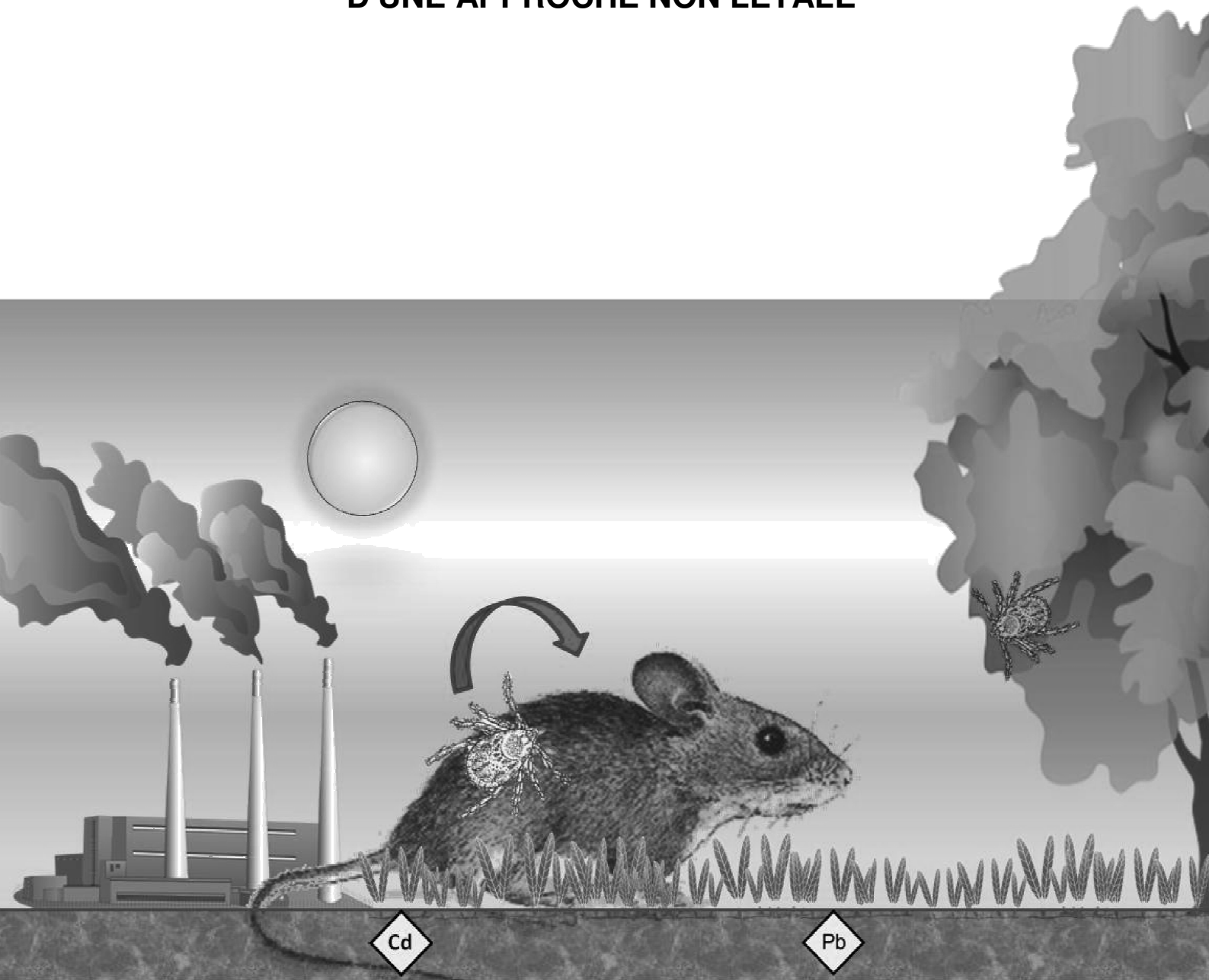


**EVALUATION DE L'EXPOSITION ET DES EFFETS  
DES ELEMENTS TRACES METALLIQUES ET DU PARASITISME  
SUR LA FAUNE SAUVAGE: CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT  
D'UNE APPROCHE NON LETALE**



**Thèse Nicolas TÊTE  
Besançon 2014**



**UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE**  
**UFR DES SCIENCES ET TECHNIQUES**  
**LABORATOIRE CHRONO-ENVIRONNEMENT (UMR CNRS/UFC 6249, Usc INRA)**

**THESE**

Présentée en vue de l'obtention du titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE**  
Spécialité - Sciences de la vie et de l'Environnement  
Ecole doctorale - Environnement Santé

**ÉVALUATION DE L'EXPOSITION ET DES EFFETS DES ELEMENTS  
TRACES METALLIQUES ET DU PARASITISME SUR LA FAUNE  
SAUVAGE: CONTRIBUTION AU DEVELOPPEMENT D'UNE APPROCHE  
NON LETALE.**

Présentée et soutenue publiquement par

**Nicolas TÊTE**

Le 19 mai 2014, devant le jury composé de :

Paco BUSTAMANTE (Pr, Université de la Rochelle)	Rapporteur
Peter DEPLAZES (Pr, Universität de Zurich, Suisse)	Rapporteur
Renaud SCHEIFLER (MCF, HDR, Université de Franche-Comté, Besançon)	Directeur
Eve AFONSO (MCF, Université de Franche-Comté, Besançon)	Co-directrice
Nico VAN DEN BRINK (Pr, Wageningen University, Pays-Bas)	Examinateur
Cécile GRAND (Dr, ADEME, Angers)	Examinatrice
Alejandro SANCHEZ-CHARDI (Dr, Universitat Autònoma de Barcelona, Espagne)	Membre invité



