climatiques des prochaines décennies) sur la physiologie (i.e. immunité, réserves énergétiques, stress oxydant) et les réponses des poissons d'eau douce à l'échelle individuelle (i.e. condition, comportement, survie).

Lors de l'étude *insitu* (chapitre 3), nous avons comparé l'état de santé de 16 populations de goujons occitans (*Gobio occitaniae*) vivant le long d'un gradient de températures (i.e. min/max de la moyenne des températures relevées en été : 14°C/21°C; min/max de la moyenne de températures relevées en hiver : 6°C/11°C) (chapitre 3). Les principaux résultats indiquent que le gradient de température mesuré sur le terrain n'est pas lié aux réponses physiologiques mesurées dans notre étude (i.e. immunité, réserves énergétiques et lésions aux organes) (Table 15). Cependant, la condition globale (i.e. indice de Fulton : relation masse/taille³) ainsi que la croissance (durant la première année de vie) des poissons augmentent significativement le long du gradient croissant de température.

Table 15. Synthèse de principaux résultats obtenus. La colonne « field » correspond à l'étude transversale de terrain réalisée sur 16 populations de goujons occitans le long de 3 gradients de stress : pression parasitaire (i.e. prévalence moyenne de gyrodactyles), températures de l'eau (i.e. axe d'ACP des températures moyennes), contamination par des ETMs (i.e. Toxic Unit dans l'eau). La colonne « experiment » correspond aux expériences menées en laboratoire : challenge immunitaire (injection d'antigènes PHA et LPS) et/ou à une augmentation de température (i.e. 17° vs 24°), et/ou à une contamination aux métaux (i.e. Cd, Cu, Zn à des concentrations rencontrées dans le site le plus contaminé RIOU). Les résultats préliminaires de l'approche expérimentale *insitu* (i.e. translocation réciproque) sont intégrés. Les symboles bleus « + » et « - » indiquent respectivement des relations significatives positives et négatives. L'étoile rouge témoigne de la variabilité entre populations. NS indique une relation non significative. Les tirets indiquent l'absence de données (NA)

Biological levels of organisation

	Traits	Biological levels of organisation											
		Immunity		Oxidative stress & Organ lesions		Metabolism & Energy reserves		Behaviour		Growth & Survival		Strategy	
		Field	Experiments	Field	Experiments	Field	Experiments	Field	Experiments	Field	Experiments		
Single stressor	Chapter 3 and 5 	Local immune response	-	NS	-	NS	Body condition	 /  Lower body condition due to potential metabolism acceleration	-	Activity, exploration foraging 	NS	NS	Compensation
	Chapter 3 and 6 	Local immune response	-	NS	Liver lesions	Oxidative damage  *	Energy reserves  (Lipids storage)	Body condition  *	-	Activity and exploration  *	NS	NS	Compensation
	Chapter 3, 4, 5 and 6 Or  	Local immune response	-		-	Oxidative damage 	NS	Deposition of energy reserves 	-	Activity, exploration, foraging, sociability  *	Growth 	Survival 	Compensation
Multiple stressors	Chapter 3   	Local immune response	-	-	-	-	NS	-	-	-	<u>Synergistic?</u> Growth decrease with contamination only in warm sites	-	?
	Chapter 5   	Local immune response	-	NS	-	NS	NS	NS	-	<u>Antagonistic:</u> Suppression of the stimulative effect of temperature 	NS	Reduction of survival under combined temp. and immune stress	Conservation
	Chapter 6   	Local immune response	-	NS	-	NS	NS	NS (partial results)	-	<u>Antagonistic:</u> Suppression of the stimulative effect of contaminants 	NS	NS	Conservation
	Transplant experiment 	Ongoing analyses		Ongoing analyses		Ongoing analyses		-		Local fish from contaminated areas survived better than foreigners		Ongoing	

Ainsi, les réponses au gradient de température étaient uniquement mesurables à l'échelle individuelle, et aucun effet négatif de la température n'a été détecté. Alors que l'augmentation des températures est connue pour entraîner une augmentation de l'activité métabolique et par conséquent celle de la demande énergétique chez les poissons, provoquant à terme, une réduction de la condition des individus (Claireaux and Lagardère, 1999; Gandar et al., 2017b; Gillooly et al., 2001), nos résultats suggèrent au contraire une augmentation de la condition des poissons le long du gradient de température. Plusieurs explications sont possibles.

Il est possible que via la sélection naturelle les goujons présentant une mauvaise condition corporelle ou une croissance trop lente, aient été contre sélectionnés et que nous ne soyons pas parvenus à échantillonner ces individus. Il est également possible que la température ait modifié le comportement des poissons (i.e. augmentation de l'activité de nage et de la recherche de nourriture notamment) (Burel et al., 1996; Colchen et al., 2016; Scott et al., 2017), ce qui peut permettre aux poissons de pallier l'augmentation de la demande énergétique par un plus grand apport de nourriture. Cette hypothèse semble cohérente avec les résultats d'études antérieures. Par exemple, il a été démontré que la masse moyenne ainsi que la croissance des truites (*Salmo trutta*) augmentait avec la température, en lien avec des modifications d'habitudes alimentaires (O'Gorman et al., 2012; O'Gorman et al., 2016; Woodward et al., 2010). Il a d'ailleurs récemment été proposé que la **plasticité des comportements alimentaires** pouvaient participer de manière significative au maintien des populations face aux modifications climatiques (Evans and Moustakas, 2018). Il est donc probable que sous l'effet d'un stress thermique modéré, les goujons soient capable d'augmenter leur activité locomotrice et leur taux d'alimentation, permettant ainsi de palier à l'augmentation de la **demande énergétique**, comme montré précédemment chez le l'Achigan à grande bouche (*Micropterus salmoides*) (Johnston and Dunn, 1987).

Les résultats présentés dans le chapitre 5 corroborent partiellement cette hypothèse. Dans cette expérience en laboratoire, nous avons testé l'effet d'une augmentation réaliste des températures (i.e. +7°C, 17°C vs 24°C) (IPCC, 2014) pendant 7 jours sur les réponses de poissons provenant de nos sites expérimentaux, au travers différents niveaux d'organisation. Au cours de l'exposition, la quantité de ressources alimentaires distribuée aux poissons se limitait à 1% de la biomasse des individus par

jour (selon les recommandations de Flammarion et al., 1998). Contrairement à ce qui a été observé sur le terrain, les individus exposés au traitement de température « chaud » (i.e. 24°C) présentent une réduction de leur condition globale (i.e. traits intégrant la perte de masse ainsi que la masse relative des organes génitaux et hépatiques) comparé aux individus exposés au traitement de température « froid » (i.e. 17°C) (Table 15). Cependant, les résultats indiquent aussi une augmentation de l'activité de nage, de l'exploration ainsi que de la recherche de nourriture dans le traitement « chaud ». La température de l'eau a donc bien provoqué les **ajustements comportementaux** attendus, mais ces derniers ne permettent pas de compenser la demande énergétique induite par l'augmentation des températures de l'eau, sans doute en raison de la quantité réduite de nourriture distribuée.

Ces résultats suggèrent que les poissons exposés à une hausse de température de l'eau seule mettent en place une **stratégie métabolique de compensation** (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013) qui se traduit par une perte de masse (i.e. réallocation d'énergie) au profit du maintien d'autres fonctions probablement liées à l'activité métabolique mais aussi, contrairement aux prédictions de la stratégie de compensation, au maintien voire à l'augmentation de l'activité locomotrice. Cependant des études complémentaires utilisant des manipulations de la quantité de nourriture et des mesures métaboliques plus précises seraient nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Dans cette expérience, la différence de températures choisie (i.e. +7°C, 17°C vs 24°C) était comprise dans l'intervalle de **tolérance thermique** de l'espèce (i.e. borne haute : 27-29°C) (Tissot and Souchon, 2010). Nos résultats suggèrent que dans ces conditions, la température augmenterait les besoins énergétiques des individus, mais que ces effets pourraient être en partie compensés via la mise en place de **stratégies comportementales**. Dans ce cas, les effets négatifs de la température peuvent être dus à la réduction de la disponibilité en oxygène liée à l'augmentation de la température de l'eau (« oxygen- and capacity-limited thermal tolerance », Pörtner, 2010), qui limite la capacité des poissons à assimiler l'oxygène et donc leurs **tolérance au stress thermique**.

De plus, dans les hydro-systèmes, la productivité secondaire est susceptible d'augmenter avec les températures (Benke, 1998; Reynolds and Benke, 2005)

favorisant ainsi la **disponibilité en ressources** du milieu. Il est donc possible que les sites les plus chauds soient aussi les plus productifs, avec une plus grande abondance et diversité de proies. Dans ces conditions, des modifications concomitantes du comportement et du régime alimentaire des poissons pourraient permettre de **compenser les coûts métaboliques** liés à une augmentation des températures comprise dans l'intervalle de tolérance thermique de l'espèce.

En résumé, dans notre étude, les traits les plus affectés par l'augmentation de la température de l'eau sont le métabolisme énergétique et le comportement. Dans les hydro-systèmes d'eau douce, il est possible que la mise en place d'une stratégie métabolique de compensation permette à certaines populations de poissons d'ajuster leur acquisition d'énergie (i.e. ajustement comportementaux et métabolique) pour répondre au stress thermique en cas de stress thermique simple et modéré (Fig. 41). Cependant, afin de tester cette hypothèse il serait nécessaire de réaliser des expérimentations complémentaires en mésocosme, qui tiendraient compte des effets de l'augmentation de température à la fois sur les communautés de proies (en termes de richesse et d'abondance) ainsi que sur le comportement et la physiologie des poissons.

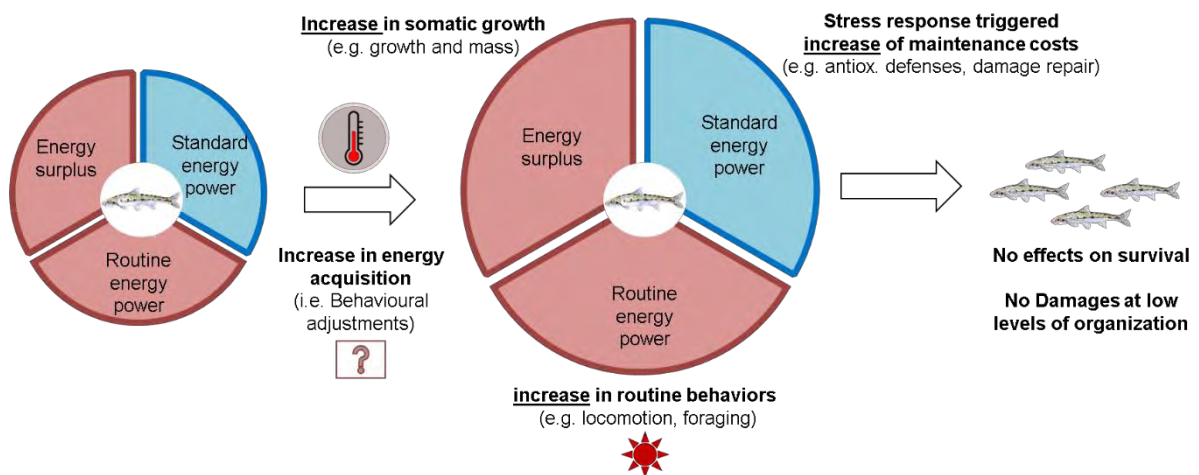


Figure 41. Schéma représentant les mécanismes potentiels en réponse à une augmentation de la température. Ici, nos résultats suggèrent que la température provoque des ajustements comportementaux, permettant d'acquérir plus d'énergie dans le milieu naturel (via la nourriture) afin de compenser le demande d'énergie croissante liée à l'exposition au stress thermique. L'étoile rouge indique la fonction pour laquelle de la variabilité entre populations a été observées.

1.2. EFFETS DE L'EXPOSITION A DES ELEMENTS TRACE METALLIQUES

La contamination des eaux de surfaces par des contaminants organiques et inorganiques est considérée comme l'une des première cause de déclin des populations de poissons d'eau douce (Dudgeon et al., 2006; Hamilton et al., 2017; Reid et al., 2019). Les éléments trace métalliques (ETMs) en particulier, sont bien connus pour affecter la physiologie (i.e. immunité, stress oxydant, métabolisme) (e.g. Qu et al., 2014; Ransberry et al., 2015; Wu et al., 2007) ainsi que le comportement (e.g. Atchison et al., 1987; Ellgaard et al., 1978; Scott and Sloman, 2004) et la survie des poissons. Cette partie de la discussion générale a pour objectif de discuter des effets d'une exposition environnementale réaliste à des ETMs sur les réponses des poissons d'eau douce au travers plusieurs échelles d'organisation biologique : moléculaire, cellulaire, et individuelle.

Dans un premier temps, nous avons comparé les effets d'un gradient de contamination en ETMs réparti le long de 16 sites dans le bassin versant de la Garonne sur certaines réponses physiologiques (i.e. bioaccumulation des métaux, immunité, réserves énergétique, lésions au foie) et individuel clés (i.e. indices de condition, croissance) (chapitre 3). Dans le cadre de cette **étude transversale**, l'utilisation d'une approche statistique via des modèles d'équations structurelles (i.e. Structural Equation Modelling - SEM) a permis de tester des liens de causes à effets. Les principaux résultats indiquent que l'**accumulation d'ETMs** est à l'origine de la stimulation de la production de **cellules immunitaires** (i.e. neutrophiles) qui impliquent une inflammation, potentiellement et partiellement à l'origine de **lésions** observées sur le foie des poissons (Fig. 42, voie rouge). Ces résultats sont en accord avec la littérature qui indique que l'exposition aux ETMs peut entraîner une stimulation de la réponse immunitaire et accroître la production de **stress oxydant** (Jolly et al., 2014; Preynat-Seauve et al., 2003; Swindle and Metcalfe, 2007) qui peut, à son tour avoir des effets délétères sur les organes tels que le foie (Don Xavier et al., 2019; Jaeschke et al., 2002; Sasaki et al., 2002).

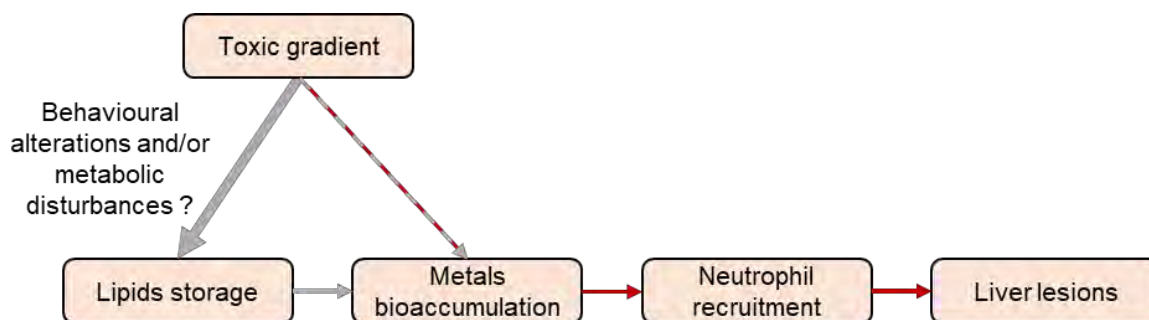


Figure 42. Cascade de réponses physiologiques induite chez les goujons occitans échantillonnés le long d'un gradient de contamination aux ETMs. La cascade représentée ici correspond à une sous partie simplifiée d'un modèle statistique (SEM) plus complexe détaillé dans le chapitre 3. Dans ce schéma, tous les liens représentés (flèches) sont positifs. La couleur rouge indique l'effet indirect du gradient de contamination sur les lésions au foie via le déclenchement d'une réponse inflammatoire chronique (reflété par un recrutement de neutrophiles). La couleur grise correspond à la boucle de rétroaction supposée entre l'accumulation croissante de lipides le long du gradient de contamination et la bioaccumulation des éléments en trace métalliques.

De plus, les poissons issus des sites les plus contaminés présentent des concentrations d'ETMs ainsi que des réserves énergétiques (i.e. lipides) plus importantes dans leurs muscles. La concentration d'ETMs accumulés est alors d'autant plus grande que les muscles contiennent de lipides. Autrement dit, le long du gradient de contamination, les poissons présentent une augmentation de leurs réserves lipidiques stockés dans les muscles, qui est liée à une accumulation plus importante d'ETMs dans ces mêmes muscles.

Ces résultats suggèrent la mise en place d'une **boucle de rétroaction positive**. La contamination du milieu semble augmenter la quantité de lipides dans les muscles, et ces lipides pourraient amplifier l'accumulation des ETMs (Fig. 42, voie grise) dans les tissus. Cette boucle de rétroaction positive en amont de la **cascade de réponses** précédemment décrite (Fig. 42, voie rouge) pourrait alors participer à l'**amplification de l'inflammation** et des **lésions** observées sur le foie, cependant les mécanismes sous-jacents restent à tester.

Deux hypothèses sont susceptibles d'expliquer ce mécanisme. Les contaminants pourraient mener à : i) la **perturbation du métabolisme** liée à la mobilisation des réserves lipidiques (Bano and Hasan, 1989; Melvin et al., 2019). Et/ou ii) la modification de la **disponibilité en ressources**, du **comportement et des habitudes alimentaires** des poissons (Clements and Rees, 1997). En effet, les poissons pourraient potentiellement augmenter leur activité de nage et leur comportement de recherche de

nourriture afin de couvrir les coûts induits par l'exposition aux ETMs. Cependant, dans le cas de l'exposition à des contaminants, l'augmentation potentielle du nombre de proies ingérées pourrait mener à une augmentation de l'exposition (i.e. transfert trophique) qui pourrait, à son tour, expliquer partiellement le lien entre l'accumulation de lipides et d'ETMs dans les sites les plus contaminés (Montiglio and Royauté, 2014). Ainsi, l'exposition aux contaminants pourrait potentiellement mener à une **boucle de rétroaction positive en amplifiant la bioaccumulation** des contaminants. Néanmoins, à notre connaissance, aucune étude empirique n'a testé l'hypothèse de cette boucle de rétroaction.

L'exposition aux ETMs pourrait donc avoir un effet stimulant sur les activités de nage et exploratoire des poissons, par exemple via des altérations du système endocrinien et neurologique (Drummond and Russom, 1990; Scott and Sloman, 2004). Dans notre étude en laboratoire, la contamination avait effectivement des effets sur l'activité des poissons (chapitre 6), mais ces réponses étaient extrêmement variables en fonction de l'exposition (i.e. stress simple ou multiples) ainsi que des populations considérées. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui montre que les réponses comportementales des poissons face à des contaminants sont très variables, résultant tantôt en un syndrome **d'hypo- ou d'hyperactivité** (Atchison et al., 1987; Drummond and Russom, 1990; Scott and Sloman, 2004).

Les résultats de l'expérience en laboratoire du chapitre 6 corroborent partiellement les hypothèses formulées dans l'étude de terrain *insitu*. Dans cette expérience, nous avons testé l'effet d'une exposition à un mélange de 3 ETMs (i.e. Cd, Cu, Zn) représentatifs du milieu, pendant 14 jours sur les réponses de poissons provenant du milieu naturel, et ce, au travers de différents niveaux d'organisation (i.e. moléculaire, cellulaire, individuel). Au cours de l'exposition en laboratoire, la quantité de ressources alimentaires distribuée aux poissons se limitait à 1% de la biomasse des individus par jour (comme recommandé par Flammarión et al., 1998). Les principaux résultats indiquent que la contamination en ETMs seule (i.e. stress simple) induit bien une augmentation de la **prolifération de cellules** liées à la réponse inflammatoire (i.e. neutrophiles) et la production de **stress oxydant**, en accord avec les résultats obtenus sur le terrain *insitu* (Table 15). Cette production de stress oxydant peut être attribuée en partie à la **réponse inflammatoire** déclenchée par l'exposition aux contaminants

(Preynat-Seauve et al., 2003; Swindle and Metcalfe, 2007). Cependant, l'utilisation d'autres marqueurs de la réponse inflammatoire serait nécessaire afin de confirmer cette hypothèse (e.g. mesure de l'expression des gènes liés aux facteurs de nécrose tumorale – TNF, immunoglobuline – Ig, et interleukines – IL). En effet, la production de stress oxydant peut aussi être liée à l'**altération du fonctionnement des mitochondries** (Isaksson, 2015; Lushchak, 2011). Quels que soient les mécanismes impliqués et la variabilité entre populations, cette augmentation de stress oxydant pourrait expliquer les **altérations du foie** observées chez les poissons échantillonnés le long du gradient de contamination *insitu* (chapitre 3) (Don Xavier et al., 2019; Jaeschke et al., 2002; Sasaki et al., 2002).

Cependant, certains résultats de l'expérience sont en contradiction avec les résultats relevés *insitu*. Lors de l'exposition en conditions contrôlées, la contamination expérimentale à un mélange de Cd, Cu et Zn n'a pas induit d'accumulation de lipides chez les poissons exposés, contrairement à ce qui a été observé sur le terrain. De plus, les poissons exposés aux ETMs perdaient du poids, mais seulement dans certaines populations. En accord avec cette dernière observation, de nombreuses études en laboratoire indiquent plutôt une **réduction du stockage des réserves énergétiques**, dont les lipides et une perte de masse en lien avec l'exposition à des ETMs (Garg et al., 2009; Pi et al., 2016; Smolders et al., 2003). Ces différences pourraient être dues à la durée d'exposition en laboratoire relativement courte (14 jours). Par exemple, des poissons chats (*Tachysurus fulvidraco*) exposés à du Zn affichent dans un premier temps une réduction du taux de lipides stockés dans leur foie (96h) suivi d'une augmentation à l'issue des 8 semaines d'exposition (Zheng et al., 2013). De la même façon, des Gambusies (*Gambusia holbrooki*) prélevées dans une zone humide contaminées aux ETMs, et donc exposées de manière chronique, présentent une quantité de réserves lipidiques plus importante que les poissons provenant d'un site de référence (Melvin et al., 2019). Il apparaît que la **dynamique de stockage et de mobilisation des réserves énergétiques** dépend de la durée d'exposition, des conditions du milieu et potentiellement du comportement des individus sous l'effet de l'exposition. Ceci pourrait expliquer les différences entre les résultats obtenus sur le terrain et en laboratoire. D'autres études sont nécessaires pour mieux comprendre les causes et les implications de ces modifications à long terme dans l'environnement.

En résumé, les résultats montrent que l'exposition à des concentrations environnementales en ETMs sur le terrain et en laboratoire affecte principalement les réponses physiologiques (i.e. la réponse immunitaire, la production de stress oxydant, le métabolisme énergétique) ainsi que le comportement des poissons. Ces effets étaient cependant peu visibles sur la condition des individus à l'échelle individuelle (i.e. condition corporelle) ou bien étaient variables en fonction de la population considérée (i.e. perte de masse seulement dans certaines populations). Les conséquences de la contamination aux ETMs sont donc essentiellement visibles à l'échelle cellulaire (i.e. recrutement de neutrophiles, stress oxydant, lésions au foie). Face à une exposition à des concentrations en ETMs environnementales, les résultats suggèrent en partie que les poissons répondent en suivant une stratégie de compensation (i.e. une augmentation de l'acquisition d'énergie via le comportement : augmentation de l'activité de nage, exploration, recherche de nourriture) ou des mécanismes de réallocation d'énergie selon les populations considérées (Fig. 43).

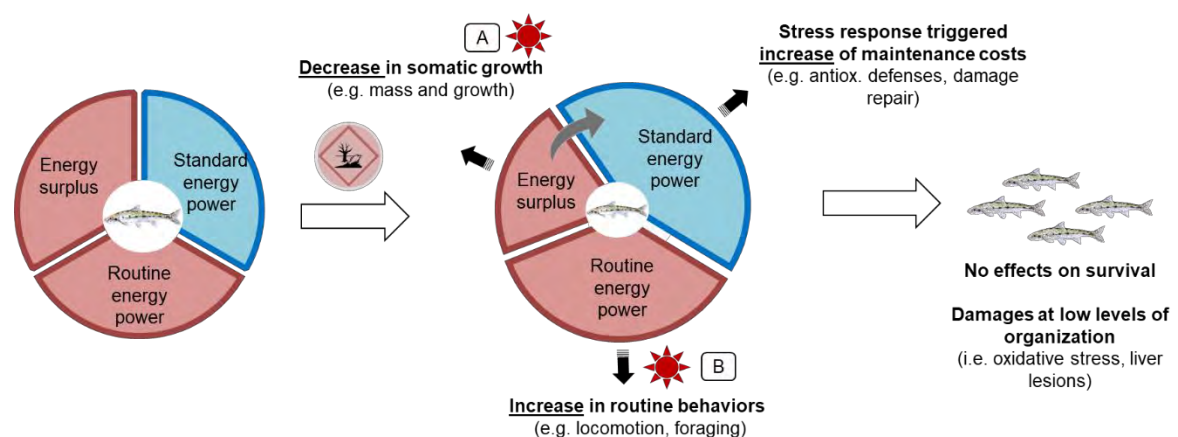


Figure 43. Mécanismes potentiels de réponse aux éléments trace métalliques (ETMs). Les réponses étaient très variables entre populations (étoiles rouges). Ainsi deux types de réponses ont été observées en fonction des populations considérées : A) une réponse typique de la stratégie de compensation qui se traduit par des mécanismes de réallocation énergétique : réduction de l'investissement dans la croissance somatique (i.e. perte de masse) en lien avec l'augmentation des coûts liés à la maintenance (i.e. défenses), représenté par la flèche grise. B) La mise en place d'ajustements comportementaux qui pourraient permettre d'acquérir plus d'énergie dans le milieu naturel (via la nourriture), et d'augmenter le pool d'énergie total pour permettre d'augmenter l'investissement énergétique dans la maintenance (i.e. défenses), représenté par les flèches noires. Les deux cas de figures pourraient permettre de répondre à la contamination de manière adéquate (i.e. sans effets négatifs sur la survie). Cependant, des dommages cellulaires ont été observés (i.e. lésions du foie).

Cependant, l'implication de ces réponses sur la survie des organismes et leur fitness reste à tester. En effet, la contamination seule induit peu d'effets sur la survie à court terme en laboratoire, mais des dommages cellulaires ont été observés dans l'étude *insitu*. Il est donc possible que des effets délétères puissent être observés sur la survie à long terme, cependant cela n'a pu être testé dans cette étude.

Deux perspectives de recherche intéressantes seraient à approfondir, notamment sur : i) la **boucle de rétroaction** supposée entre acquisition de nourriture/énergie et exposition aux contaminants (i.e. amplification) et ii) les effets des contaminants dans le cadre d'une **exposition conjointe** à une **infection par des parasites** (i.e. stress multiples). En effet, de nombreux contaminants, dont les ETMs, sont connus pour perturber la réponse des individus aux parasites, en particulier aux challenges immunitaires associés (Lüring and Scheffer, 2007; Ward et al., 2008). Nous allons tout d'abord discuter de la réponse à un challenge immunitaire simple, avant de discuter des effets combinés de ces stress.

1.3. EFFETS D'UN CHALLENGE IMMUNITAIRE

Au cours des dernières décennies, les **changements globaux** ont modifié l'occurrence de nouvelles infections par des pathogènes entraînant une augmentation des épisodes de mortalité associés (Altizer et al., 2013; Johnson and Paull, 2011). **Les parasites** affectent de manière significative la physiologie (i.e. immunité, stress oxydant, métabolisme) (e.g. Johansen et al., 2006; Reyes-Becerril et al., 2011; Rodriguez et al., 2008) ainsi que le comportement (Bonneaud et al., 2016; Kirsten et al., 2018b; Volkoff and Peter, 2004) et la survie des poissons (e.g. Bakke et al., 2007; Krkošek et al., 2007; Okamura et al., 2011). Cependant, les parasites et les **challenges immunitaires** qu'ils induisent sont encore peu pris en compte en tant que facteurs de stress à part entière. Cette partie a pour but de discuter des effets d'un challenge immunitaire sur la physiologie et les réponses des poissons d'eau douce à l'échelle individuelle à partir des résultats de nos différentes études.

Dans un premier temps, nous avons comparé les effets d'un **gradient de pression parasitaire** (i.e. prévalence moyenne par population), ou plus particulièrement ceux d'un vers monogène ectoparasite qui est le parasite le plus couramment observé chez le

goujon : *Gyrodactylus sp.*, entre 16 sites d'études (chapitre 3). Les principaux résultats indiquent que les poissons vivant dans les sites les plus parasités présentent une augmentation du nombre de neutrophiles et de monocytes dans leur sang (Table 15). Ces deux types de cellules sont impliquées dans le déclenchement et la régulation de la réponse inflammatoire (Ellis, 1977; Havixbeck and Barreda, 2015).

Ces résultats indiquent donc que la pression parasitaire du milieu stimule la réponse immunitaire et provoque une **inflammation** chez le goujon. Ces processus sont généralement coûteux en énergie (e.g. Bonneaud et al., 2003; Cabrera-Martínez et al., 2018; Otálora-Ardila et al., 2016). Nous nous attendions donc à des répercussions négatives sur la physiologie (i.e. réserves énergétiques) et les traits d'histoire de vie des poissons (i.e. croissance, indice de condition, indice hépatosomatique). Cependant, les résultats de notre étude de terrain n'indiquent pas d'effets négatifs de la pression de parasitisme sur l'état de santé des poissons.

Au contraire, les poissons exposés à une plus forte **pression de parasitisme** (i.e. nombre de poissons infectés par site) et présentant une plus forte **charge en parasite** (i.e. nombre moyen de parasites par poisson) présentent dans le même temps un taux de croissance plus élevé durant leur première année de vie (Table 15). Plusieurs explications sont possibles. Nous pouvons supposer qu'un environnement qui favorise la croissance des hôtes peut dans le même temps, participer à favoriser la transmission et la dynamique de populations des parasites (Atalabi et al., 2018). Une autre explication potentielle réside dans le fait que les individus dont la croissance est plus rapide pourraient avoir plus de chances d'être infectés. En effet, les gyrodactyles se fixent préférentiellement aux poissons les plus grands et/ou en meilleure condition (Tadiri et al., 2013). Il est aussi possible que la forte pression de parasitisme ait favorisé la sélection d'individus ayant un mode de vie plus rapide, et donc un taux de croissance plus élevé. En effet, lorsque le risque de mortalité est fort, un **rythme de vie** plus rapide est souvent sélectionné (i.e. pace of life syndrome : ensemble de traits physiologique, comportementaux et d'histoire de vie corrélés) (Kortet et al., 2010). Cependant, cette hypothèse n'a été testée qu'en réponse à la pression de prédation (Bell and Sih, 2007; Dingemans et al., 2007; Reznick et al., 2001), et peu d'études se sont intéressées aux effets du parasitisme sur la mise en place de ces rythmes de vie (Kortet et al., 2010).

De plus nous nous attendions à un lien indirect entre **pression parasitaire**, **intensité de la réponse immunitaire** (i.e. nombre de cellules immunitaires dans le sang circulant) et la **charge parasitaire**. Cependant, dans notre étude, la charge parasitaire n'était pas corrélée à la réponse immunitaire mesurée. D'autres traits pourraient malgré tout être impliqués dans l'acquisition de **tolérance/résistance** aux pathogènes chez les poissons, tels que la composition du mucus (Fast et al., 2002; Guardiola et al., 2014; Ingram, 1980) et le comportement de l'hôte (Barber et al., 2000; Klemme and Karvonen, 2016) qui peuvent moduler la charge parasitaire. De plus, il est possible que les poissons présentent des différences de **tolérance au pathogène**, c'est-à-dire, à charge parasitaire égale, différentes capacités à réduire les effets délétères des parasites (Best et al., 2014; Råberg, 2014).

Dans notre étude, les poissons des sites à forte prévalence moyenne présentent également une charge parasitaire relativement forte, mais conservent une bonne croissance ce qui soutient l'hypothèse de la mise en place de mécanismes de **tolérance**. Cependant d'autres investigations en conditions contrôlées sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse.

Dans le cadre de l'étude *insitu* (chapitre 3), aucun lien entre charge parasitaire, stress oxydant et réserves énergétiques n'a été observé. Au contraire, dans les expériences en laboratoire (chapitre 4, 5 et 6), le déclenchement de la **réponse immunitaire** induisait une augmentation de la production de **stress oxydant**, une réduction du **stockage des réserves énergétiques** dans les muscles (i.e. seulement 4 jours après stimulation, chapitre 3) (Table 15). Ces résultats suggèrent donc que le challenge immunitaire induit une cascade de réponses physiologiques et pourrait induire un coût non-négligeable pour les poissons. Ce coût serait en partie lié à l'augmentation du stress oxydant et probablement à l'altération du métabolisme. En accord avec nos résultats, une étude sur la daurade royale (*Sparus aurata*) montre que suite à **challenge immunitaire**, les gènes liés à la mobilisation des réserves énergétiques (i.e. glucides) étaient stimulés dans un premier temps (i.e. 24h post injection) avant d'être inhibés (i.e. 72h post injection) (Kaitetzidou et al., 2012). De la même manière, il a été démontré qu'un challenge immunitaire entraînait une augmentation de l'activité métabolique (*Gambusia holbrooki*), ce qui permettait à la fois de subvenir aux coûts de la réponse immunitaire mais aussi de maintenir l'activité

locomotrice des poissons (Bonneaud et al., 2016). Nos résultats sont donc en accord avec les résultats des études précédentes, qui indiquent que le déclenchement de la réponse immunitaire s'accompagne d'une cascade de réponses à différentes échelles d'organisation biologique et présenterait un coût non-négligeable pour les poissons.

Dans notre étude expérimentale, les effets du challenge immunitaire s'accompagnent aussi d'une réduction significative de l'activité de nage, d'exploration, de sociabilité et de recherche de nourriture chez les poissons, 4 jours après injection (Table 15). Comme discuté dans le chapitre 4 et plus brièvement dans les chapitre 5 et 6, ce type de réponse suggère l'importance des coûts liés à la réponse immunitaire, et est typique de la « sickness behaviour », qui permet de réduire la quantité d'énergie allouée aux comportements de routine au profit de la réponse immunitaire (Kirsten et al., 2018b; Volkoff and Peter, 2004).

Dans ce contexte, les modifications comportementales engendrées par le challenge immunitaire peuvent avoir une **valeur adaptative**, en limitant notamment l'exposition et la transmission de pathogènes (Barber et al., 2000; Behringer et al., 2018; Dugatkin et al., 1994). Par exemple, des études chez le guppy (*Poecilia reticulata*) montrent que la présence d'un congénère infecté diminue la sociabilité et la cohésion de groupes des poissons (Croft et al., 2011) ce qui limite la propagation des gyrodactyles, ectoparasites transmis par contacts sociaux (Richards et al., 2010). Dans notre étude cependant, nous n'avons pas testé les conséquences de tels ajustements comportementaux pour la transmission de pathogènes.