## RESUME

En intégrant cette étude dans un contexte d'écologie du stress, l'objectif général de cette thèse est d'une part d'évaluer l'exposition et les effets des éléments traces métalliques (ETMs) et du parasitisme chez le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*) et d'autre part de contribuer au développement de marqueurs d'exposition et d'effets toxiques non létaux. Au cours de trois sessions de capture, des individus ont été collectés sur 30 sites localisés autour de l'ancienne fonderie de Metaleurop Nord (Nord – Pas-de-Calais) répartis le long d'un gradient de contamination sur une zone de 40 km<sup>2</sup> polluée en cadmium (Cd) et en plomb (Pb). Les concentrations en Cd et Pb ont été mesurées dans les organes cibles (foie et reins) et dans les poils des mulots. Différents biomarqueurs d'effets toxiques létaux et non létaux ont également été mesurés. Le nombre important de mulots prélevés ( $n = 886$ ) a permis d'étudier l'influence des caractéristiques individuelles (âge et sexe) et des caractéristiques paysagères sur les réponses des biomarqueurs. Les résultats indiquent que les concentrations en ETMs des animaux vivant sur les sites les plus contaminés s'avèrent significativement plus importantes que celles mesurées sur les autres sites. En outre, plus de 25% des mulots provenant des sites les plus pollués présentent des concentrations supérieures aux seuils toxiques et ont donc un risque accru de développer des pathologies (œdèmes, cancers). Par ailleurs, cette étude révèle également que l'accumulation des ETMs chez le mulot est influencée par les caractéristiques individuelles (âge et sexe), par l'occupation des sols et qu'elle varie en fonction de la session de capture. De plus, les résultats montrent que les concentrations en ETMs (dans les organes et dans les sols) et les caractéristiques paysagères modulent les prévalences de certains parasites. En effet, la richesse parasitaire augmente chez les individus les plus exposés aux ETMs. Ces concentrations influencent également les différents biomarqueurs d'effets létaux (indices somatiques, altérations histologiques) et non létaux (condition corporelle, hématologie) évalués. Ces résultats illustrent donc l'intérêt du développement de biomarqueurs non létaux pour l'évaluation des effets toxiques des ETMs. Les animaux avec les concentrations en ETMs les plus élevées présentent des atteintes au niveau individuel (diminution de la condition corporelle et variation des indices somatiques), au niveau tissulaire (apparition de lésions hépatiques et rénales) et au niveau cellulaire (variation de certains paramètres hématologiques). Cependant, étant donné les effets potentiels du parasitisme sur la santé de la faune sauvage, les liens de causalité entre la présence d'ETMs et les atteintes observées sont discutables. Ce travail de thèse souligne l'intérêt des approches multi-stress dans le cadre de l'évaluation de la santé de la faune sauvage.

**Mots clés :** écotoxicologie, éléments traces métalliques, parasitisme, faune sauvage, mulot sylvestre, multi-stress, méthodes non létales, bioaccumulation, effets toxiques, biomarqueurs, zoonoses, caractéristiques paysagères, condition corporelle, indices somatiques, hématologie, histologie, caractéristiques individuelles.



## ABSTRACT

By integrating this study in a stress-ecology framework, the aim of this thesis is to assess exposure and effects of trace metals (TMs) and parasitism on wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) and to contribute to the development of non-lethal exposure and toxicity markers. During three trapping sessions, individuals were collected from 30 sites located around the former smelter Metaleurop Nord (Nord-Pas-de-Calais) along a gradient of contamination over a 40 km<sup>2</sup> area polluted by cadmium (Cd) and lead (Pb). Concentrations of Cd and Pb were measured in the target organs (liver and kidneys) and in the hair of mice. Different lethal and non-lethal biomarkers of toxic effects were also measured. The large number of sampled mice ( $n = 886$ ) allowed to study the influence of individual characteristics (age and sex) and landscape features on the biomarker responses. The results indicate that the concentrations of TMs in animals living on the most contaminated sites are significantly higher than those measured on other sites. In addition, more than 25% of the mice trapped on the most polluted sites present TMs concentrations above toxicity thresholds and therefore have an increased risk of developing pathologies (edema, cancer). This study also reveals that the accumulation of TMs in wood mice is influenced by individual characteristics (age and gender) and landscape features and varies according to the trapping session. In addition, results show that the concentrations of TMs (both in organs and in soils) and landscape characteristics modulate the prevalence of some parasites. Parasite richness increases in individuals most exposed to TMs. These concentrations also influence the different lethal (somatic indices, histological alterations) and non-lethal (body condition, hematology) biomarkers of effects assessed. These results illustrate the importance of non-lethal biomarkers development for the evaluation of TMs toxic effects. Animals with the highest TMs concentrations presented adverse effects at the individual level (decreased body condition and changes in somatic indices), at the tissular level (increased liver and kidney damages) and at the cellular level (variation of some hematological parameters). However, given the potential effects of parasitism on animals' health, the causal links between the presence of TMs and observed alterations are questionable. This work emphasizes the importance of multi-stress approaches in wildlife's health assessment.

**Keywords:** ecotoxicology, trace metals, parasitism, wildlife, wood mouse, multi-stress, non-lethal methods, bioaccumulation, toxic effects, biomarkers, zoonoses, landscape features, body condition, somatic indices, hematology, histology, individual characteristics.





## REMERCIEMENTS

I deeply thank Peter Deplazes for accepting to evaluate the present work. Je remercie également Paco Bustamante pour avoir évalué ce travail de thèse. Je remercie aussi les membres du jury, Nico van den Brink et Cécile Grand, qui ont accepté d'examiner les présents travaux.

Je tiens à remercier Renaud Scheifler, mon directeur de thèse, avec qui je travaille depuis 2008. Je le remercie tout d'abord de m'avoir pris sous sa direction en stage de Master 1 et le remercie de m'avoir fait découvrir ce qu'est concrètement le travail d'un chercheur. Merci à lui de m'avoir une seconde fois accordé sa confiance quand je l'ai recontacté pour reprendre un master recherche. Merci aussi de m'avoir offert l'opportunité de continuer en thèse dans son équipe. Merci encore de m'avoir encadré et soutenu, au cours de la thèse, dans toutes mes démarches. Enfin merci à Renaud de m'avoir apporté tout le soutien nécessaire à la réalisation de mes projets : colloques, formations et enseignements.