Ainsi, dans le cadre des expérimentations en laboratoire, les modifications comportementales observées face au challenge immunitaire sont cohérentes avec une **stratégie métabolique de compensation**, c'est-à-dire de **réallocation d'énergie** entre **la maintenance** dont le coût augmente, aux dépens du **comportement et de la condition corporelle** (chapitres 4 et 5) (Fig. 44)

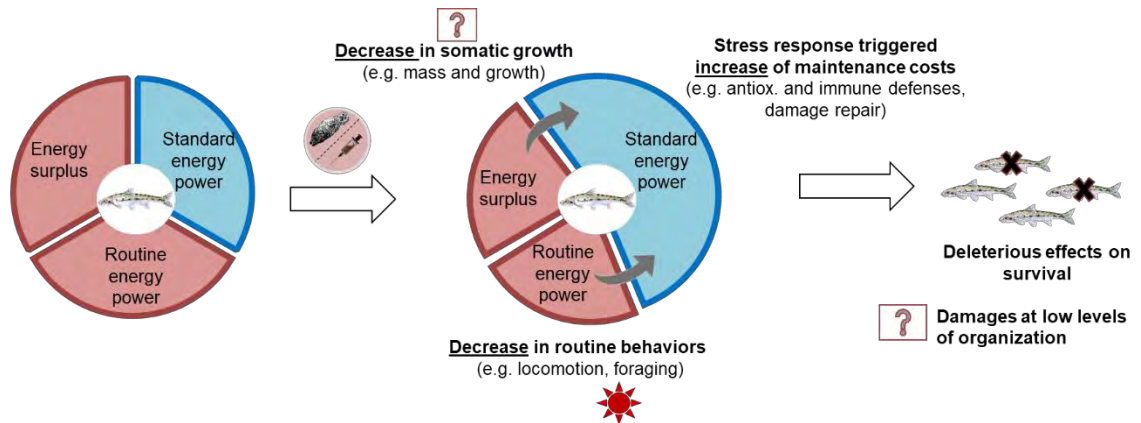


Figure 44. Mécanismes potentiels de réponse à un challenge immunitaire. Ici, les résultats suggèrent des mécanismes de réallocation énergétique entre les défenses immunitaire et antioxydantes aux dépens du comportement et de la condition corporelle (flèches grises). L'étoile rouge indique la variabilité entre populations. Le point d'interrogation indique les effets potentiellement attendus dans le cadre de la stratégie de compensation mais qui n'ont pas été observés

En d'autres termes, face au challenge immunitaire, la réponse immunitaire locale est déclenchée engendrant l'investissement d'énergie les **fonctions de maintenance et de défenses** (e.g. immunitaire, antioxydante) (Fig. 44, bleu), au détriment des **comportements de routine** (e.g. réduction de l'activité, mais de façon variable selon les populations considérées), des **réserves énergétiques** (i.e. réduction du stockage des réserves dans les muscles) (Fig. 44, rouge). Ces ajustements sont tout à fait cohérents avec une stratégie métabolique de compensation, mais à quantité d'énergie constante (i.e. sans ajustement de l'apport en nourriture). En d'autres termes, nos résultats suggèrent que les poissons n'augmentent pas leur prise alimentaire ni leur **acquisition d'énergie** face au challenge immunitaire, ce qui, contrairement aux cas de figure discutés précédemment (i.e. température et contamination), entraîne de fortes **réallocations d'énergie** visibles à travers les différentes échelles. Cela pourrait être dû au fait que le comportement a été fortement affecté par le challenge immunitaire (i.e. réduction de l'activité et de la prise alimentaire) et/ou que le fonctionnement du métabolisme a été perturbé (i.e. inhibition du métabolisme énergétique).

Cela suggère donc que le challenge immunitaire induit un coût énergétique probable, avec des conséquences potentiellement délétères pour la fitness des individus. Dans certains cas en effet, et contrairement au cadre conceptuel de **stratégie de compensation**, la survie des individus à court terme est affectée (chapitre 6). Il est donc possible que dans certaines populations, la mise en place des stratégies métaboliques et la mobilisation de l'énergie soient altérées par le challenge immunitaire, résultant en des impacts négatifs sur la survie des poissons. L'acquisition de résultats supplémentaires concernant l'expression des gènes liés au métabolisme énergétique (analyses en cours) dans le cadre de l'exposition au challenge immunitaire pourra potentiellement permettre de confirmer cette hypothèse et de préciser la manière dont le métabolisme énergétique est affecté.

De plus, nous avons testé l'effet d'un challenge immunitaire, mais il reste difficile de déterminer quelle stratégie métabolique est impliquée dans la réponse à une infection parasitaire réelle. Dans cette thèse, les antigènes utilisés ont été choisis afin de provoquer une réponse mimant une infection par une large gamme de pathogènes. Ils permettent ainsi de standardiser le challenge, de s'affranchir de l'exposition passée aux parasites et d'éviter une mortalité trop forte des poissons.

Cependant, le challenge immunitaire sous-évalue certainement les effets négatifs des parasites sur la fitness (Seppala and Jokela, 2011). Bien que nous n'ayons pas observé d'effets délétères des parasites sur l'état de santé des poissons dans le cadre de l'étude *insitu*, il est probable que les effets réels d'une infection par un pathogène ait un impact plus élevé sur les traits étudiés que le challenge immunitaire appliqué dans les procédures expérimentales.

Les résultats de l'étude de terrain suggèrent que la pression de parasitisme a peu d'effets visibles sur les poissons échantillonnés. Au contraire, en laboratoire, le challenge immunitaire semble avoir un effet relativement fort, induisant des **altérations du stockage d'énergie dans les muscles des poissons ainsi que du comportement**. Les différences observées entre les études de terrain et en laboratoire pourraient s'expliquer de plusieurs façons. Premièrement, dans le cadre de nos expérimentations, l'exposition au challenge immunitaire est de court terme alors qu'en milieu naturel, les individus infectés par des parasites (i.e. gyrodactyles) peuvent présenter des charges parasitaires très importantes et sur de longues durées (i.e. > 100 parasites par individu) (Van Oosterhout et al., 2006). Ainsi comme discuté dans les chapitres précédents, les effets induits par le challenge immunitaire sur la physiologie et le comportement des poissons pourraient être différents de ceux engendrés par les parasites eux-mêmes. Une autre source de variabilité pourrait aussi provenir du milieu naturel lui-même (e.g. disponibilité en ressource) ou bien des populations de poissons ayant évolué dans des conditions différentes et affichant des stratégies différentes en réponse au parasitisme/challenge immunitaire (Brunner et al., 2017).

En résumé, nos résultats suggèrent que le challenge immunitaire est probablement coûteux en énergie et provoque la mise en place d'une stratégie de compensation via un mécanisme de réallocation d'énergie au profit des défenses immunitaires et au détriment du comportement et des réserves énergétiques. Dans certaines conditions, le challenge immunitaire a même induit un effet délétère sur la survie des poissons. Nous nous attendons donc à des effets interactifs forts entre challenge immunitaire et température ou contamination dans le cadre d'une exposition aux stress multiples.

1.4. CONCLUSION SUR LES STRESS SIMPLES

En résumé, face un **seul facteur de stress** (température, contamination ou challenge immunitaire seul), les poissons semblent capables de mettre en place des réponses physiologiques relativement efficaces, grâce à des mécanismes de réallocation d'énergie, qui suggèrent la mise en place de **stratégies métaboliques de compensation**. Ces résultats sont en accord avec les hypothèses formulées en introduction sur les stratégies métaboliques de réponses au stress (chapitre 1 et annexe 1). Cependant, nos résultats soulignent l'importance de la **plasticité des traits comportementaux** qui semble être centrale dans la réponse au stress et permettrait de compenser, au moins en partie, les coûts surnuméraires induits par les stress simples. En particulier, les **ajustements comportementaux semblent permettre d'augmenter l'acquisition d'énergie** face à certains stress (i.e. température, contamination mais pas sous challenge immunitaire), et donc potentiellement d'augmenter le pool d'énergie totale disponible, bien que des études ciblées sur le métabolisme soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse. Face à des stress multiples, cependant, il est probable que de tels ajustements ne soient pas possibles en raison du coût trop élevé induit par l'exposition multiple. C'est cette hypothèse que nous discutons dans la section suivante.

2. Stress multiples

Au regard du coût important du challenge immunitaire mis en évidence précédemment, et des manques dans la littérature, nous nous sommes focalisés sur les interactions entre **challenge immunitaire et température**, puis entre **challenge immunitaire et contamination**. Etant donné les coûts liés à l'exposition à chacun de ces facteurs de stress, il était attendu que l'exposition aux **stress multiples** aboutisse à une demande énergétique trop importante pour le poisson par rapport à sa capacité métabolique, ce qui pourrait résulter en une **stratégie de conservation** et de « blocage métabolique » (Gandar et al., 2016; Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013).

Dans un premier temps, nous avons testé les interactions potentielles entre gradients de stress sur le terrain. De manière surprenante, seule l'interaction entre les

gradients de température et de contamination a un effet significatif sur les traits mesurés sur le terrain (Table 15). Plus particulièrement, le taux de croissance des poissons au cours de leur première année de vie augmente le long du gradient de température mais ce taux de croissance est réduit dans les sites chauds et contaminés aux ETMs. Comme discuté dans le chapitre 3, les effets croisés de la température et des contaminants ont déjà été relativement bien étudiés chez les poissons. L'augmentation de l'activité métabolique en lien avec l'augmentation des températures entraîne généralement une augmentation de l'absorption de contaminants et une augmentation du coût des processus de détoxification (i.e. des métaux et de gestion du stress oxydant) et de la tolérance thermique (e.g. Gandar et al., 2017; Grasset et al., 2016; Jacquin et al., 2019; Noyes et al., 2009). Cependant nos résultats n'ont pas mis en évidence de lien clair entre la physiologie et la croissance des goujons. Cela suggère que les effets délétères de cette interaction pourraient être compensés au cours de la vie des poissons, potentiellement via des **modifications physiologiques ou comportementales**. Une autre explication serait que la sélection naturelle ait pu entraîner l'élimination des poissons dont la physiologie a été la plus impactée par les stress multiples, mais de plus amples investigations sont nécessaires pour tester ces hypothèses. Quels que soient les mécanismes impliqués, nos résultats sont en accord avec les études précédentes qui reportent une réduction de la survie, de la reproduction ainsi que de la croissance des organismes exposés aux stress multiples (Holmstrup et al., 2010).

Au cours des expérimentations en conditions contrôlées en laboratoire, l'exposition aux stress multiples (challenge immunitaire x température ou challenge immunitaire × contamination) n'a eu aucun effet aux échelles inférieures (i.e. moléculaire et cellulaire) et sur les traits physiologiques mais de **forts effets à l'échelle individuelle** (Table 15). Ces effets observés à l'échelle individuelle pourraient affecter la fitness des poissons et donc potentiellement éliminer certains individus trop impactés par les stress multiples en rivière. Cela pourrait expliquer le fait que l'on ne détecte pas les effets de ces interactions (challenge immunitaire × température ou challenge immunitaire × contamination) dans le cadre de l'étude de terrain *insitu* (chapitre 3). Cependant cette hypothèse reste à vérifier.

De plus, nos résultats de laboratoire suggèrent en partie la mise en place de **stratégie de conservation de l'énergie sous stress multiples**. Dans ce type de stratégie,

le coût métabolique de la réponse aux stress multiples est supposé trop importante par rapport à la capacité métabolique du poisson (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013). Cet état pourrait **bloquer la réponse au stress** (i.e. faibles réponses physiologiques en terme de défenses immunitaires et/ou antioxydantes), et mener à de faibles variations de mobilisation énergétique aérobie (i.e. pas de réduction de réserves énergétiques) et du comportement (i.e. effets antagonistes sur l'activité), avec des **effets négatifs attendus sur la fitness** (i.e. diminution de la croissance et de la survie). Nos résultats sont partiellement en accord avec cette **stratégie de conservation** (Fig. 45, Table 15).

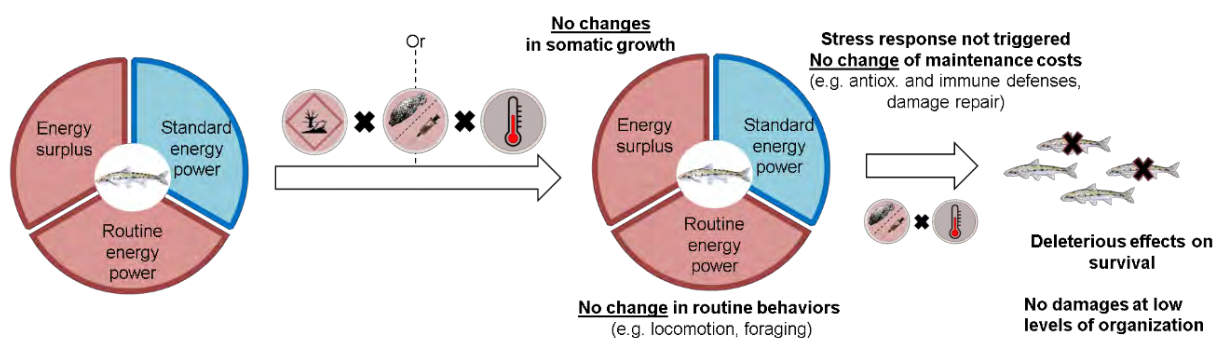


Figure 45. Mécanismes potentiels de réponse aux stress multiples. Ici, la capacité métabolique des poissons pourrait être dépassée, résultant en une stratégie de conservation, et donc en une inhibition de la réponse au stress et des ajustements physiologiques et comportementaux qui en découlent. Cette inhibition de la réponse peut alors impacter négativement la survie des poissons. L'étoile rouge indique la variabilité entre population.

Premièrement, en accord avec une **stratégie de conservation**, les résultats obtenus *insitu* et en laboratoire montrent un **faible investissement dans les fonctions de maintenance** (i.e. défenses physiologiques, immunité, stress oxydant) sous stress multiples. Cependant certaines autres études indiquent un accroissement des effets délétères sous stress multiples, notamment sur la **réponse immunitaire** (Jolly et al., 2014; Larsen et al., 2018; Le Guernic et al., 2016) et la **sensibilité des poissons aux pathogènes** (Arkoosh et al., 2001; Khan, 1990; Sheath et al., 2016). Ainsi, sur ce point, nos résultats diffèrent de ceux reportés dans la littérature ce qui pourrait s'expliquer de plusieurs manières. Il est possible que les traits immunitaires choisis dans notre étude ne répondent que peu aux stress multiples. Le suivi d'autres traits immunitaires à des échelles plus fines aurait peut-être pu permettre de détecter des effets plus subtils (e.g. Dittmar et al., 2014; Jolly et al., 2014; Reyes-Becerril et al., 2011). Dans cette étude

nous avons testé l'activité hémolytique, lysozyme et peroxydase dans le plasma sanguin, et mesuré l'expression de gènes liée à la réponse inflammatoire (e.g. Interferon IFN, Tumor Necrosis Factor TNF and Interleukine 1 IL1). Cependant, plusieurs **verrous techniques** sont apparus. Par exemple, les activités hémolytiques et lysozymes dans le sang étaient très faibles chez le goujon par rapport à d'autres espèces (chapitre 4). De plus, le goujon n'étant pas séquencé nous avons dessiné les amorces visant à amplifier les gènes de l'immunité, mais ce processus n'a pas abouti (voir chapitre 2). Il serait donc intéressant de tester l'expression d'autres gènes de l'immunité et d'autres marqueurs sanguins liés à la prolifération de cellules immunitaires et leur production d'espèces réactives à l'oxygène telles que la flambée oxydative par exemple (Dahlgren and Karlsson, 1999; Jolly et al., 2014).

En effet, le déclenchement de la réponse immunitaire est susceptible d'induire la production d'espèces réactives à l'oxygène et plus généralement de stress oxydant (Costantini and Møller, 2009; Schneeberger et al., 2013). Nous nous attendions donc à ce que les stress multiples entraînent une augmentation du stress oxydant par rapport aux stress simples (Grasset et al., 2016; Marcogliese et al., 2005). Cependant nos résultats ne montrent aucun effet interactif des facteurs de stress sur la production de stress oxydant, et ce dans toutes nos expériences. Autrement dit, **la quantité de stress oxydant produite sous l'influence des stress multiples est égale à celle produite sous l'effet de la contamination ou du challenge immunitaire seul**. Cette production limitée de stress oxydant sous stress multiples est surprenante mais pourrait potentiellement résulter de la mise en place d'une **stratégie de conservation**. En effet, lors de la mise en place d'une stratégie de conservation, l'activité métabolique (i.e. blocage métabolique) ainsi que les réponses immunitaires et donc la production d'espèces réactives à l'oxygène (i.e. source intrinsèques) sont drastiquement réduites. La production de **stress oxydant** observée alors sous stress multiple, en particulier dans le cadre du chapitre 6, pourrait provenir uniquement de **sources extrinsèques, et donc principalement des contaminants** (Lushchak, 2011). Cependant d'autres études seraient nécessaires pour tester les mécanismes sous-jacents.

Une perspective intéressante serait ainsi d'utiliser des **marqueurs plus précis liés à la production d'espèces réactives à l'oxygène**, à la production et l'activité **d'enzymes antioxydantes** ou encore aux **dommages induits par les ERO** aux

membranes lipidiques pour caractériser des réponses plus fines et sur chacune des fonctions étudiées (e.g. production d'espèces radicalaires par la réponse immunitaire, le métabolisme). Dans notre étude nous avons utilisé une méthode de mesure des dommages oxydatifs et de capacité antioxydante (DROM/OXY) validée pour divers vertébrés dont les poissons (Bagni et al., 2007; Hoogenboom et al., 2012; Simide et al., 2016). Cette méthode a le mérite de mesurer un **taux global de défenses et de dommages oxydants**. Cependant, elle ne permet pas de distinguer tous les effets discutés précédemment ni les sources de la production d'espèces radicalaires. Par exemple, la mesure de la capacité antioxydante utilisée dans ce projet (OXY) tient principalement compte de la **capacité antioxydante des molécules non-enzymatiques** (e.g. caroténoïdes, protéines, acides uriques) (Isaksson, 2013). Afin de préciser les résultats obtenus, des analyses complémentaires sont actuellement en cours afin de mesurer l'expression des gènes liés à la production d'**enzymes antioxydantes** (i.e. catalase-CAT et glutathionne peroxydase-GPX) ainsi qu'à l'**apoptose cellulaire** (caspase 3-CASP3). D'autres gènes liés à la capacité antioxydante (i.e. superoxyde dismutase-SOD) et l'apoptose cellulaire (lymphome à cellules B-Bacl-2) ont aussi été ciblés mais le développement des amorces n'a pas abouti en raison des **verrous techniques** présentés précédemment (i.e. espèce non séquencée).

Cependant, même si certains traits immunitaires et liés au stress oxydant n'ont pas été mesurés, nos résultats montrent qu'au final, **les stress multiples n'amplifient pas l'investissement en terme de défense immunitaire et de défense contre le stress oxydant**, par rapport aux stress simples. Cela suggère en partie la mise en place d'une stratégie de conservation. En accord avec cette **stratégie métabolique de conservation**, les stress multiples n'ont entraîné que peu de modifications du métabolisme, que ce soit à l'échelle cellulaire (i.e. réserves dans les muscles) ou individuelle (i.e. condition corporelle, masse des organes) (Table 15). Ceci suggère donc que **l'activité métabolique** n'a pas été stimulée par les stress multiples, et **pourrait même avoir été bloquée** (i.e. blocage métabolique). Cependant, il serait important d'utiliser d'autres marqueurs plus précis et directement reliés à l'activité métabolique (e.g. taux métabolique au repos, gamme aérobie, capacité respiratoire mitochondriale) pour tester cette hypothèse à des **niveaux d'organisation plus fins** (Bonneaud et al., 2016; Salin et al., 2016). Il serait aussi intéressant de mesurer

l'expression de gènes liés au **métabolisme aérobie et anaérobie** afin de mieux caractériser la mise en place des stratégies métaboliques sous stress multiples (Bermejo-Nogales et al., 2014). Dans notre étude, plusieurs gènes cibles ont été choisis (i.e. cytochrome-c-oxydase-COX, glucokinase-HK, pyruvate carboxylase PCX, glycogène phosphorylase PYGL). Cependant, en raison des difficultés techniques associées au design des amorces, seuls les gènes liés à la néoglucogénèse et à la respiration cellulaire (i.e. pyruvate carboxylase PCX, glycogène phosphorylase PYGL) ont pu être utilisés dans le cadre de ce projet, et le traitement des résultats est encore en cours.

D'après la théorie des stratégies métaboliques, **l'arrêt potentiel de l'activité métabolique** engendrée par la mise en place de la **stratégie de conservation** devrait avoir des répercussions à l'échelle individuelle, en bloquant l'investissement d'énergie dans les **comportements de routine** (i.e. activité de nage, exploration, recherche de nourriture) ainsi que dans les **fonctions de maintenance**, avec des impacts négatifs sur la **survie des poissons** (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013). En accord avec cette hypothèse, **les stress multiples inhibent la mise en place des réponses comportementales** : l'activité de nage, exploratoire et de recherche de nourriture des poissons est réduite chez les poissons exposés aux stress multiples par rapport à ceux exposés aux stress simples, ce qui se traduit par un **effet antagoniste** des deux combinaisons de stress **sur le comportement des poissons**. Ceci suggère que dans le milieu aquatique l'exposition combinée à deux facteurs de stress pourrait **inhiber la mise en place de stratégies comportementales** (i.e. bloquer la plasticité de réponse des traits comportementaux). Nos résultats suggèrent donc que sous l'effet des stress multiples, le blocage de ces ajustements comportementaux ne permettrait pas d'augmenter la quantité d'énergie disponible et donc la capacité métabolique des poissons. Cela pourrait potentiellement expliquer la **réduction de l'investissement énergétique dans les défenses immunitaire et antioxydantes**, et le blocage potentiel du métabolisme (i.e. réduction drastique de la capacité métabolique de l'individu – gamme aérobie) (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013). Cette hypothèse est partiellement en accord avec nos résultats. Cependant, les mécanismes sous-jacents (e.g. altérations du fonctionnement des mitochondries) restent à tester. En accord avec la mise en place d'une **stratégie de conservation**, cela pourrait avoir des conséquences **négatives sur la survie des poissons**. Nos résultats indiquent effectivement que les

stress multiples interagissent de manière synergique au niveau de la survie des poissons, entraînant une forte réduction du taux de survie des poissons exposés à une augmentation de la température de l'eau et au challenge immunitaire (chapitre 5). Cependant, la survie des poissons n'était pas affectée dans le cas de l'exposition combinée aux ETMs et au challenge immunitaire, ce qui suggère que d'autres études sont nécessaires en vue de tester si ce cadre conceptuel peut être généralisable.

En résumé, les résultats de cette thèse montrent que les stress multiples étudiés ont des effets principalement à l'échelle individuelle, en particulier sur les traits comportementaux (i.e. effets antagonistes) et la survie (i.e. effet synergique) des poissons. En d'autres termes, les stress multiples entraînent une suppression partielle des réponses observées sous l'influence des stress simples, potentiellement en lien avec la mise en place d'une stratégie métabolique de conservation. Des analyses plus poussées, notamment sur l'activité métabolique seraient utiles pour confirmer ou infirmer cette hypothèse. Dans tous les cas, les stress multiples ont des effets délétères plus importants que les stress simples sur la croissance et/ou la survie, ce qui soulève des inquiétudes quant aux impacts des activités humaines pour la résilience des populations de poissons sauvages. Le comportement semble être un trait central dans la réponse aux stress simples et multiples, ce qui ouvre des perspectives de recherche intéressantes pour mieux anticiper les effets des stress environnementaux sur les poissons.

3. Perspectives : échelle d'organisation et importance du comportement pour faire face aux stress

Ainsi, nos résultats montrent que la **modification du comportement** des poissons est une **variable d'ajustement importante** permettant soit : i) de pallier les coûts induits par la réponse au stress simple via **l'augmentation de l'acquisition de nourriture** et donc l'augmentation du pool d'énergie disponible. Ou, ii) via des **mécanismes de réallocation** de l'énergie allouée aux traits comportementaux vers les mécanismes de défense et plus largement de maintenance (e.g. challenge immunitaire). Sous l'effet des stress simples, la mobilisation d'énergie via des ajustements à l'échelle individuelle semble donc permettre de subvenir à la demande énergétique induite par les réponses observées aux échelles plus fines (i.e. moléculaire et cellulaire). En conséquence, peu d'effets négatifs sur la survie sont observés, bien que des suivis à plus long terme soient nécessaires pour confirmer cette hypothèse.

Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant une remobilisation de l'énergie allouée aux traits comportementaux vers les mécanismes de défense en cas de stress simple (i.e. inhibition de la réponse comportementale, réallocation d'énergie) (Gandar et al., 2016; Handy et al., 1999; Kirsten et al., 2018b). Cependant, selon l'intensité du stress et son mode d'action (e.g. action neurotoxique des contaminants, concentration d'antigènes), **les ajustements comportementaux peuvent varier**. Par exemple, des études montrent que l'activité locomotrice des poissons augmente jusqu'à une certaine concentration de Cd testée puis diminue après avoir dépassé ce seuil (Ellgaard et al., 1978). De même, dans notre étude expérimentale testant plusieurs concentrations d'antigènes (chapitre 3), les réponses comportementales des goujons varient fortement selon la dose d'antigène appliquée : l'activité augmente pour de faibles doses et diminue pour de fortes doses d'antigènes.

Ainsi, sous stress simple, la mise en place d'ajustements comportementaux dépend probablement d'un **seuil au-delà duquel une stratégie de conservation pourrait être mise en place** (Petitjean et al., 2019; Sokolova, 2013). En effet, ces effets de seuil observés au niveau du comportement pourraient indirectement s'expliquer par

des **seuils de tolérance énergétiques et/ou métaboliques**, mais aussi directement par des effets neurologiques et hormonaux induits par les facteurs de stress (Ashley and Demas, 2017; Drummond and Russom, 1990; Kirsten et al., 2018a; Sapolsky et al., 2000). Par exemple, certains contaminants (e.g. Cd, Cu, Zn) perturbent le fonctionnement des neurotransmetteurs (Araújo et al., 2018; Richetti et al., 2011; Tilton et al., 2011) ainsi que l'intégrité de cellules mécano-réceptrices (i.e. ligne latérale : cellules du neuromaste) et du système nerveux central (Sonnack et al., 2015). Ces effets neurotoxiques pourraient expliquer en partie les effets comportementaux observés dans le chapitre 6.

De plus, la sécrétion d'hormones en lien avec la réponse au stress (e.g. glucocorticoïde catécholamine) peut aussi modifier le fonctionnement des neurones (Groc et al., 2008; Sapolsky et al., 2000), les fonctions métaboliques et la mobilisation des réserves énergétiques (MacDougall-Shackleton et al., 2019; Sapolsky et al., 2000). Cependant, **les hormones impliquées dans la réponse au stress n'ont pas été mesurées** dans cette thèse, car notre objectif premier n'était pas de caractériser les mécanismes sous-jacents expliquant les réallocations d'énergie, mais plutôt de **centrer notre réflexion sur l'investissement** dans les différents traits et les conséquences de ces investissements. Bien que ces aspects hormonaux n'aient pas été abordés dans le cadre de ce projet, ils pourraient permettre **d'étudier plus finement les mécanismes liés à la mise en place des stratégies métaboliques et des altérations comportementales** observées. D'autres investigations sont donc nécessaires afin de mieux comprendre la manière dont ces changements de stratégies métaboliques et comportementales sont mis en place (i.e. effet seuil, environnementaux, hormones, effets neurotoxiques) pour permettre de mieux prédire l'effet des stress sur les poissons.

Nos résultats suggèrent que l'exposition aux stress multiples empêche en partie la mise en place d'ajustements comportementaux (i.e. antagonisme). En milieu naturel, une telle **inhibition des réponses comportementales** observées dans nos expériences pourrait avoir des **conséquences importantes sur la fitness** des individus, en modifiant par exemple leur capacité à trouver des partenaires sexuels et à s'accoupler, à se déplacer en banc (i.e. sociabilité) ou encore à acquérir de la nourriture (Sopinka et al., 2010; Wingfield, 2003; Wong and Candolin, 2015). Ces effets comportementaux des stress multiples pourraient donc avoir des **conséquences en cascade pour le maintien**

des populations et la composition des communautés (e.g. interactions proies-prédateurs, hôte-parasites) (Fig. 46) (Gilman et al., 2010; Royauté and Pruitt, 2015; Tuomainen and Candolin, 2011).

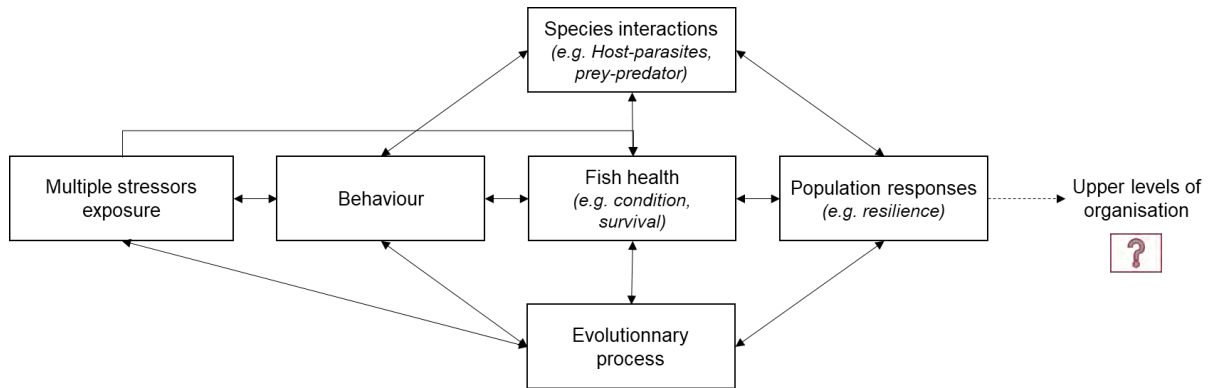


Figure 46. Effets en cascade potentiels des stress multiples sur les processus évolutifs et les populations via les altérations comportementales. En fonction de la plasticité de la réponse comportementale, une suite de modification aux échelles d'organisation supérieures est attendue, avec la modification de l'état de santé (e.g. condition) et la fitness des poissons ainsi que de la réponse des populations, en lien avec les processus évolutifs. Les effets de telles modifications sur les niveaux d'organisation supérieurs (e.g. écosystème) restent à tester. Adapté de Tuomainen and Candolin (2011).

Les modifications comportementales induites par l'exposition aux stress sont donc susceptibles d'affecter la fitness des individus (e.g. condition, survie, reproduction) et donc **les processus évolutifs** (Fig. 46). En effet, au cours des deux dernières décennies, plusieurs auteurs ont souligné l'importance des stress environnementaux sur les **altérations comportementales** et leurs **conséquences pour les processus évolutifs et la persistance des populations** (Buchholz, 2007; Caro, 2007). Dans un contexte de **changement globaux** il apparait donc indispensable de tenir compte des différences comportementales entre **populations ayant des historiques d'exposition différents** (i.e. sous l'influence des processus évolutif) afin de mieux prédire l'effet des facteurs de stress actuels et futurs.

4. Variabilité de réponses aux stress entre populations : perspective comportementale

En accord avec ce cadre théorique, nos résultats montrent une **forte variabilité de réponses entre populations** face aux stress simples. Par exemple, les deux expérimentations effectuées en conditions contrôlées (chapitres 5 et 6) indiquent que les réponses comportementales varient fortement entre populations, en particulier face au challenge immunitaire et à l'exposition aux ETMs. Par exemple, l'activité générale (i.e. axe d'ACP représentant l'activité de nage, l'exploration et la recherche de nourriture) des poissons provenant de CAUSAL (chapitre 5), RIOU, ARIMAS (chapitre 6) et FARM (chapitres 4 et 6) est réduite face au challenge immunitaire. Au contraire, les poissons issus de la population AUSEI (chapitres 5 et 6) ne présentent aucune altération de leur activité générale face au challenge immunitaire. Cette variabilité de réponses entre populations face au challenge immunitaire pourrait provenir de différences d'expositions ou de coûts de la réponse face à des parasites dans le milieu naturel (Scharsack et al., 2016). Cependant dans notre étude, les gradients de parasitisme ne sont pas corrélés aux réponses physiologiques (chapitre 3), et comportementales mesurées face au challenge immunitaire (chapitre 5 et 6). Mais dans le cadre de ce projet, la pression de parasitisme était définie par la prévalence en gyrodactyles relevée au moment de l'échantillonnage des poissons, elle ne tient donc pas compte de toute la communauté de parasites ni des variations annuelles et saisonnières d'abondance de ces derniers.

En revanche, le gradient de contamination métallique est assez bien corrélé aux réponses physiologiques et comportementales observées face à une contamination expérimentale (chapitre 6). En effet, parmi les 5 populations testées, les 2 populations provenant des sites les plus contaminés (RIOU et AUSEI) affichent une augmentation de leur activité de nage, d'exploration et de recherche de nourriture lorsqu'elles sont exposées aux contaminants. Au contraire, les deux populations provenant de sites peu contaminés (FARM et ARIMAS), ne présentent aucune modification de ces comportements lorsqu'elles sont exposées aux contaminants, et **l'une d'elle (FARM) semble particulièrement sensible à la contamination**. En effet, la population

provenant d'étang de pisciculture (FARM) présente une augmentation du stress oxydant et une perte de masse importante face à l'exposition expérimentale aux ETMs (i.e. mélange représentatif des concentrations environnementales en Cd, Cu, Zn). Bien qu'il soit tentant d'attribuer cette **variabilité de réponse physiologique** à l'historique d'exposition des populations aux contaminants, d'autres hypothèses pourraient expliquer ces réponses. Par exemple, la domestication des individus (Johnsson et al., 2014), ou encore l'absence de prédateurs dans le milieu (Bell et al., 2010). Quels que soit les mécanismes sous-jacents permettant d'expliquer cette variabilité de réponses, notamment en termes de sensibilité aux contaminants, nos résultats suggèrent de mieux prendre en compte l'origine des populations de poissons afin de mener des politiques de conservation efficaces.

La **variabilité de réponses comportementales** observée pourrait être due à l'existence de **syndromes** (e.g. corrélations entre traits de comportementaux, physiologiques, d'histoire de vie) le long d'un continuum de **stratégies d'histoires de vie** (e.g. lent-rapide) (e.g. Barber and Dingemanse, 2010; Dingemanse et al., 2007; Koolhaas et al., 1999; Réale et al., 2007; Réale et al., 2010). Il est possible que la contamination favorise ainsi certaines **combinaisons de traits comportementaux et/ou physiologiques**, c'est-à-dire certains syndromes si ceux-ci apportent une meilleure fitness en milieu contaminé. Par exemple, nos résultats montrent que les populations de goujons provenant de sites plus contaminés ont une plus **forte activité et une plus grande plasticité comportementale** et/ou une **plus forte capacité à acquérir de la nourriture**. Certaines études ont montré que d'autres facteurs de stress environnementaux comme la prédation pouvaient favoriser ce type de syndrome, par exemple chez les épinoches, réaction leur permettant d'augmenter leur chance de survie face aux prédateurs (Bell and Sih, 2007; Bell et al., 2010; Dingemanse et al., 2007). Les pressions de sélection exercées par les **stress biotiques** (i.e. prédateurs, parasites) et **abiotiques** (i.e. contamination, température) pourraient donc potentiellement **sélectionner certaines combinaisons de traits** (e.g. comportementaux et/ou physiologique et/ou d'histoire de vie) et engendrer de la **variabilité de sensibilité** au stress entre populations, qu'il est nécessaire de prendre en compte (annexe 2).