Je tiens également à remercier Eve Afonso, co-directrice de thèse, pour tous les précieux conseils qu'elle m'a prodigués. Merci à Eve d'avoir largement contribué à la bonne réalisation de la thèse et d'avoir pris le temps de me former en biologie moléculaire. Merci à Eve pour sa patience et merci d'avoir su m'épauler au cours de ces trois dernières années.

Un grand merci à Clémentine Fritsch, pour toutes les discussions scientifiques que nous avons eues. Je la remercie de m'avoir fait profiter de son expérience de terrain, de son expertise dans certains domaines et d'avoir participé au suivi de ma thèse. Je la remercie sincèrement pour le temps passé ensemble afin d'obtenir les fonds de carte du site de Metaleurop présentés dans cette thèse.

Quiero agradecer mucho Alejandro Sánchez-Chardí por haber me permitido viajar en España, o mejor decir en Catalunya. Gracias para haberme enseñado los principios de histología. Gracias para su ayuda durante toda mi estancia en Barcelona, gracias por tu capacidad de reacción cuando hemos escrito la publicación de histología. Gracias por haber venido a mi comité de tesis en Besançon, gracias por todos sus preciosos consejos, por su simpatía y por haber hablado español conmigo.

Merci à Nico van den Brink, Francis Raoul, Michaël Coeurdassier et Cécile Grand d'avoir échangé avec moi tout au long de la thèse, d'avoir participé au comité de pilotage et de m'avoir prodigué de nombreux conseils. Merci tout particulièrement à Cécile Grand, d'avoir cru en ce projet et de l'avoir défendu auprès de l'ADEME.

Merci à Patrick Giraudoux qui a accepté de porter ce projet avec nous. Merci également à lui de m'avoir donné l'opportunité de voyager dans un pays dans lequel je n'aurais sûrement jamais mis les pieds, j'entends le Kirghizstan ! Merci de m'avoir permis de participer à cette mission de terrain passionnante. Enfin, merci également pour toutes les discussions scientifiques passionnantes que nous avons pu avoir, pour ses précieux conseils et pour sa franchise.

Merci à la direction du laboratoire Chrono-Environnement de m'avoir accueilli, de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans de très bonnes conditions et d'avoir mis à ma disposition tout le matériel nécessaire à son bon déroulement.

Merci à l'ADEME et au Conseil Régional de Franche-Comté de m'avoir permis d'obtenir une allocation d'aide à la recherche et donc d'avoir financé mes trois années de salaire de thèse. Merci également à l'Ecole Doctorale Environnement-Santé et à la Présidence de l'Université de Franche-Comté de m'avoir accordé des bourses de mobilité pour la réalisation de mon stage à Barcelone et pour la participation à des colloques internationaux.

Merci à Badr Alaoui-Sossé, de m'avoir permis d'obtenir des vacances afin de réaliser des enseignements au cours de la thèse. L'enseignement a été, pour moi, une expérience très enrichissante qui me conforte dans mes choix de carrière académique.

Merci à toutes les personnes avec lesquelles j'ai pu travailler au cours de ces dernières années. Anne-Pauline Bellanger pour les analyses hématologiques, et notamment, pendant mon séjour en Espagne, Mercè Durfort et Maria-José Fuster-Lopes qui m'ont permis d'acquérir de nombreuses compétences et connaissances.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué, par leur précieuse aide technique, à la bonne réalisation de ce projet : Nadia Crini, Coline Druart, Anne-Claude Goydadin, Jean-Claude Lambert, Brice Mourier, Fabrice Poncet, Anne-Sophie Prudent et Dominique Rieffel.

Merci aux deux stagiaires de Master 1, qui ont largement participé à cette thèse, Ghada Bouguerra (2011) et Lucile Mougin (2012). Que ce soit l'une ou l'autre de ces deux personnes, j'ai eu un grand plaisir à m'investir dans leur encadrement. Je les remercie pour leur sérieux et pour avoir porté les projets qu'on leur confiait. Je suis plus qu'heureux d'avoir pu valoriser ces projets auxquels ces deux stagiaires sont associés. Je leur souhaite une excellente continuation !

Comment un thésard s'en sortirait-il sans les personnes suivantes ? Un grand merci au personnel administratif, Martine Gautheron (Secrétaire de l'Ecole Doctorale Environnement-Santé), Marlène Gruet (Gestionnaire au laboratoire Chrono-Environnement), Brigitte Jolibois (Secrétaire au laboratoire Chrono-Environnement), Sylvie Varey (Responsable du Service de Gestion Financière du laboratoire Chrono-Environnement). Mesdames et mesdemoiselles, merci pour votre aide et merci d'avoir solutionné les différents problèmes administratifs que j'ai pu rencontrer tout au long de cette aventure !

Je tiens à remercier tous mes collègues de bureau qui se sont succédés, avec qui j'ai passé des journées entières devant nos ordis, et qui ont contribué à travailler dans la bonne humeur tout au long de la thèse: (par ordre d'arrivée) Clémentine Fritsch, Benjamin Pauget, Caroline Meyer, Marie Lejean, Zeinaba Said-Ali, Axelle Chiffre, Pierre-Emmanuel Baurand et Fabien Borderie.

Merci à tous les collègues du laboratoire Chrono-Environnement que je ne pourrais pas citer ici et que j'ai eu plus que plaisir à côtoyer ces dernières années. Je pense notamment aux personnes avec qui j'ai partagé mes déjeunés au RU.

Merci à tous mes amis de longue date de Lyon pour leur soutien et pour s'être intéressés à mon projet : Pauline, Julie, Timo, Matthieu, Marine, Guillaume et Svenja. Merci à toi Pauline d'avoir toujours été présente pour moi depuis toutes ces années. Un gros coucou aussi à l'équipe avec qui j'ai commencé l'université (Lyon 1) et avec qui je suis heureux d'être toujours en contact, Anaïs, Julien, Baptiste, Elsa, Pauline, Guillaume.