De plus, l'exposition à un ou plusieurs facteurs de stress, en particulier lorsqu'il s'agit de contaminants, est aussi susceptible **d'altérer la structure des syndromes**, c'est-à-dire les liens entre traits (Royauté et al., 2014, annexe 2). Plus particulièrement, l'exposition à des facteurs de stress pourrait altérer le lien entre les réponses comportementales et la physiologie (i.e. découpler ou renforcer les corrélations) et donc **masquer ou révéler les syndromes** (Killen et al., 2013) (Fig. 47, annexe 2). Il serait donc intéressant de poursuivre les investigations sur la mise en place de syndromes entre traits physiologiques et comportementaux dans de futures analyses (i.e. tester les effets des facteurs de stress, simple et multiples, sur les corrélations entre traits en fonction des populations considérée).

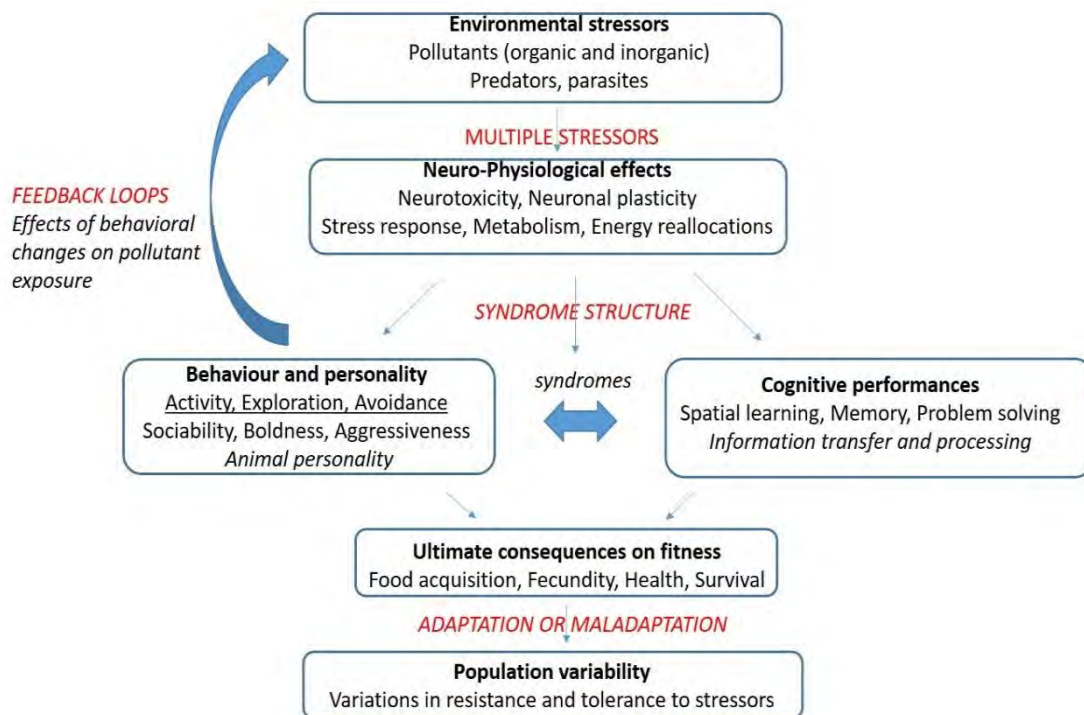


Figure 47. Liens potentiels entre les effets des facteurs de stress, la physiologie, le comportement et la divergence entre populations. Tirée de l'annexe 2.

Enfin, les modifications environnementales pourraient entraîner la mise en place de **boucles de rétroaction positives ou négatives**. Dans notre étude, la contamination entraîne par exemple une augmentation de l'activité, l'exploration et de l'acquisition de nourriture dans certaines populations, ce qui permet de pallier l'augmentation des coûts liés à la maintenance (i.e. défense : réponses physiologiques). Ces **effets comportementaux peuvent permettre d'augmenter l'énergie acquise, mais pourraient aussi potentiellement augmenter le risque d'exposition aux contaminants**, en particulier chez les poissons benthiques tels que les goujons. En effet, l'augmentation de l'activité de fouille et de recherche de nourriture pourrait en retour, entraîner une augmentation des contacts avec le sédiment et donc avec les contaminants qui y sont adsorbés, en particulier sur les fractions comportant la part labile des contaminants (e.g. eau interstitielle, certains complexes organiques). De plus, l'augmentation de l'ingestion de proies potentiellement contaminées peut aussi favoriser les transferts de contaminants et leur bioamplification (Ramade, 2007). La stimulation de l'activité et de l'acquisition de nourriture pourrait alors résulter en une **boucle de rétroaction positive et amplifier les effets négatifs des contaminants** sur l'état de santé des poissons comme suggéré par Montiglio and Royauté (2014) (Fig. 47, annexe 2). Cette hypothèse de rétroaction est une perspective prometteuse à tester dans de futures études. Par exemple, il serait intéressant de comparer les niches trophiques des poissons ayant différents niveaux de contamination dans leur muscle au sein et entre populations.

Au final, cette thèse s'ajoute au corpus de littérature qui montre que la variabilité intraspécifique (i.e. ici en termes de réponse comportementale et physiologique au stress) joue un rôle central dans la manière dont les individus et les populations interagissent et s'adaptent à leur environnement (Bolnick et al., 2011; Moran et al., 2016; Raffard et al., 2019). Cependant, d'autres études sont nécessaires afin de caractériser les déterminants ainsi que les bénéfices (i.e. adaptation, effet positif sur la fitness) et les coûts (i.e. maladaptation, effet négatif sur la fitness) de ces stratégies comportementales et syndromes dans le cadre de l'exposition aux stress multiples.

5. Variabilité intraspécifique de réponse aux stress : perspective évolutive

5.1. MECANISMES ADAPTATIFS

Un nombre croissant d'études montre que **certains stress chroniques, dont la contamination, peuvent dans certains cas affecter les trajectoires évolutives** des populations de poissons (Bélanger-Deschênes et al., 2013; Brady et al., 2017; Whitehead et al., 2017). Par exemple, chez le choquemort (*Fundulus heteroclitus*), certaines populations se sont adaptées à la pollution (i.e. ont une fitness relativement élevée face à la contamination) (Reid et al., 2016; Whitehead et al., 2017). Plusieurs **mécanismes évolutifs** peuvent expliquer ces phénomènes, notamment **la divergence génétique** (i.e. sélection des génotypes les plus performants) (Fig.48 A), et **la plasticité phénotypique** (i.e. ajustement du phénotype à partir d'un même génotype) (Fig. 48 B) (Hendry et al., 2008; Merilä and Hendry, 2014).

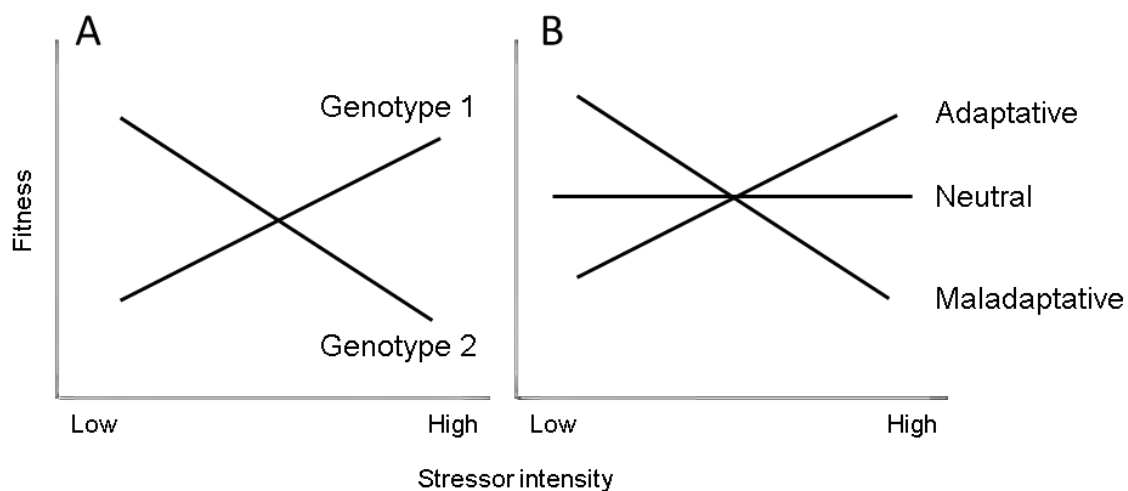


Figure 48. Illustration du rôle du génotype (A) et de la plasticité (B) dans l'adaptation. A) un génotype 1 confère une meilleure adaptation (meilleure fitness) dans l'environnement le plus contaminé (high), mais pas dans un environnement moins contaminé (Low) (interaction GxE). B) La plasticité adaptative permet d'avoir une meilleure fitness en environnement pollué, tandis qu'une plasticité maladaptative réduit la fitness en milieu pollué. Adapté de Nicotra et al. (2010)

Ces deux mécanismes peuvent à la fois avoir des effets positifs (i.e. adaptation) ou négatifs (i.e. maladaptation) sur la fitness des individus (Fig. 48, annexe 1, Brady et al., 2019). Par exemple, les choquemort (*Fundulus heteroclitus*) provenant de sites pollués aux polychlorobiphényles (PCBs) ont une meilleure capacité à détoxifier les polluants organiques persistants grâce à la fixation de génotypes plus résistants (i.e. mutations sur des récepteurs particulier) (Reid et al., 2016) leur permettant d'avoir une meilleure fitness dans un milieu contaminé (Fig. 48 A). Dans ce cas, il s'agit d'une **adaptation génétique fixée par sélection naturelle**. Au contraire, des lignées génétiques de guppys F2 (*Poecilia reticulata*) provenant de rivières contaminées par des hydrocarbures présentent une moins bonne fitness que des guppys (i.e. génotypes) issus de rivières peu polluées, quel que soit l'environnement (Rolshausen et al., 2015). Il s'agirait ici d'une **maladaptation génétique**, dont les mécanismes sont encore débattus (Brady et al., 2019). Ainsi, la mise en place de **réponses plastiques** peut avoir des effets négatifs en fonction des mécanismes impliqués (i.e. épigénétiques, hormonaux, pléiotropie) et de l'intensité et la fréquence des **changements environnementaux** (Crozier and Hutchings, 2014; Hendry et al., 2008) mais ces derniers restent peu étudiés, en particulier dans un contexte de stress multiples.

De manière générale, la plupart des études se concentrent essentiellement sur la plasticité de réponses physiologiques tandis que les réponses comportementales sont moins étudiées (Dochtermann et al., 2019). Ainsi, peu d'études empiriques se sont penchées sur **la variabilité des réponses entre populations ayant évolué dans des milieux contrastés**, en incluant les réponses physiologiques et comportementales, ainsi que les liens potentiels entre ces traits (i.e. syndromes). Dans le cadre de ce projet de recherche doctorale, nous avons comparé des populations de poissons F0 issues de sites plus ou moins contaminés répartis le long d'un gradient de pollution. Les différences entre populations peuvent donc être à la fois issues de **différences génétiques** (i.e. génotypes différents entre populations) **ou plastiques** (i.e. acclimatation selon leur historique d'exposition en rivière), mais il nous est impossible de distinguer ces mécanismes. Des études futures sur des marqueurs neutres (i.e. microsatellites) et potentiellement sous sélection (SNPs) seraient une perspective intéressante pour explorer ces mécanismes.

Les résultats de cette thèse suggèrent que la **plasticité**, et en particulier la **plasticité comportementale**, joue un rôle central dans l'acquisition de tolérance ou de résistance au stress, via des ajustements d'acquisition/réallocation d'énergie. Ces résultats sont en accord avec la littérature qui montre que la plasticité comportementale des individus est dépendante du **contexte environnemental** au cours de leur développement ainsi que de leur **état énergétique** (Royauté et al., 2019). Plus particulièrement, la pollution peut affecter les réponses comportementales plastiques des populations. Par exemple, des guppys (*Poecilia reticulata*) provenant de rivières contaminées aux hydrocarbures présentent une réduction de leur exploration lors d'une contamination expérimentale sans doute en lien avec le coût induit par l'exploration en milieu contaminé ou bien des altérations des capacités cognitives des poissons (Jacquin et al., 2017, annexe 2). Cependant, cette divergence de plasticité n'a pas d'effet positif sur la fitness des guppys, ce qui suggère que les ajustements comportementaux peuvent aussi être **maladaptatifs** (Fig. 48 B) (Hamilton et al., 2017; Rolshausen et al., 2015).

Les **mécanismes évolutifs** (i.e. adaptation génétique ou plasticité) sont également susceptibles d'aboutir à de l'**adaptation locale** (i.e. meilleure fitness des individus dans leur environnement local que dans un nouvel environnement) (Kawecki and Ebert, 2004). C'est cette hypothèse que nous avons testée dans une expérience de translocation réciproque *insitu* (Fig. 49).



Figure 49. Site de translocation (ARIMAS) et cage utilisée pour les expériences d'encagement en rivière. Les poissons sont maintenus par groupes de 10 à 12 individus dans chaque cage pendant 14 jours, et la nourriture peut passer librement à travers les mailles de la cage.

5.2. ADAPTATION LOCALE : EXPERIENCE DE TRANSLOCATION

Afin de tester la mise en place de processus d'**adaptation locale entre populations provenant de milieux plus ou moins contaminés**, nous avons mené une expérimentation de translocation réciproque *insitu*. Il s'agissait alors d'encager des individus provenant d'un milieu peu contaminé, en milieu contaminé et vice versa (i.e. 4 populations au total), et de tester leur réponse à un facteur de stress additionnel : un challenge immunitaire (Fig. 50). Pour chaque groupe, la moitié des poissons était encagée dans son propre site d'origine pour contrôler le stress lié à l'encagement.

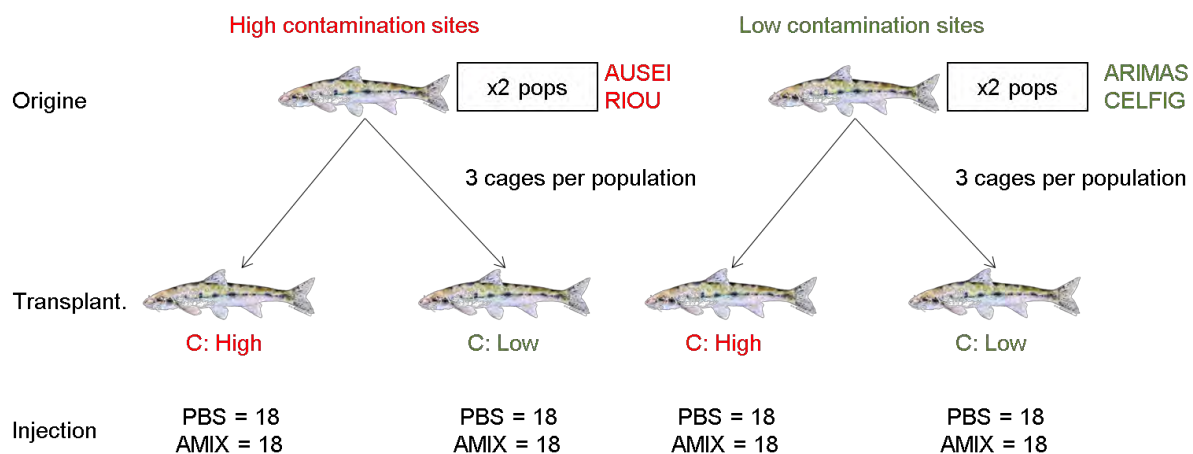


Figure 50. Design de l'expérience *insitu* de translocation réciproque. Les individus provenant de milieux contaminés (2 populations) et peu contaminés (2 populations) ont été transplantés par couple de site proches géographiquement : AUSEI et ARIMAS – RIOU et CELFIG. Ainsi, la moitié des individus prélevés sur chacun des sites a été encagée dans leur site d'origine pour contrôler le stress d'encagement, tandis que l'autre moitié a été transplantée. Les poissons ont été maintenus par groupes de 10 à 12 individus dans chaque cage pendant 14 jours. La moitié des individus de chaque cage a également reçu une injection d'antigènes (i.e. mélange de LPS et PHA) ou de solution saline (Contrôle : PBS).

Les résultats de cette étude étant encore en cours d'analyses, seule la survie des poissons à la fin des 14 jours d'exposition est présentée ici (Fig. 51). De manière intéressante, nous avons observé une réduction de la survie chez les populations provenant de milieu peu contaminé et encagés en milieu contaminé. L'injection d'antigène n'avait pas d'effet sur la survie des poissons.

Cela suggère que les poissons ayant évolué dans un milieu contaminé ont acquis une **meilleure tolérance à la contamination** environnementale, bien que les mécanismes sous-jacents restent encore à explorer.

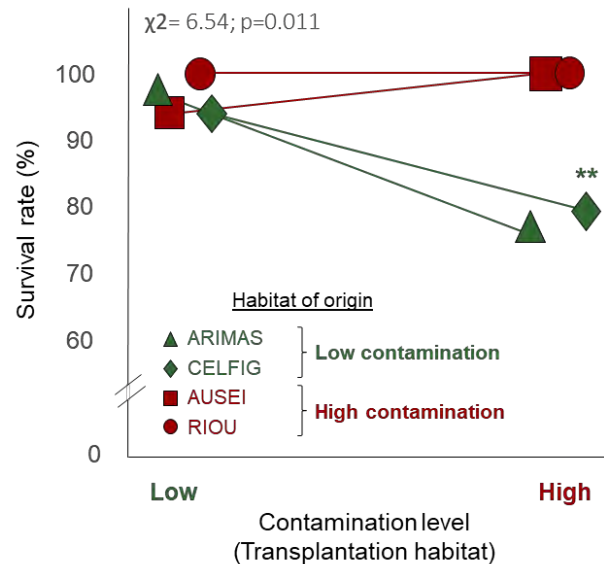


Figure 51. Taux de survie des poissons provenant de sites contaminés (AUSEI : carré rouge, RIOU : cercle rouge), ou de sites peu contaminés (ARIMAS : triangle vert) et CELFIG : losange vert). Les poissons sont transplantés dans des sites faiblement contaminés (Low, en vert) ou fortement contaminés (High, en rouge). Les poissons provenant des sites contaminés (rouges) présentent le même taux de survie quel que soit leur site de transplantation (94.3 à 100%). Au contraire les poissons issus de sites faiblement contaminés subissent une baisse de survie lorsqu'ils sont transplantés en milieu contaminé (76.3 à 79.4%). Les astérisques indiquent une différence significative de survie due à la transplantation entre habitat chez les poissons provenant de milieu peu contaminé (glm binomial, $\chi^2 = 6.54 ; p < 0.011$). L'injection d'antigène n'avait aucun effet ($\chi^2 = 0.165 ; p = 0.68$).

Ces différences de survie observées en fonction de l'origine des populations suggèrent donc la mise en place de phénomène d'**adaptation locale**, potentiellement en lien avec les ajustements comportementaux observés en réponse à la contamination (chapitre 6). Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec prudence tant que les autres traits mesurés n'ont pas été analysés. De plus, d'autres facteurs environnementaux pourraient expliquer les différences observées entre populations, et il apparaît difficile d'attribuer cette variabilité de réponse au seul effet de la contamination du milieu.

Il apparaît difficile de prédire la **trajectoire évolutive** des populations sous stress multiples (Saaristo et al., 2018). En effet, l'acquisition d'**une adaptation face à un facteur de stress particulier peut induire des coûts face à un facteur de stress additionnel** (Hua et al., 2017; Jansen et al., 2011), **selon les facteurs de stress considérés** (Dutilleul et al., 2017). Par exemple, une meilleure tolérance aux pesticides peut conférer une plus grande sensibilité aux pathogènes chez les amphibiens et les crustacés (Hua et al., 2017; Jansen et al., 2011). De même, des flétans (*Platichthys flesus*) vivant dans des rivières contaminées sont moins tolérants au stress thermique en lien avec l'altération de leur performances métaboliques (Lavergne et al., 2015). **Il est donc probable qu'une adaptation à la contamination engendre des coûts** en termes de réponse aux stress multiples. Dans cette thèse cependant, les populations issues de milieux plus ou moins contaminés avaient la même réponse à l'injection d'antigènes. La prise en compte des mécanismes évolutifs dans le cadre de l'évaluation de l'effet des contaminants (i.e. écotoxicologie), et plus généralement des stress, sur les organismes apparaît donc comme indispensable en vue de mieux prédire leur impacts sur les populations sauvages (Bickham, 2011; Coutellec and Barata, 2011).

En résumé, ce travail souligne la forte variabilité de réponses aux stress entre populations. La plasticité à court terme semble jouer un rôle essentiel dans la réponse au stress. Les résultats de l'expérimentation menée en conditions semi-naturelles (i.e. encagement en rivière) suggèrent un phénomène d'adaptation locale à la contamination. Cependant, des expériences sur la génération F2 seraient nécessaires pour tester les mécanismes évolutifs sous-jacents. Ce projet souligne donc l'intérêt d'utiliser une combinaison d'approches *insitu* et expérimentales dans le cadre d'une démarche d'écotoxicologie évolutive afin de permettre de mieux comprendre les impacts des stress sur les trajectoires évolutives et la persistance des populations sauvages soumises aux changements globaux.

6. Implications dans un contexte de changements globaux

Les changements globaux exposent les écosystèmes aquatiques à de nombreux facteurs de stress de manière concomitante (Côté et al., 2016; Sabater et al., 2019; Schinegger et al., 2016). Nos résultats suggèrent que les réponses physiologiques et comportementales des organismes aquatiques vont être affectées de manière complexe par les **stress multiple**. Ces résultats pourraient permettre d'aider à mieux prédire leurs effets sur la persistance des populations sauvages. Par exemple, les résultats suggèrent que **les réponses plastiques des poissons, et les mécanismes d'acquisition et de réallocation d'énergie qui en découlent, sont efficaces pour faire face aux stress simples** (i.e. stratégie de compensation). Cependant, l'exposition aux **stress multiples pourrait inhiber la plasticité des réponses physiologiques et comportementales (i.e. stratégie de conservation), ayant pour conséquence un impact négatif sur la fitness des individus**. Ces résultats suggèrent la mise en place d'une **plasticité maladaptative** dans le cadre de la réponse aux stress multiples.

Comme discuté précédemment, la **plasticité maladaptative** peut avoir des conséquences délétères sur la **dynamique des populations**, en induisant un décalage entre le phénotype exprimé par les individus et le phénotype optimal (i.e. qui maximise la fitness) dans un environnement donné, et causer le **déclin des populations** (Hendry, 2016). Cependant les phénomènes d'**adaptation** peuvent participer à réduire ce décalage et favoriser la **résilience des populations face aux stress multiples** (i.e. co-tolérance). Mais à ce jour, peu d'études se sont penchées sur l'implication des trajectoires évolutives dans la réponse aux stress multiples (Brady et al., 2017; Hua et al., 2017; Jansen et al., 2011). Les résultats de cette thèse suggèrent en particulier que l'exposition conjointe à des concentrations réalistes de contaminants et des parasites impacte fortement les poissons (i.e. stratégie de conservation : blocage métabolique probable, inhibition des ajustement comportementaux). Ces résultats et la littérature suggèrent que **les capacités d'adaptation des organismes peuvent ainsi être dépassées dans un contexte d'expositions multiples**. Ainsi, sous l'effet des **changements globaux** (e.g. réchauffement des masses d'eau, contamination, pathogènes émergents, espèces invasives), et donc de l'accroissement des pressions

exercées sur les écosystèmes aquatiques, les **phénomènes de maladaptation pourraient être plus fréquents qu'il n'y paraît** chez les populations autochtones. Dans ce contexte, la résilience des populations aux facteurs de stress pourrait être fortement affectée et mener à une réduction importante des densités de populations. Ceci pourrait par ailleurs potentiellement favoriser l'installation d'autres espèces plus plastiques et compétitives (i.e. espèces invasives). Cependant plus d'études sont nécessaires afin d'extrapoler ces résultats à l'échelle de la communauté voire de l'écosystème.

Ce projet de recherche doctorale souligne donc l'importance d'étudier l'effets des stress multiples via des études multi-échelles intégrant à la fois les traits liés à la mobilisation (i.e. métabolisme, réserves énergétiques) et l'acquisition d'énergie (i.e. exploration, recherche de nourriture), ainsi que l'historique d'exposition des populations (i.e. trajectoires évolutives) afin de mieux comprendre et prédire l'effet des stress multiples sur les individus et les populations (Fig. 52).

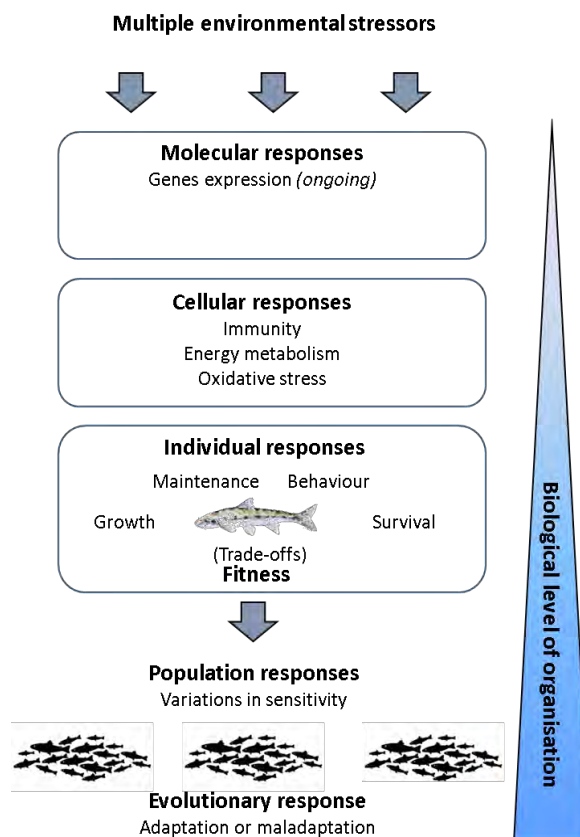


Figure 52. Schéma conceptuel de la réponse au stress de l'échelle moléculaire aux populations en lien avec les résultats acquis au cours de ce projet de recherche doctorale

7. Conclusion générale

En conclusion, ce projet de recherche doctorale souligne l'intérêt d'utiliser **des approches complémentaires** à la fois sur le terrain et en laboratoire afin d'étudier les effets des facteurs de stress sur les organismes aquatiques, et ce dans des conditions **les plus proches possibles de la réalité de terrain**. L'intégration des réponses au travers de plusieurs **échelles d'organisation**, des molécules aux populations, a permis de mettre en lumière le lien étroit entre **stratégies métaboliques et ajustements comportementaux** face aux stress multiples. De plus, les réponses des poissons varient en fonction de l'**historique d'exposition des populations**. Cette variabilité de réponse peut être **adaptive ou maladaptative** en fonction des **trajectoires évolutives** des populations, en particulier dans un contexte d'expositions multiples. Ces approches mêlant **écologie évolutive et écotoxicologie** méritent plus d'attention dans un contexte de **changements globaux**, afin de mieux anticiper les effets des **stress multiples** sur les populations sauvages à court, moyen et long termes. Améliorer nos connaissances sur la variabilité des effets des stress multiples à travers les échelles biologiques pourrait ainsi permettre de mener des politiques de gestion et de **conservation des populations sauvages** plus efficaces et en adéquation avec la **réalité du terrain**.

Références

Altizer, S., Ostfeld, R. S., Johnson, P. T. J., Kutz, S. and Harvell, C. D. (2013). Climate Change and Infectious Diseases: From Evidence to a Predictive Framework. *Science* 341, 514–519.

Araújo, M. C., Assis, C. R. D., Silva, K. C. C., Souza, K. S., Azevedo, R. S., Alves, M. H. M. E., Silva, L. C., Silva, V. L., Adam, M. L., Carvalho Junior, L. B., et al. (2018). Characterization of brain acetylcholinesterase of bentonic fish *Hoplosternum littorale*: Perspectives of application in pesticides and metal ions biomonitoring. *Aquat. Toxicol.* 205, 213–226.

Arkoosh, M. R., Clemons, E., Huffman, P., Kagley, A. N., Casillas, E., Adams, N., Sanborn, H. R., Collier, T. K. and Stein, J. E. (2001). Increased Susceptibility of Juvenile Chinook Salmon to Vibriosis after Exposure to Chlorinated and Aromatic Compounds Found in Contaminated Urban Estuaries. *J. Aquat. Anim. Health* 13, 257–268.

Ashley, N. T. and Demas, G. E. (2017). Neuroendocrine-immune circuits, phenotypes, and interactions. *Horm. Behav.* 87, 25–34.

Atalabi, T. E., Awharitoma, A. O. and Akinluyi, F. O. (2018). Prevalence, intensity, and exposed variables of infection with *Acanthocephala* parasites of the gastrointestinal tract of *Coptodon zillii* (Gervais, 1848) [Perciformes: Cichlidae] in Zobe Dam, Dutsin-Ma Local Government Area, Katsina State, Nigeria. *J. Basic Appl. Zool.* 79,.

Atchison, G. J., Henry, M. G. and Sandheinrich, M. B. (1987). Effects of metals on fish behavior: a review. *Environ. Biol. Fishes* 18, 11–25.

Bagni, M., Civitareale, C., Priori, A., Ballerini, A., Finoia, M., Brambilla, G. and Marino, G. (2007). Pre-slaughter crowding stress and killing procedures affecting quality and welfare in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture* 263, 52–60.

Bakke, T. A., Cable, J. and Harris, P. D. (2007). The Biology of Gyrodactylid Monogeneans: The “Russian-Doll Killers.” In *Advances in Parasitology*, pp. 161–460. Elsevier.

Bano, Y. and Hasan, M. (1989). Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis*. *J. Environ. Sci. Health Part B* 24, 145–166.

Barber, I. and Dingemanse, N. J. (2010). Parasitism and the evolutionary ecology of animal personality. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 4077–4088.

Barber, I., Hoare, D. and Krause, J. (2000). Effects of parasites on fish behaviour: a review and evolutionary perspective. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 131–165.

Behringer, D. C., Karvonen, A. and Bojko, J. (2018). Parasite avoidance behaviours in aquatic environments. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 373, 20170202.

Bélangier-Deschênes, S., Couture, P., Campbell, P. G. C. and Bernatchez, L. (2013). Evolutionary change driven by metal exposure as revealed by coding SNP genome scan in wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Ecotoxicology* 22, 938–957.

- Bell, A. M. and Sih, A. (2007). Exposure to predation generates personality in threespined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Ecol. Lett.* 10, 828–834.
- Bell, A. M., Henderson, L. and Huntingford, F. A. (2010). Behavioral and respiratory responses to stressors in multiple populations of three-spined sticklebacks that differ in predation pressure. *J. Comp. Physiol. B* 180, 211–220.
- Benke, A. C. (1998). Production Dynamics of Riverine Chironomids: Extremely High Biomass Turnover Rates of Primary Consumers. *Ecology* 79, 899.
- Bermejo-Nogales, A., Nederlof, M., Benedito-Palos, L., Ballester-Lozano, G. F., Folkedal, O., Olsen, R. E., Sitjà-Bobadilla, A. and Pérez-Sánchez, J. (2014). Metabolic and transcriptional responses of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to environmental stress: New insights in fish mitochondrial phenotyping. *Gen. Comp. Endocrinol.* 205, 305–315.
- Best, A., White, A. and Boots, M. (2014). The Coevolutionary Implications of Host Tolerance. *Evolution* 68, 1426–1435.
- Bickham, J. W. (2011). The four cornerstones of Evolutionary Toxicology. *Ecotoxicology* 20, 497–502.
- Bolnick, D. I., Amarasekare, P., Araújo, M. S., Bürger, R., Levine, J. M., Novak, M., Rudolf, V. H. W., Schreiber, S. J., Urban, M. C. and Vasseur, D. A. (2011). Why intraspecific trait variation matters in community ecology. *Trends Ecol. Evol.* 26, 183–192.
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B. and Sorci, G. (2003). Assessing the Cost of Mounting an Immune Response. *Am. Nat.* 161, 367–379.
- Bonneaud, C., Wilson, R. S. and Seebacher, F. (2016). Immune-challenged fish up-regulate their metabolic scope to support locomotion. *PloS One* 11, e0166028.
- Brady, S. P., Monosson, E., Matson, C. W. and Bickham, J. W. (2017). Evolutionary toxicology: Toward a unified understanding of life's response to toxic chemicals. *Evol. Appl.* 10, 745–751.
- Brady, S. P., Bolnick, D. I., Angert, A. L., Gonzalez, A., Barrett, R. D. H., Crispo, E., Derry, A. M., Eckert, C. G., Fraser, D. J., Fussmann, G. F., et al. (2019). Causes of maladaptation. *Evol. Appl.* 12, 1229–1242.
- Brunner, F. S., Anaya-Rojas, J. M., Matthews, B. and Eizaguirre, C. (2017). Experimental evidence that parasites drive eco-evolutionary feedbacks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 114, 3678–3683.
- Buchholz, R. (2007). Behavioural biology: an effective and relevant conservation tool. *Trends Ecol. Evol.* 22, 401–407.
- Burel, C., Person-Le Ruyet, J., Gaumet, F., Le Roux, A., Severe, A. and Boeuf, G. (1996). Effects of temperature on growth and metabolism in juvenile turbot. *J. Fish Biol.* 49, 678–692.
- Cabrera-Martínez, L. V., Herrera M., L. G. and Cruz-Neto, A. P. (2018). The energetic cost of mounting an immune response for Pallas's long-tongued bat (*Glossophaga soricina*). *PeerJ* 6, e4627.