Big thanks to Rosie, Forest and all the J-1 students, Claire, Guillaume, Magalie, Jérôme..., from Tulane University! Folks, I haven't forgotten yall and I surely won't! I still remember the amazing time we spent all together back in New-Orleans, or NOLA should I say! I'm so glad I've met yall! Special thanks for Fory! Dude, you're the man to meet when someone arrives in a new town! Thank you for having shown me what we so call NOLA music life and what is the difference between what you consider "real music" compared to "Euro trash music"! Rosie, thank you for learning me English slang! Thanks to you, I learned what is the real american way of speaking, with a damned Bostonian accent! ;) I miss you guys and I deeply hope we will meet again soon! Take care!

Grosse pensée pour les amis de la promo « *La Louche* » de Dijon, Willy, Vivien, Alexis, Julien, Mar(t)ine et Marie et le petit nouveau Tiago ! Depuis la promo caviar (vous me comprendrez), il s'en est passé des choses et nous sommes toujours amis ! Merci pour les énormes délires et les multiples weekends prolongés géniaux que nous avons passés au cours de ces années ! Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon travail!

Un abrazo fuerte a todos los locos Erasmus de Barcelona de numerosos países y del grupo "latinos y otros": Maria, May, Andrea, Yut, Isa, Ruya, Santiago, Arjen, Lizzie, Mariana, Gaby, Anja, Aurélien, Chad, Elisa, Erica, Youssef! Espero que todo está perfecto para cada unos y que nos vemos pronto!

Bien sûr j'ai aussi une énorme pensée pour tous les amis de Besançon avec qui j'ai partagé ces dernières années : Steffi, Victor, Anne, Fabien, P-E, Pierline & Ben, Claire, Axelle, Manon, Séverine, Leslie, Dom, Anne-Claude, Pauline, Aurel, Anne-Sophie, Li li, Fred, Véronica, Maude, Pierre, Coline, Cybèle, Aurélien, Jean-Charles (l'ordre des noms est complètement aléatoire)... Merci à tous d'avoir accueilli le Lyonnais et de m'avoir permis de passer de superbes moments avec vous !!!! Petite dédicace à Steffi pour m'avoir montré comment aller au CELAB lors de mon arrivée à Besançon et à ma colloque Pierline : n'oublies pas... mi casa es tu casa comme on dit au Pérou ! Un gros clin d'œil à mes deux compères des ces dernières années, j'ai nommé Fab et P-E, pour tous les énormes délires et pour avoir été toujours présents pour moi! Merci aussi à Leslie, P-E et Pierline pour leur aide et leurs précieux conseils dans les derniers jours de rédaction de ce manuscrit.

Et que serait la vie d'un thésard sans les activités sportives pour se détendre un peu... Je remercie donc les différents « coachs sportifs »... Patrick, le leader des cours de préparation physique générale, P-E, qui m'a montré qu'on pouvait aisément faire 10km de course à pied en moins de 45mn, Séverine, qui m'a enfin appris les bons gestes de natation (le dos crawlé n'a plus de secret !), et of course Pauline la curling-coach ! Spéciale-dédicace à mes co-équipiers « *Curl me I'm famous* » !

Je remercie toute ma famille, pour leur soutien tout au long de ces années et pour avoir essayé de comprendre comment j'occupais mes journées ! Je tiens enfin, par dessus tout, à remercier très sincèrement mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes choix d'orientation professionnels. Je ne pourrais jamais suffisamment les remercier pour toutes les valeurs qu'ils ont su m'inculquer, pour leur soutien perpétuel dans toutes mes démarches et pour leurs encouragements dans les moments de doute.

*Cette thèse est dédiée aux personnes de ma famille qui n'ont pas pu voir l'aboutissement de ce travail, mes tantes, Denise (1941-2009) et Arlette (1943-2013) et ma grand-mère Yvonne (1918-2011).*



---

# Sommaire simplifié

---

VALORISATION SCIENTIFIQUE .....	1
AVANT PROPOS .....	5
I. INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	9
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES .....	45
III. RÉSULTATS.....	61
CHAPITRE 1: CAN BODY CONDITION AND SOMATIC INDICES BE USED TO EVALUATE METAL-INDUCED STRESS IN WILD SMALL MAMMALS?.....	63
CHAPITRE 2: HAIR AS A NON-LETHAL TOOL FOR RISK ASSESSMENT: DO THE CONCENTRATIONS OF CADMIUM AND LEAD IN THE HAIR OF WOOD MICE ( <i>APODEMUS SYLVATICUS</i> ) REFLECT INTERNAL CONCENTRATIONS? ....	93
CHAPITRE 3: EFFETS TOXIQUES DES ETMS AU NIVEAU HISTOLOGIQUE ET HÉMATOLOGIQUE.....	125
PARTIE 1: HISTOPATHOLOGY RELATED TO CADMIUM AND LEAD BIOACCUMULATION IN .CHRONICALLY EXPOSED WOOD MICE, <i>APODEMUS SYLVATICUS</i> , AROUND A FORMER SMELTER .....	127
PARTIE 2: BLOOD PARAMETERS AS BIOMARKERS OF TRACE METAL EXPOSURE AND EFFECT IN WILD WOOD MICE ( <i>APODEMUS SYLVATICUS</i> ) LIVING ALONG A GRADIENT OF POLLUTION .....	167
CHAPITRE 4: METAL POLLUTION AND LANDSCAPE FEATURES ARE ASSOCIATED TO AN INCREASE OF PARASITISM IN WILD WOOD MICE ( <i>APODEMUS SYLVATICUS</i> ).....	187
IV. DISCUSSION .....	225
V. CONCLUSION .....	253
VI. BIBLIOGRAPHIE.....	257