- Caro, T. (2007). Behavior and conservation: a bridge too far? *Trends Ecol. Evol.* 22, 394–400.
- Claireaux, G. and Lagardère, J.-P. (1999). Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *J. Sea Res.* 42, 157–168.
- Clements, W. H. and Rees, D. E. (1997). Effects of Heavy Metals on Prey Abundance, Feeding Habits, and Metal Uptake of Brown Trout in the Arkansas River, Colorado. *Trans. Am. Fish. Soc.* 126, 774–785.
- Colchen, T., Teletchea, F., Fontaine, P. and Pasquet, A. (2016). Temperature modifies activity, inter-individual relationships and group structure in fish. *Curr. Zool.* zow048.
- Costantini, D. and Møller, A. P. (2009). Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 153, 339–344.
- Côté, I. M., Darling, E. S. and Brown, C. J. (2016). Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20152592.
- Coutellec, M.-A. and Barata, C. (2011). An introduction to evolutionary processes in ecotoxicology. *Ecotoxicol. Lond. Engl.* 20, 493–496.
- Crain, C. M., Kroeker, K. and Halpern, B. S. (2008). Interactive and cumulative effects of multiple human stressors in marine systems. *Ecol. Lett.* 11, 1304–1315.
- Croft, D. P., Edenbrow, M., Darden, S. K., Ramnarine, I. W., van Oosterhout, C. and Cable, J. (2011). Effect of gyrodactylid ectoparasites on host behaviour and social network structure in guppies *Poecilia reticulata*. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 65, 2219–2227.
- Crozier, L. G. and Hutchings, J. A. (2014). Plastic and evolutionary responses to climate change in fish. *Evol. Appl.* 7, 68–87.
- Dahlgren, C. and Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J. Immunol. Methods* 232, 3–14.
- Dingemanse, N. J., Wright, J., Kazem, A. J. N., Thomas, D. K., Hickling, R. and Dawnay, N. (2007). Behavioural syndromes differ predictably between 12 populations of three-spined stickleback. *J. Anim. Ecol.* 76, 1128–1138.
- Dittmar, J., Janssen, H., Kuske, A., Kurtz, J. and Scharsack, J. P. (2014). Heat and immunity: an experimental heat wave alters immune functions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *J. Anim. Ecol.* 83, 744–757.
- Dochtermann, N. A., Schwab, T., Anderson Berdal, M., Dalos, J. and Royauté, R. (2019). The Heritability of Behavior: A Meta-analysis. *J. Hered.* 110, 403–410.
- Don Xavier, N. D., Bijoy Nandan, S., Jayachandran, P. R., Anu, P. R., Midhun, A. M. and Mohan, D. (2019). Chronic effects of copper and zinc on the fish, *Etroplus suratensis* (Bloch, 1790) by continuous flow through (CFT) bioassay. *Mar. Environ. Res.* 143, 141–157.
- Drummond, R. A. and Russom, C. L. (1990). Behavioral toxicity syndromes: A promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 37–46.

- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z.-I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A.-H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., et al. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biol. Rev.* 81, 163.
- Dugatkin, L. A., FitzGerald, G. J. and Lavoie, J. (1994). Juvenile three-spined sticklebacks avoid parasitized conspecifics. *Environ. Biol. Fishes* 39, 215–218.
- Dutilleul, M., Réale, D., Goussen, B., Lecomte, C., Galas, S. and Bonzom, J. (2017). Adaptation costs to constant and alternating polluted environments. *Evol. Appl.* 10, 839–851.
- Ellgaard, E. G., Tusa, J. E. and Malizia, A. A. (1978). Locomotor activity of the bluegill *Lepomis macrochirus*: hyperactivity induced by sublethal concentrations of cadmium, chromium and zinc. *J. Fish Biol.* 12, 19–23.
- Ellis, A. (1977). The leucocytes of fish: a review. *J. Fish Biol.* 11, 453–491.
- Evans, M. R. and Moustakas, A. (2018). Plasticity in foraging behaviour as a possible response to climate change. *Ecol. Inform.* 47, 61–66.
- Fangue, N. A. (2006). Intraspecific variation in thermal tolerance and heat shock protein gene expression in common killifish, *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Biol.* 209, 2859–2872.
- Fast, M. D., Sims, D. E., Burka, J. F., Mustafa, A. and Ross, N. W. (2002). Skin morphology and humoral non-specific defence parameters of mucus and plasma in rainbow trout, coho and Atlantic salmon. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 132, 645–657.
- Flammarion, P., Migeon, B., Urios, S., Morfin, P. and Garric, J. (1998). Effect of methidathion on the cytochrome P-450 1A in the cyprinid fish gudgeon (*Gobio gobio*). *Aquat. Toxicol.* 42, 93–102.
- Folt, C. L., Chen, C. Y., Moore, M. V. and Burnaford, J. (1999). Synergism and antagonism among multiple stressors. *Limnol. Oceanogr.* 44, 864–877.
- Fry, F. E. J. (1947). *Effects of the environment on animal activity*. Toronto: Univ. of Toronto Press.
- Gandar, A., Jean, S., Canal, J., Marty-Gasset, N., Gilbert, F. and Laffaille, P. (2016). Multistress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 3184–3194.
- Gandar, A., Laffaille, P., Marty-Gasset, N., Viala, D., Molette, C. and Jean, S. (2017a). Proteome response of fish under multiple stress exposure: Effects of pesticide mixtures and temperature increase. *Aquat. Toxicol.* 184, 61–77.
- Gandar, A., Laffaille, P., Canlet, C., Tremblay-Franco, M., Gautier, R., Perrault, A., Gress, L., Mormède, P., Tapie, N., Budzinski, H., et al. (2017b). Adaptive response under multiple stress exposure in fish: From the molecular to individual level. *Chemosphere* 188, 60–72.
- Garg, S., Gupta, R. K. and Jain, K. L. (2009). Sublethal effects of heavy metals on biochemical composition and their recovery in Indian major carps. *J. Hazard. Mater.* 163, 1369–1384.
- Gillooly, J. F., Brown, J. H., West, G. B., Savage, V. M. and Charnov, E. L. (2001). Effects of Size and Temperature on Metabolic Rate. *Science* 293, 2248–2251.

- Gilman, S. E., Urban, M. C., Tewksbury, J., Gilchrist, G. W. and Holt, R. D. (2010). A framework for community interactions under climate change. *Trends Ecol. Evol.* 25, 325–331.
- Grasset, J., Ollivier, É., Bougas, B., Yannic, G., Campbell, P. G. C., Bernatchez, L. and Couture, P. (2016). Combined effects of temperature changes and metal contamination at different levels of biological organization in yellow perch. *Aquat. Toxicol.* 177, 324–332.
- Groc, L., Choquet, D. and Chaouloff, F. (2008). The stress hormone corticosterone conditions AMPAR surface trafficking and synaptic potentiation. *Nat. Neurosci.* 11, 868–870.
- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Arizcun, M., Meseguer, J. and Esteban, M. A. (2014). Comparative skin mucus and serum humoral defence mechanisms in the teleost gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Fish Shellfish Immunol.* 36, 545–551.
- Hamilton, P. B., Rolshausen, G., Uren Webster, T. M. and Tyler, C. R. (2017). Adaptive capabilities and fitness consequences associated with pollution exposure in fish. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 372, 20160042.
- Handy, R. D., Sims, D. W., Giles, A., Campbell, H. A. and Musonda, M. M. (1999). Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat. Toxicol.* 47, 23–41.
- Havixbeck, J. and Barreda, D. (2015). Neutrophil Development, Migration, and Function in Teleost Fish. *Biology* 4, 715–734.
- Hendry, A. P. (2016). *Eco-evolutionary Dynamics*. Princeton University Press.
- Hendry, A. P., Farrugia, T. J. and Kinnison, M. T. (2008). Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Mol. Ecol.* 17, 20–29.
- Holmstrup, M., Bindsbøl, A.-M., Oostingh, G. J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.-R., Loureiro, S., Soares, A. M. V. M., Ferreira, A. L. G., Kienle, C., et al. (2010). Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762.
- Hoogenboom, M. O., Metcalfe, N. B., Groothuis, T. G. G., de Vries, B. and Costantini, D. (2012). Relationship between oxidative stress and circulating testosterone and cortisol in pre-spawning female brown trout. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 163, 379–387.
- Hua, J., Wuerthner, V. P., Jones, D. K., Mattes, B., Cothran, R. D., Relyea, R. A. and Hoverman, J. T. (2017). Evolved pesticide tolerance influences susceptibility to parasites in amphibians. *Evol. Appl.* 10, 802–812.
- Ingram, G. A. (1980). Substances involved in the natural resistance of fish to infection—A review. *J. Fish Biol.* 16, 23–60.
- IPCC (2014). *Climate change 2014: synthesis report*. (ed. Pachauri, R. K.), Mayer, L.), and Intergovernmental Panel on Climate Change) Geneva, Switzerland: Intergovernmental Panel on Climate Change.

- Isaksson, C. (2013). Opposing effects on glutathione and reactive oxygen metabolites of sex, habitat, and spring date, but no effect of increased breeding density in great tits (*Parus major*). *Ecol. Evol.* 3, 2730–2738.
- Isaksson, C. (2015). Urbanization, oxidative stress and inflammation: a question of evolving, acclimatizing or coping with urban environmental stress. *Funct. Ecol.* 29, 913–923.
- Jacquin, L., Dybwad, C., Rolshausen, G., Hendry, A. P. and Reader, S. M. (2017). Evolutionary and immediate effects of crude-oil pollution: depression of exploratory behaviour across populations of Trinidadian guppies. *Anim. Cogn.* 20, 97–108.
- Jacquin, L., Gandar, A., Aguirre-Smith, M., Perrault, A., Hénaff, M. L., Jong, L. D., Paris-Palacios, S., Laffaille, P. and Jean, S. (2019). High temperature aggravates the effects of pesticides in goldfish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 255–264.
- Jaeschke, H., Gores, G. J., Cederbaum, A. I., Hinson, J. A., Pessayre, D. and Lemasters, J. J. (2002). Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol. Sci.* 65, 166–176.
- Jansen, M., Stoks, R., Coors, A., van Doorslaer, W. and de Meester, L. (2011). Collateral damage: rapid exposure-induced evolution of pesticide resistance leads to increased susceptibility to parasites: evolutionary costs of resistance. *Evolution* 65, 2681–2691.
- Johansen, K. A., Sealey, W. M. and Overturf, K. (2006). The effects of chronic immune stimulation on muscle growth in rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 144, 520–531.
- Johnson, P. T. J. and Paull, S. H. (2011). The ecology and emergence of diseases in fresh waters: Freshwater diseases. *Freshw. Biol.* 56, 638–657.
- Johnsson, J.I., Brockmark, S., Näslund, J., 2014. Environmental effects on behavioural development consequences for fitness of captive-reared fishes in the wild: behaviour and fitness of captive-reared fishes. *J. Fish. Biol.* 85, 1946e1971.
- Johnston, I. A. and Dunn, J. (1987). Temperature acclimation and metabolism in ectotherms with particular reference to teleost fish. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 41, 67–93.
- Jolly, S., Jaffal, A., Delahaut, L., Palluel, O., Porcher, J.-M., Geffard, A., Sanchez, W. and Betoulle, S. (2014). Effects of aluminium and bacterial lipopolysaccharide on oxidative stress and immune parameters in roach, *Rutilus rutilus* L. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 13103–13117.
- Kaitetzidou, E., Crespo, D., Vraskou, Y., Antonopoulou, E. and Planas, J. V. (2012). Transcriptomic Response of Skeletal Muscle to Lipopolysaccharide in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata*). *Mar. Biotechnol.* 14, 605–619.
- Kawecki, T. J. and Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7, 1225–1241.
- Khan, R. A. (1990). Parasitism in marine fish after chronic exposure to petroleum hydrocarbons in the laboratory and to the Exxon Valdez oil spill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 759–763.

- Killen, S. S., Marras, S., Metcalfe, N. B., McKenzie, D. J. and Domenici, P. (2013). Environmental stressors alter relationships between physiology and behaviour. *Trends Ecol. Evol.* 28, 651–658.
- Kirsten, K., Soares, S. M., Koakoski, G., Carlos Kreutz, L. and Barcellos, L. J. G. (2018a). Characterization of sickness behavior in zebrafish. *Brain. Behav. Immun.* 73, 596–602.
- Kirsten, K., Fior, D., Kreutz, L. C. and Barcellos, L. J. G. (2018b). First description of behavior and immune system relationship in fish. *Sci. Rep.* 8,.
- Klemme, I. and Karvonen, A. (2016). Learned parasite avoidance is driven by host personality and resistance to infection in a fish–trematode interaction. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 283, 20161148.
- Koolhaas, J. M., Korte, S. M., De Boer, S. F., Van Der Veegt, B. J., Van Reenen, C. G., Hopster, H., De Jong, I. C., Ruis, M. A. W. and Blokhuis, H. J. (1999). Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 23, 925–935.
- Kortet, R., Hedrick, A. V. and Vainikka, A. (2010). Parasitism, predation and the evolution of animal personalities: Personalities and parasitism. *Ecol. Lett.* 13, 1449–1458.
- Krkošek, M., Ford, J. S., Morton, A., Lele, S., Myers, R. A. and Lewis, M. A. (2007). Declining Wild Salmon Populations in Relation to Parasites from Farm Salmon. *Science* 318, 1772–1775.
- Larsen, A. K., Nymo, I. H., Sørensen, K. K., Seppola, M., Rødven, R., Jiménez de Bagüés, M. P., Al Dahouk, S. and Godfroid, J. (2018). Concomitant Temperature Stress and Immune Activation may Increase Mortality Despite Efficient Clearance of an Intracellular Bacterial Infection in Atlantic Cod. *Front. Microbiol.* 9,.
- Lavergne, E., Pedron, N., Calves, I., Claireaux, G., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Le Bayon, N., Cahu, C. and Laroche, J. (2015). Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar. Pollut. Bull.* 95, 658–664.
- Le Guernic, A., Sanchez, W., Palluel, O., Bado-Nilles, A., Floriani, M., Turies, C., Chadili, E., Vedova, C. D., Cavalié, I., Adam-Guillermin, C., et al. (2016). Acclimation capacity of the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*, L.) to a sudden biological stress following a polymetallic exposure. *Ecotoxicology* 25, 1478–1499.
- Lürling, M. and Scheffer, M. (2007). Info-disruption: pollution and the transfer of chemical information between organisms. *Trends Ecol. Evol.* 22, 374–379.
- Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30.
- MacDougall-Shackleton, S. A., Bonier, F., Romero, L. M. and Moore, I. T. (2019). Glucocorticoids and “Stress” Are Not Synonymous. *Integr. Org. Biol.* 1,.
- Marcogliese, D. J., Brambilla, L. G., Gagné, F. and Gendron, A. D. (2005). Joint effects of parasitism and pollution on oxidative stress biomarkers in yellow perch *Perca flavescens*. *Dis. Aquat. Organ.* 63, 77–84.
- Melvin, S. D., Lanctôt, C. M., Doriean, N. J. C., Bennett, W. W. and Carroll, A. R. (2019). NMR-based lipidomics of fish from a metal(loid) contaminated wetland show differences

consistent with effects on cellular membranes and energy storage. *Sci. Total Environ.* 654, 284–291.

Merilä, J. and Hendry, A. P. (2014). Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. *Evol. Appl.* 7, 1–14.

Montiglio, P.-O. and Royauté, R. (2014). Contaminants as a neglected source of behavioural variation. *Anim. Behav.* 88, 29–35.

Moran, N. P., Mossop, K. D., Thompson, R. M. and Wong, B. B. M. (2016). Boldness in extreme environments: temperament divergence in a desert-dwelling fish. *Anim. Behav.* 122, 125–133.

Noyes, P. D., McElwee, M. K., Miller, H. D., Clark, B. W., Van Tiem, L. A., Walcott, K. C., Erwin, K. N. and Levin, E. D. (2009). The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971–986.

O’Gorman, E. J., Pichler, D. E., Adams, G., Benstead, J. P., Cohen, H., Craig, N., Cross, W. F., Demars, B. O. L., Friberg, N., Gíslason, G. M., et al. (2012). Chapter 2 - Impacts of Warming on the Structure and Functioning of Aquatic Communities: Individual- to Ecosystem-Level Responses. In *Advances in Ecological Research* (ed. Woodward, G.), Jacob, U.), and O’Gorman, E. J.), pp. 81–176. Academic Press.

O’Gorman, E. J., Ólafsson, Ó. P., Demars, B. O. L., Friberg, N., Guðbergsson, G., Hannesdóttir, E. R., Jackson, M. C., Johansson, L. S., McLaughlin, Ó. B., Ólafsson, J. S., et al. (2016). Temperature effects on fish production across a natural thermal gradient. *Glob. Change Biol.* 22, 3206–3220.

Okamura, B., Hartikainen, H., Schmidt-Posthaus, H. and Wahli, T. (2011). Life cycle complexity, environmental change and the emerging status of salmonid proliferative kidney disease: PKD as an emerging disease of salmonid fish. *Freshw. Biol.* 56, 735–753.

Otálora-Ardila, A., Flores-Martínez, J. J. and Welch Jr, K. C. (2016). Metabolic cost of the activation of immune response in the fish-eating myotis (*Myotis vivesi*): the effects of inflammation and the acute phase response. *PloS One* 11, e0164938.

Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P. and Jacquin, L. (2019). Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. *Sci. Total Environ.* 684, 371–380.

Pi, J., Li, X., Zhang, T. and Li, D. (2016). Effects of Acute Exposure to Sublethal Waterborne Cadmium on Energy Homeostasis in Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 97, 497–503.

Pörtner, H.-O. (2010). Oxygen- and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *J. Exp. Biol.* 213, 881–893.

Pörtner, H. O. and Farrell, A. P. (2008). Physiology and Climate Change. *Science* 322, 690–692.

Preynat-Seauve, O., Coudurier, S., Favier, A., Marche, P.-N. and Villiers, C. (2003). Oxidative stress impairs intracellular events involved in antigen processing and presentation to T cells. *Cell Stress Chaperones* 8, 162.