---

# Sommaire

---

VALORISATION SCIENTIFIQUE.....	1
<b>1 Publications internationales à comité de relecture .....</b>	<b>1</b>
1.1 Publications relatives à la thèse.....	1
1.2 Publications hors thématique de recherche principale.....	2
<b>2 Conférences internationales relatives à la thèse.....</b>	<b>2</b>
<b>3 Conférences nationales relatives à la thèse .....</b>	<b>3</b>
AVANT PROPOS .....	5
<b>1 Intégration de la thèse dans les thématiques de recherches de l'UMR.....</b>	<b>5</b>
<b>2 Financement de la thèse.....</b>	<b>6</b>
<b>3 Comité de pilotage.....</b>	<b>6</b>
<b>4 Calendrier général de la thèse.....</b>	<b>7</b>
I. INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	9
<b>1 Contexte général.....</b>	<b>11</b>
1.1 Historique et objectifs de l'écotoxicologie.....	11
1.2 De l'écotoxicologie vers l'écologie du stress .....	13
1.3 Le développement des méthodes non létales en écotoxicologie .....	16
<b>2 Les animaux et le stress .....</b>	<b>18</b>
2.1 La pollution aux ETMs.....	20
2.1.1 <i>Le cadmium</i> .....	22
2.1.2 <i>Le plomb</i> .....	23
2.2 Les organismes pathogènes .....	24
2.3 Interactions entre différents stress .....	26
2.4 L'influence du paysage sur la réponse des animaux face aux stress .....	28
<b>3 Le modèle d'étude: le mulot sylvestre .....</b>	<b>30</b>
3.1 Utilisation des rongeurs en écotoxicologie.....	30
3.2 Biologie et écologie du mulot.....	31
<b>4 Accumulation des ETMs et réponses des mulots .....</b>	<b>34</b>
4.1 Marqueurs d'accumulation des ETMs.....	34
4.2 Marqueurs d'effets des ETMs .....	35

4.3	Facteurs de variabilité dans les réponses aux stress du mulot .....	39
<b>5</b>	<b>Objectifs de la thèse .....</b>	<b>41</b>
<b>II.</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES.....</b>	<b>45</b>
<b>1</b>	<b>Site d'étude .....</b>	<b>47</b>
1.1	Contexte socio-économique du bassin industriel du Nord Pas-de-Calais .....	47
1.2	Contexte environnemental.....	47
1.3	Contamination du site d'étude.....	48
1.4	Stratégie d'échantillonnage du site d'étude.....	50
1.5	Analyse paysagère du site d'étude.....	51
<b>2</b>	<b>Sessions d'échantillonnages.....</b>	<b>54</b>
2.1	Session d'échantillonnage d'automne 2006 .....	54
2.2	Session d'échantillonnage d'automne 2010 .....	56
2.3	Session d'échantillonnage du printemps 2011 .....	57
<b>3</b>	<b>Résultats de capture et prélèvement des échantillons.....</b>	<b>59</b>
<b>III.</b>	<b>RÉSULTATS.....</b>	<b>61</b>
CHAPITRE 1: CAN BODY CONDITION AND SOMATIC INDICES BE USED TO EVALUATE		
METAL-INDUCED STRESS IN WILD SMALL MAMMALS? .....		
		63
<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>66</b>
<b>2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>68</b>
2.1	Study site .....	68
2.2	Small mammals sampling.....	72
2.3	Animal preparation and morphometric measurements.....	72
2.4	Measure of TM concentrations in tissues .....	73
2.5	Indices calculations and statistical analyses .....	73
<b>3</b>	<b>Results .....</b>	<b>76</b>
3.1	Sample size and wood mice population structure .....	76
3.2	Accumulation of TMs in wood mice.....	76
3.3	Influence of individual and environmental factors on body condition and somatic indices	77
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>82</b>
4.1	Influence of individual variables on body condition and somatic indices: methodological considerations .....	82



4.2	Influence of environmental characteristics on the indices.....	82
4.3	Use of somatic and condition indices as contamination and health status indicator .	84
<b>5</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Acknowledgements .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>References.....</b>	<b>88</b>

CHAPITRE 2: HAIR AS A NON-LETHAL TOOL FOR RISK ASSESSMENT: DO THE CONCENTRATIONS OF CADMIUM AND LEAD IN THE HAIR OF WOOD MICE (*APODEMUS SYLVATICUS*) REFLECT INTERNAL CONCENTRATIONS?..... 93

<b>1</b>	<b>Introduction.....</b>	<b>97</b>
<b>2</b>	<b>Materials and methods .....</b>	<b>100</b>
2.1	Study site .....	100
2.2	Data collection.....	102
2.3	Evaluation of TM concentrations in tissues .....	102
2.4	Statistical analysis .....	103
<b>3</b>	<b>Results.....</b>	<b>104</b>
3.1	Capture success, age, and gender .....	104
3.2	Accumulation of TMs in the liver and kidneys in relation to soil accumulation....	104
3.3	Relationships between TM concentrations in organs or in soils and those in hair..	104
3.4	Impact of individual characteristics on hair predictions.....	105
<b>4</b>	<b>Discussion.....</b>	<b>111</b>
4.1	Use of hair as a non-destructive tool to predict internal and environmental TM concentrations.....	111
4.2	Influence of individual characteristics (body mass and gender) on the prediction of TM concentrations in organs from those in hair.....	114
<b>5</b>	<b>Conclusion .....</b>	<b>115</b>
<b>6</b>	<b>Acknowledgements .....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>References.....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>Supplementary Material.....</b>	<b>121</b>
8.1	Detailed protocol for the measure of TM concentrations in tissues .....	121
8.2	Metrology for the measure of TM concentrations in tissues .....	121

CHAPITRE 3: EFFETS TOXIQUES DES ETMS AU NIVEAU HISTOLOGIQUE ET HÉMATOLOGIQUE ..... 125

PARTIE 1: HISTOPATHOLOGY RELATED TO CADMIUM AND LEAD BIOACCUMULATION IN CHRONICALLY EXPOSED WOOD MICE, <i>APODEMUS SYLVATICUS</i> , AROUND A FORMER SMELTER.....	127
<b>1 Introduction.....</b>	<b>132</b>
<b>2 Materials and methods .....</b>	<b>135</b>
2.1 Study site .....	135
2.2 Small mammal collection and sample preparation.....	135
2.3 Quantification of Cd and Pb in tissues .....	137
2.4 Histopathological evaluation .....	137
2.5 Statistical analyses.....	138
<b>3 Results .....</b>	<b>139</b>
3.1 Wood mouse sample characteristics.....	139
3.2 Accumulation of TMs in wood mice.....	139
3.3 Observed pathologies and relationships with TM concentrations.....	143
3.3.1 <i>Histological alterations</i> .....	143
3.3.2 <i>Tissular and individual scores</i> .....	146
<b>4 Discussion.....</b>	<b>147</b>
4.1 Accumulation of TMs in wood mice.....	147
4.2 Histological alterations .....	148
4.3 Risk to wildlife under chronic exposure to TMs .....	150
<b>5 Conclusion .....</b>	<b>152</b>
<b>6 Acknowledgements .....</b>	<b>153</b>
<b>7 References.....</b>	<b>154</b>
PARTIE 2: BLOOD PARAMETERS AS BIOMARKERS OF TRACE METAL EXPOSURE AND EFFECT IN WILD WOOD MICE ( <i>APODEMUS SYLVATICUS</i> ) LIVING ALONG A GRADIENT OF POLLUTION .....	167
<b>1 Introduction.....</b>	<b>171</b>
<b>2 Materials and methods .....</b>	<b>173</b>
2.1 Study site, small mammals collection and preparation .....	173
2.2 Blood parameters evaluation .....	175
2.3 Quantification of Cd and Pb in tissues .....	175
2.4 Statistical analysis .....	176
<b>3 Results and Discussion.....</b>	<b>177</b>
<b>4 Conclusion .....</b>	<b>182</b>
<b>5 Acknowledgements .....</b>	<b>182</b>

<b>6 Bibliography .....</b>	<b>183</b>
CHAPITRE 4: METAL POLLUTION AND LANDSCAPE FEATURES ARE ASSOCIATED TO AN INCREASE OF PARASITISM IN WILD WOOD MICE ( <i>APODEMUS SYLVATICUS</i> ) .....	187
<b>1 Introduction.....</b>	<b>191</b>
<b>2 Materials and methods .....</b>	<b>193</b>
2.1 Study site .....	193
2.2 Small mammals sampling and processing.....	193
2.3 Parasite detection.....	196
2.4 Measure of TM concentrations in tissues .....	198
2.5 Landscape diversity, composition and structure.....	198
2.6 Statistical analysis .....	198
<b>3 Results.....</b>	<b>200</b>
3.1 Sample characteristics .....	200
3.2 Accumulation of TMs.....	200
3.3 Parasite prevalence and richness .....	200
3.4 Parasitism: spatial dependence and relationships with landscape features.....	201
3.5 Relationships between parasitism and pollution .....	201
<b>4 Discussion.....</b>	<b>204</b>
<b>5 Conclusion .....</b>	<b>208</b>
<b>6 Bibliography .....</b>	<b>209</b>
<b>7 Supplementary Material.....</b>	<b>218</b>
7.1 Detailed protocol for the measure of TM concentrations in tissues and metrology associated .....	218
7.2 Relationships between internal concentrations and land use.....	219
7.3 Synthèse bibliographiques des prévalences des parasites étudiés chez le mulot sylvestre .....	220
7.4 Bibliographie du Supplementary Material .....	221
IV. DISCUSSION.....	225
<b>1 Accumulation des ETMs .....</b>	<b>227</b>
<b>2 Seuils toxiques .....</b>	<b>232</b>
<b>3 Effets des stress sur la santé des mulots.....</b>	<b>235</b>
<b>4 Développement de méthodes non létales .....</b>	<b>246</b>
4.1 Apports de la thèse et enjeux.....	246
4.2 Prise en compte des caractéristiques individuelles.....	248

<b>5</b>	<b>Limites de l'étude</b> .....	<b>250</b>
5.1	Modèle d'étude.....	250
5.2	Prise en compte de sources de pollution multiples.....	250
5.3	Stratégie d'échantillonnage .....	250
5.4	Choix de la maille témoin.....	251
<b>6</b>	<b>Perspectives</b> .....	<b>252</b>
6.1	Impacts cumulés des ETMs et du parasitisme sur la santé de la faune sauvage.....	252
6.2	La poursuite du développement de méthodes non létales .....	252
V.	CONCLUSION.....	253
VI.	BIBLIOGRAPHIE.....	257
<b>1</b>	<b>Références bibliographiques</b> .....	<b>259</b>
<b>2</b>	<b>Références webographiques</b> .....	<b>281</b>

---

# Valorisation scientifique

---

## 1 Publications internationales à comité de relecture

---

### 1.1 Publications relatives à la thèse

---

Nicolas TÊTE, Mercè DURFORT, Dominique RIEFFEL, Renaud SCHEIFLER, Alejandro SANCHEZ-CHARDI. 2014. Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, *Apodemus sylvaticus*, around a former smelter. *Science of the Total Environment*. 481: 167-177.

Nicolas TÊTE, Clémentine FRITSCH, Eve AFONSO, Michaël COEURDASSIER, Jean-Claude LAMBERT, Patrick GIRAUDOUX, Renaud SCHEIFLER. 2013. Can body condition and somatic indices be used to evaluate metal-induced stress in wild small mammals? *PLoS One*. 8(6): e66399. doi:10.1371/journal.pone.0066399.

Nicolas TÊTE, Eve AFONSO, Nadia CRINI, Séverine DROUHOT, Anne-Sophie PRUDENT, Renaud SCHEIFLER. Hair as a non-lethal tool for risk assessment: do concentrations of cadmium and lead in hair of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) reflect internal concentrations? (Soumis à *Ecotoxicology and Environmental Safety*)

Nicolas TÊTE, Eve AFONSO, Ghada BOUGUERRA, Renaud SCHEIFLER. Blood parameters as biomarker of trace metal exposure and effect in wild wood mice (*Apodemus sylvaticus*) living along a gradient of pollution. (Soumis à *Chemosphere*)

Nicolas TÊTE, Eve AFONSO, Clémentine FRITSCH, Lucile MOUGIN, Anne-Claude GABIOT-GOYDADIN, Renaud SCHEIFLER. Metal pollution and landscape features are associated to an increase of parasitism in wild wood mice (*Apodemus sylvaticus*). (*In prep* for *Environmental Health Perspectives*)

## 1.2 Publications hors thématique de recherche principale

---

Fabien BORDERIE, Nicolas TÊTE, Didier CAILHOL, Laurence ALAOUI-SEHMER, Faisal BOUSTA, Dominique RIEFFEL, Lotfi ALEYA, Badr ALAOUI-SOSSE. 2014. Factors driving epilithic algal colonization in show caves and new insights into how to combat biofilm development through UV-C treatments. *Science of the Total Environment*. 484: 43-52.