- Qu, R., Feng, M., Wang, X., Qin, L., Wang, C., Wang, Z. and Wang, L. (2014). Metal accumulation and oxidative stress biomarkers in liver of freshwater fish *Carassius auratus* following in vivo exposure to waterborne zinc under different pH values. *Aquat. Toxicol.* 150, 9–16.
- Råberg, L. (2014). How to Live with the Enemy: Understanding Tolerance to Parasites. *PLOS Biol.* 12, e1001989.
- Raffard, A., Cucherousset, J., Prunier, J. G., Loot, G., Santoul, F. and Blanchet, S. (2019). Variability of functional traits and their syndromes in a freshwater fish species (*Phoxinus phoxinus*): The role of adaptive and nonadaptive processes. *Ecol. Evol.* 9, 2833–2846.
- Ramade, F. (2007). *Introduction à l'écotoxicologie*. Lavoisier. Paris, France: Lavoisier.
- Ransberry, V. E., Morash, A. J., Blewett, T. A., Wood, C. M. and McClelland, G. B. (2015). Oxidative stress and metabolic responses to copper in freshwater- and seawater-acclimated killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 161, 242–252.
- Réale, D., Reader, S. M., Sol, D., McDougall, P. T. and Dingemanse, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biol. Rev.* 82, 291–318.
- Réale, D., Garant, D., Humphries, M. M., Bergeron, P., Careau, V. and Montiglio, P.-O. (2010). Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 4051–4063.
- Reid, N. M., Proestou, D. A., Clark, B. W., Warren, W. C., Colbourne, J. K., Shaw, J. R., Karchner, S. I., Hahn, M. E., Nacci, D., Oleksiak, M. F., et al. (2016). The genomic landscape of rapid repeated evolutionary adaptation to toxic pollution in wild fish. *Science* 354, 1305–1308.
- Reid, A. J., Carlson, A. K., Creed, I. F., Eliason, E. J., Gell, P. A., Johnson, P. T. J., Kidd, K. A., MacCormack, T. J., Olden, J. D., Ormerod, S. J., et al. (2019). Emerging threats and persistent conservation challenges for freshwater biodiversity. *Biol. Rev.* 94, 849–873.
- Reyes-Becerril, M., López-Medina, T., Ascencio-Valle, F. and Esteban, M. Á. (2011). Immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata*) following experimental infection with *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.*
- Reynolds, S. K. and Benke, A. C. (2005). Temperature-dependent growth rates of larval midges (Diptera: Chironomidae) from a southeastern U.S. stream. *Hydrobiologia* 544, 69–75.
- Reznick, D., Butler IV, M. J. and Rodd, H. (2001). Life-history evolution in guppies. VII. The comparative ecology of high- and low-predation environments. *Am. Nat.* 157, 126–140.
- Richards, E. L., Oosterhout, C. van and Cable, J. (2010). Sex-Specific Differences in Shoaling Affect Parasite Transmission in Guppies. *PLOS ONE* 5, e13285.
- Richetti, S. K., Rosemberg, D. B., Ventura-Lima, J., Monserrat, J. M., Bogó, M. R. and Bonan, C. D. (2011). Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. *NeuroToxicology* 32, 116–122.

- Rodriguez, I., Novoa, B. and Figueras, A. (2008). Immune response of zebrafish (*Danio rerio*) against a newly isolated bacterial pathogen *Aeromonas hydrophila*. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 239–249.
- Rolshausen, G., Phillip, D. A. T., Beckles, D. M., Akbari, A., Ghoshal, S., Hamilton, P. B., Tyler, C. R., Scarlett, A. G., Ramnarine, I., Bentzen, P., et al. (2015). Do stressful conditions make adaptation difficult? Guppies in the oil-polluted environments of southern Trinidad. *Evol. Appl.* 8, 854–870.
- Royauté, R. and Pruitt, J. N. (2015). Varying predator personalities generates contrasting prey communities in an agroecosystem. *Ecology* 96, 2902–2911.
- Royauté, R., Buddle, C. M. and Vincent, C. (2014). Interspecific Variations in Behavioral Syndromes of a Jumping Spider from Insecticide-Treated and Insecticide-Free Orchards. *Ethology* 120, 127–139.
- Royauté, R., Garrison, C., Dalos, J., Berdal, M. A. and Doehtermann, N. A. (2019). Current energy state interacts with the developmental environment to influence behavioural plasticity. *Anim. Behav.* 148, 39–51.
- Saaristo, M., Brodin, T., Balshine, S., Bertram, M. G., Brooks, B. W., Ehlman, S. M., McCallum, E. S., Sih, A., Sundin, J., Wong, B. B. M., et al. (2018). Direct and indirect effects of chemical contaminants on the behaviour, ecology and evolution of wildlife. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 285, 20181297.
- Sabater, S., Elosegi, A. and Ludwig, R. (2019). Defining Multiple Stressor Implications. In *Multiple Stressors in River Ecosystems*, pp. 1–22. Elsevier.
- Salin, K., Auer, S. K., Anderson, G. J., Selman, C. and Metcalfe, N. B. (2016). Inadequate food intake at high temperatures is related to depressed mitochondrial respiratory capacity. *J. Exp. Biol.* 219, 1356–1362.
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M. and Munck, A. U. (2000). How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr. Rev.* 21, 55–89.
- Sasaki, Y., Maita, M. and Okamoto, N. (2002). Rainbow trout neutrophils are responsible for non-specific cytotoxicity. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 243–252.
- Scharsack, J. P., Franke, F., Erin, N. I., Kuske, A., Büscher, J., Stolz, H., Samonte, I. E., Kurtz, J. and Kalbe, M. (2016). Effects of environmental variation on host–parasite interaction in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*). *Zoology* 119, 375–383.
- Schinegger, R., Palt, M., Segurado, P. and Schmutz, S. (2016). Untangling the effects of multiple human stressors and their impacts on fish assemblages in European running waters. *Sci. Total Environ.* 573, 1079–1088.
- Schneeberger, K., Czirják, G. Á. and Voigt, C. C. (2013). Inflammatory challenge increases measures of oxidative stress in a free-ranging, long-lived mammal. *J. Exp. Biol.* 216, 4514–4519.

Schulte, P. M. (2014). What is environmental stress? Insights from fish living in a variable environment. *J. Exp. Biol.* 217, 23–34.

Scott, G. R. and Sloman, K. A. (2004). The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquat. Toxicol.* 68, 369–392.

Scott, M., Heupel, M., Tobin, A. and Pratchett, M. (2017). A large predatory reef fish species moderates feeding and activity patterns in response to seasonal and latitudinal temperature variation. *Sci. Rep.* 7,.

Seppala, O. and Jokela, J. (2011). Immune defence under extreme ambient temperature. *Biol. Lett.* 7, 119–122.

Sheath, D. J., Andreou, D. and Britton, J. R. (2016). Interactions of warming and exposure affect susceptibility to parasite infection in a temperate fish species. *Parasitology* 143, 1340–1346.

Simide, R., Angelier, F., Gaillard, S. and Stier, A. (2016). Age and Heat Stress as Determinants of Telomere Length in a Long-Lived Fish, the Siberian Sturgeon. *Physiol. Biochem. Zool.* 89, 441–447.

Smolders, R., De Boeck, G. and Blust, R. (2003). Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 890–899.

Sokolova, I. M. (2013). Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integr. Comp. Biol.* 53, 597–608.

Sonnack, L., Kampe, S., Muth-Köhne, E., Erdinger, L., Henny, N., Hollert, H., Schäfers, C. and Fenske, M. (2015). Effects of metal exposure on motor neuron development, neuromasts and the escape response of zebrafish embryos. *Neurotoxicol. Teratol.* 50, 33–42.

Sopinka, N. M., Marentette, J. R. and Balshine, S. (2010). Impact of contaminant exposure on resource contests in an invasive fish. *Behav. Ecol. Sociobiol.* 64, 1947–1958.

Swindle, E. J. and Metcalfe, D. D. (2007). The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunol. Rev.* 217, 186–205.

Tadiri, C. P., Dargent, F. and Scott, M. E. (2013). Relative host body condition and food availability influence epidemic dynamics: a *Poecilia reticulata*-*Gyrodactylus turnbulli* host-parasite model. *Parasitology* 140, 343–351.

Teichert, N., Borja, A., Chust, G., Uriarte, A. and Lepage, M. (2016). Restoring fish ecological quality in estuaries: Implication of interactive and cumulative effects among anthropogenic stressors. *Sci. Total Environ.* 542, 383–393.

Tilton, F. A., Bammler, T. K. and Gallagher, E. P. (2011). Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures. *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* CBP 153, 9–16.

- Tissot, L. and Souchon, Y. (2010). Synthèse des tolérances thermiques des principales espèces de poissons des rivières et fleuves de plaine de l'ouest européen. *Hydroécologie Appliquée* 17, 17–76.
- Tuomainen, U. and Candolin, U. (2011). Behavioural responses to human-induced environmental change. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 86, 640–657.
- Van Oosterhout, C., Joyce, D. A., Cummings, S. M., Blais, J., Barson, N. J., Ramnarine, I. W., Mohammed, R. S., Persad, N. and Cable, J. (2006). Balancing selection, random genetic drift, and genetic variation at the major histocompatibility complex in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evol. Int. J. Org. Evol.* 60, 2562–2574.
- Volkoff, H. and Peter, R. E. (2004). Effects of lipopolysaccharide treatment on feeding of goldfish: role of appetite-regulating peptides. *Brain Res.* 998, 139–147.
- Ward, A. J. ., Duff, A. J., Horsfall, J. S. and Currie, S. (2008). Scents and scents-ability: pollution disrupts chemical social recognition and shoaling in fish. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 275, 101–105.
- Ward, A. J. W., Herbert-Read, J. E., Sumpter, D. J. T. and Krause, J. (2011). Fast and accurate decisions through collective vigilance in fish shoals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 2312–2315.
- Whitehead, A., Clark, B. W., Reid, N. M., Hahn, M. E. and Nacci, D. (2017). When evolution is the solution to pollution: Key principles, and lessons from rapid repeated adaptation of killifish (*Fundulus heteroclitus*) populations. *Evol. Appl.* 10, 762–783.
- Wingfield, J. C. (2003). Control of behavioural strategies for capricious environments. *Anim. Behav.* 66, 807–816.
- Wong, B. B. M. and Candolin, U. (2015). Behavioral responses to changing environments. *Behav. Ecol.* 26, 665–673.
- Woodward, G., Dybkjær, J. B., Ólafsson, J. S., Gíslason, G. M., Hannesdóttir, E. R. and Friberg, N. (2010). Sentinel systems on the razor's edge: effects of warming on Arctic geothermal stream ecosystems. *Glob. Change Biol.* 16, 1979–1991.
- Wu, S. M., Shih, M.-J. and Ho, Y.-C. (2007). Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 145, 218–226.
- Zheng, J.-L., Luo, Z., Liu, C.-X., Chen, Q.-L., Tan, X.-Y., Zhu, Q.-L. and Gong, Y. (2013). Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 132–133, 173–181.

ANNEXES

Annexe 1. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes

L'annexe 1 correspond à un article publié dans la revue Science of The Total Environment et est disponible à l'adresse suivante : <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.05.357>

Petitjean, Q., Jean, S., Gandar, A., Côte, J., Laffaille, P., Jacquin, L., 2019. Stress responses in fish: From molecular to evolutionary processes. Sci. Total Environ. 684, 371–380.

Annexe 2. Effects of pollution on personality and cognition in fish: some research perspectives

L'annexe 2 correspond à un article publié dans la revue Frontiers in Ecology and Evolution et est disponible à l'adresse suivante : <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00086>

Jacquin, L., Petitjean, Q., Côte, J., Laffaille, P., Jean, S., 2020. Effects of Pollution on Fish Behavior, Personality, and Cognition: Some Research Perspectives. Front. Ecol. Evol. 8.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems are increasingly exposed to multiple stressors. Among them, temperature increase and contamination by trace metal elements are major stressors for freshwater fish populations. In addition, parasites and their associated immune challenges can cause a wide range of responses in fish populations, but they are still rarely considered as biotic stressors. These three stressors trigger similar physiological pathways (i.e. immunity, oxidative stress and metabolism). Hence, they are likely to interact strongly but their combined effects (i.e. antagonism and synergism) are still poorly documented, thereby hindering our ability to predict the responses of wild populations to multiple stressors under global changes. In addition, responses to stressors could vary according to the level of organisation considered (i.e. molecules, cells, individuals, populations). In particular, different populations could have different sensitivity to stressors depending on their past exposure in the wild. Thus it is essential to incorporate these levels of variability to better understand and predict the effects of multiple stressors in wild fish populations.

This PhD project aimed at assessing the effects of a multiple abiotic (i.e. temperature, trace metal contamination) and biotic (i.e. immune challenge) stressors across biological levels of organisation, using the gudgeon fish (*Gobio occitaniae*) as a model species. First, I used a cross-sectional field study in 16 wild populations to compare fish health along stress gradients. Then, I used experimental approaches under controlled conditions to disentangle the role of each single and multiple stressors across levels of organisation in different fish populations. Finally, I used reciprocal translocation experiments between polluted vs. unpolluted rivers to test for local adaptation in response to multiple stressors.

Taken together, results show that single stressors affect mostly the molecular and cellular levels, in accordance with a compensatory strategy. Indeed, costly physiological defences (immunity, antioxidant responses) were set up and behavioural adjustments (i.e. changes in activity and foraging) enable fish to increase energy acquisition and respond adequately to single stressors, with limited deleterious effects on survival and growth. On the contrary, multiple stressors affected mostly the individual level, in accordance with a conservation metabolic strategy. Indeed, multiple stressors lead to complex antagonistic effects between stressors (i.e. antagonistic inhibition of behavioural responses), potentially due to the high energy demand incurred, resulting in deleterious effects on survival or growth. This suggests that physiological and behavioural responses might be exceeded under multiple stressors with deleterious consequences on fitness, thereby raising concerns about the effects of multiple global changes on wild populations. Interestingly, responses to stressors were highly variable among populations and fish populations originating from contaminated sites displayed a better ability to cope with contamination, suggesting local adaptation to chronic pollution.

This PhD work hence highlights the need to consider parasites and their associated immune challenges as significant stress factors in a multiple stress framework. In addition, behavioural adjustments seem to be particularly important to cope with stressors, although the resulting responses are highly variable between single vs. multiple stressors. Finally, the strong variability of responses among populations observed emphasizes the need to take into account evolutionary processes to better understand and predict the effects of multiple stressors in wild populations. Further investigations are needed to better understand the cascading effects of multiple stressors from molecules to populations and to better predict the evolutionary trajectories of fish populations in a changing world.

Keywords: Global changes, temperature increase, contamination, trace metal elements, pathogens, immune challenge, combined effects, behavior, ecophysiology, evolutionary-ecotoxicology

RÉSUMÉ

Dans le milieu naturel, les poissons sont exposés à une multitude de facteurs de stress biotiques et abiotiques, mais leurs interactions sont encore mal connues. La hausse des températures et la contamination par les éléments trace métalliques (ETMs) sont des sources importantes de stress pour les poissons. Les parasites ont également des effets sur la physiologie de leur hôte, mais sont rarement considérés en tant que facteurs de stress. Ces trois facteurs de stress agissent via des voies physiologiques communes (immunité, stress oxydant, métabolisme) et sont donc susceptibles d'interagir de manière complexe (e.g. antagonisme, synergisme). De plus, il existe souvent une grande variabilité des réponses entre échelles biologiques, des molécules aux populations. Notamment, l'historique d'exposition des populations de poisson dans leur milieu naturel pourrait conditionner leur capacité de réponse au stress. La prise en compte de ces deux niveaux de variabilité (i.e. interactions entre stress et entre échelles d'organisation) représente donc un verrou scientifique majeur pour mieux comprendre les effets des stress multiples sur les populations de poissons d'eau douce.

Cette thèse vise donc à évaluer les effets combinés de facteurs de stress abiotique (i.e. température, ETMs) et biotique (i.e. challenge immunitaire provoqué par le parasitisme) sur les réponses des poissons d'eau douce via une approche multi-échelles. Afin de remplir ces objectifs, le Goujon (*Gobio occitaniae*) a été utilisé comme espèce modèle dans le cadre de trois approches méthodologiques : (i) une approche transversale de terrain visant à comparer l'état de santé de population de poissons le long des gradients de stress ; puis, (ii) des expérimentations en conditions contrôlées afin de distinguer les effets des différents facteurs de stress simples dans différentes populations sauvages ; enfin (iii) une expérience de translocation réciproque (i.e. encagement sur le terrain) entre sites contaminés et peu contaminés afin de tester l'adaptation locale des populations.

Les résultats montrent que les stress simples ont des effets importants aux échelles biologiques fines et induisent la mise en place de stratégies métaboliques de compensation : les poissons investissent dans les défenses immunitaires et antioxydantes, avec une réduction des réserves énergétiques. De plus, les ajustements comportementaux (i.e. activité de nage, recherche de nourriture) sont particulièrement importants sous stress simples, et permettent d'ajuster l'acquisition d'énergie ce qui limite les effets sur la survie et la croissance. Au contraire, les stress multiples ont peu d'effets aux échelles moléculaires et cellulaires, mais provoquent des réponses complexes à l'échelle individuelle, ce qui se traduit par des effets antagonistes sur le comportement et des effets négatifs sur la survie et la croissance. Ces résultats suggèrent que sous stress multiples, les capacités de réponse des poissons pourraient être dépassées, menant ainsi à une stratégie de conservation, avec des effets délétères sur la fitness. Cependant, les réponses observées étaient fortement variables selon la population considérée. Plus particulièrement, les populations provenant de milieu contaminés étaient plus aptes à répondre à une contamination expérimentale en laboratoire (i.e. moins d'effets délétères) et en milieu naturel (i.e. meilleure survie lors des transplantations en milieu contaminé). Cela suggère des adaptations locales à la contamination, mais les processus évolutifs à l'origine de cette variabilité restent à tester.

Cette thèse montre le rôle central des réallocations d'énergie et du comportement dans la réponse au stress, et souligne l'importance de prendre en compte les parasites dans un contexte de stress multiples. De plus, il existe une forte variabilité de réponse entre populations qu'il est essentiel de prendre en compte pour mieux prédire les réponses des populations de poissons aux stress actuels et futurs dans un contexte de changements globaux.

Mots clefs : Changements globaux, température, contamination, éléments trace métalliques, pathogènes, challenge immunitaire, effets combinés, comportement, écophysiologie, écotoxicologie-évolutive