Séverine DROUHOT, Francis RAOUL, Nadia CRINI, Christelle TOUGARD, Anne-Sophie PRUDENT, Coline DRUART, Dominique RIEFFEL, Jean-Claude LAMBERT, Nicolas TÊTE, Patrick GIRAUDOUX, Renaud SCHEIFLER. 2014. Responses of wild small mammals to arsenic pollution in a partially remediated mining site in Southern France. *Science of the Total Environment* 470-471: 1012-1022.

Eve AFONSO, Jenny KNAPP, Nicolas TÊTE, Patrick GIRAUDOUX. Natural infection of the Zaisan mole vole *Ellobius tancrei* with *Echinococcus multilocularis* in Kyrgyzstan and its phylogenetic relationships with other asian *E. multilocularis* specimens. (*In prep*)

## 2 Conférences internationales relatives à la thèse

---

Nicolas TÊTE, Alejandro SANCHEZ-CHARDI, Eve AFONSO, Renaud SCHEIFLER. *Biomarkers of exposure and effects to detect the toxic effects in wood mice along a gradient of pollution*. Présentation d'un poster à la SETAC Europe de Bâle, Suisse. 11-15 mai 2014.

Nicolas TÊTE, Eve AFONSO, Clémentine FRITSCH, Renaud SCHEIFLER. *Influence of individual parameters, habitat diversity, and trace metal contamination on tick-borne disease prevalence in wild wood mice (Apodemus sylvaticus)*. Présentation orale à la SETAC Europe de Glasgow, Royaume-Uni. 12-16 mai 2013.

Nicolas TÊTE, Clémentine FRITSCH, Eve AFONSO, Michaël COEURDASSIER, Brice MOURIER, Jean-Claude LAMBERT, Patrick GIRAUDOUX, Renaud SCHEIFLER. *Can body condition and somatic indices be used to evaluate toxicity of trace metals in small mammals?* Présentation orale à la SETAC de Cracovie, Pologne. 17-19 septembre 2012.

Nicolas TÊTE, Clémentine FRITSCH, Eve AFONSO, Michaël COEURDASSIER, Brice MOURIER, Jean-Claude LAMBERT, Patrick GIRAUDOUX, Renaud SCHEIFLER. *Can body condition and somatic indices be used to evaluate the toxicity of trace metals in wild small mammals?* Présentation d'un poster à la SETAC Mondiale, Berlin, Allemagne. 20-25 mai 2012.

### 3 Conférences nationales relatives à la thèse

---

Nicolas TÊTE, Eve AFONSO, Clémentine FRITSCH, Renaud SCHEIFLER. Influence des paramètres individuels, de la diversité d'habitat et de la contamination en éléments traces métalliques sur les prévalences de maladies à tiques chez le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*)/ Influence of individual parameters, habitat diversity, and trace metal contamination on tick-borne disease prevalence in wild wood mice (*Apodemus sylvaticus*). Présentation orale à la SEFA, Thionville. 3 et 4 juillet 2013.

Nicolas TÊTE, Clémentine FRITSCH, Eve AFONSO, Michaël COEURDASSIER, Brice MOURIER, Jean-Claude LAMBERT, Patrick GIRAUDOUX, Renaud SCHEIFLER. *Les indices de condition corporelle et somatiques peuvent-ils être utilisés afin d'évaluer la toxicité des éléments traces métalliques ?* Présentation orale au XVIII<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Besançon, France. 6 et 7 septembre 2012. *Gagnant du prix Communications FJC 2012.*

Nicolas TÊTE, Clémentine FRITSCH, Michaël COEURDASSIER, Renaud SCHEIFLER, Patrick GIRAUDOUX. *Pertinence des indices de condition corporelle et somatiques dans un contexte écotoxicologique.* Présentation orale au XVII<sup>ème</sup> Forum des Jeunes Chercheurs, Dijon, France. 16 et 17 juin 2011.





---

# *Avant propos*

---

## **1 Intégration de la thèse dans les thématiques de recherches de l'UMR**

---

Ce travail de thèse s'inscrit dans la continuité de certains axes des travaux de recherches menés par l'UMR Chrono-Environnement, notamment dans la compréhension du fonctionnement des écosystèmes. Cette thématique de recherche comprend, entre autres objectifs, la définition des mécanismes d'interactions et de transferts en fonction de l'impact anthropique, à tous les niveaux d'organisation et à différentes échelles de temps et d'espace. Cette approche permet de mettre en évidence les effets de l'anthropisation sur les réponses fonctionnelles des biogéosystèmes en termes de régulations, de flux, de rôle des interfaces, de cyclicité et de contamination. Dans ce contexte, une partie des membres du laboratoire développe depuis 1995 des travaux de recherche dans le domaine de l'écotoxicologie. Après avoir étudié la biodisponibilité, les transferts et les effets de nombreux polluants (métaux lourds, radioéléments, substances organiques) dans des chaînes alimentaires sols - plantes - escargots en conditions contrôlées (puis sur le terrain grâce à l'utilisation de microcosmes), l'équipe a élargi le champ de ses activités de recherche à l'étude du devenir et des effets des polluants au niveau des réseaux trophiques étudiés *in situ*. Plus précisément, la présente thèse, fait suite à différents travaux menés au laboratoire qui ont permis de développer des approches originales sur les vertébrés (modèles peu étudiés jusqu'à récemment en écotoxicologie) et notamment les micromammifères (rongeurs tels que mulots et campagnols et insectivores tels que musaraignes) et les oiseaux (programme STARTT 2006-2009). L'ensemble de ces travaux de recherche a apporté des données essentielles pour la modélisation des transferts et des effets des métaux dans les réseaux trophiques et le développement d'outils de surveillance et d'évaluation du risque environnemental. Le présent projet, visant à comprendre l'exposition et les mécanismes d'effet de polluants métalliques et du parasitisme chez des micromammifères et contribuant au développement d'outils non létaux d'évaluation des risques environnementaux, s'inscrit dans la continuité de ces travaux.

## 2 Financement de la thèse

---

L'allocation de recherche (3 ans de salaire) a été financée conjointement par le Conseil Régional de Franche-Comté et par l'ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*).

## 3 Comité de pilotage

---

Le comité de pilotage, composé des membres suivants, s'est réuni le 16 juillet 2012 à mi-parcours de la thèse :

Eve Afonso (Co-directrice de thèse, UFC)

Francis Raoul (UFC)

Michaël Cœurassier (UFC)

Alejandro Sanchez-Chardi (UAB, Barcelona)

Clémentine Fritsch (UFC)

Renaud Scheifler (Directeur de thèse, UFC)

Cécile Grand (ADEME, Angers)

Nico van den Brink (ALTERRA,  
Wageningen)

#### 4 Calendrier général de la thèse

Saisons	Année 1 (2010-2011)			Année 2 (2011-2012)			Année 3 (2012-2013)			Année 4 (2013-2014)		
	Aut	Hiv	Prin	Été	Aut	Hiv	Prin	Été	Aut	Hiv	Prin	Été
<i>Travaux de terrain et analyses en laboratoire</i>												
Sessions de captures létales ou non létales												
Préparation des tissus biologiques pour analyse des métaux												
Dosages des métaux												
Analyse des prévalences parasitaires												
Analyses morphométriques et statistiques												
Analyses histologiques et hématologiques												
<i>Suivi de thèse, valorisation et enseignement</i>												
Comité de pilotage												
Congrès												
Synthèse et rédactions des rapports bisannuels												
Rédaction d'articles												
Rédaction du rapport de thèse et soutenance												
Activité d'enseignement												



---

# *I. Introduction générale*

---



## 1 Contexte général

---

### 1.1 Historique et objectifs de l'écotoxicologie

---

L'écotoxicologie est généralement décrite comme « la science des contaminants dans la biosphère et de leurs effets sur les constituants de la biosphère, y compris les humains » (Newman, 2001). Cette science pluridisciplinaire récente est fondée sur un rapprochement de deux domaines de recherches majeurs, l'écologie et la toxicologie (Rattner, 2009). C'est en 1969 que René Truhaut, toxicologue français, introduit le terme « écotoxicologie » comme extension logique de la toxicologie, et décrit cette science comme l'étude des effets écologiques des polluants (Truhaut, 1977).

L'histoire et le développement de l'écotoxicologie ont notamment été gouvernés, au cours du XX<sup>ème</sup> siècle, par l'utilisation de produits chimiques, parfois à outrance, par les accidents industriels et écologiques majeurs, par les intoxications humaines et par les avancées de la recherche dans le domaine de la toxicologie humaine (Rattner, 2009). Parmi les désastres écologiques les plus tristement célèbres, nous pouvons nommer, entre autres exemples, la fusion du réacteur nucléaire de Chernobyl en 1986, qui exposa l'atmosphère et l'environnement autour du réacteur aux radioéléments, ou citer le naufrage pétrolier de l'*Exxon Valdez* en 1989, qui causa la mort de 100 000 à 300 000 oiseaux marins et de 2 800 à 4 000 mammifères marins (Albers, 2003; Jessup et Leighton, 1996). Aujourd'hui, grâce aux outils dont elle dispose, l'écotoxicologie vise à comprendre les mécanismes de contamination des écosystèmes par les polluants directement ou indirectement toxiques (Cairns, 1988; Koeman, 1982). Elle cherche également à prévoir les impacts potentiels d'une pollution sur un écosystème donné ou sur des espèces non ciblées (Hoffman et al, 1995).

Un polluant est défini comme étant une substance naturelle ou artificielle que l'homme a introduite dans un milieu où elle était absente (ou présente en quantité différente). Les polluants, suivant leur nature, peuvent être répartis en trois catégories. La première catégorie correspond aux pollutions dites « physiques » qui incluent la chaleur, la radioactivité, le bruit et la pollution lumineuse. La deuxième catégorie est celle des pollutions dites « chimiques », qui comprennent les pesticides (DDT), de nombreux polluants organiques (dioxines, furanes, PCB...), les hydrocarbures, les détersifs et tensioactifs, les matières eutrophisantes, les éléments traces métalliques (ETMs), les perturbateurs endocriniens et les médicaments et cosmétiques (Shore et Rattner, 2001). Enfin, la troisième catégorie inclut les polluants ou

« stress » considérés comme de nature biologique, les toxines algales et bactériennes, les germes pathogènes et les parasites.

L'objectif fondamental de l'écotoxicologie est l'étude des polluants toxiques dans les écosystèmes et la biosphère toute entière (Ramade, 2007). Pour évaluer la toxicité des nombreux polluants présents dans l'environnement, cette science utilise de multiples mesures d'exposition et paramètres d'effets (Shore et Rattner, 2001). L'ensemble de ces marqueurs se situent à différents niveaux d'organisations biologiques allant de l'échelle moléculaire, avec par exemple, l'étude des effets des radiations ionisantes sur l'ADN, jusqu'à l'échelle de la communauté, avec les études de dynamique et de structure des communautés (Figure I.1). Le choix du niveau d'organisation sera donc dépendant des hypothèses scientifiques à tester. Les différents niveaux d'organisation biologique impliquent également des niveaux différents d'organisation spatiale et temporelle, qu'il s'agit de prendre en compte en écotoxicologie (Lidicker, 2007).

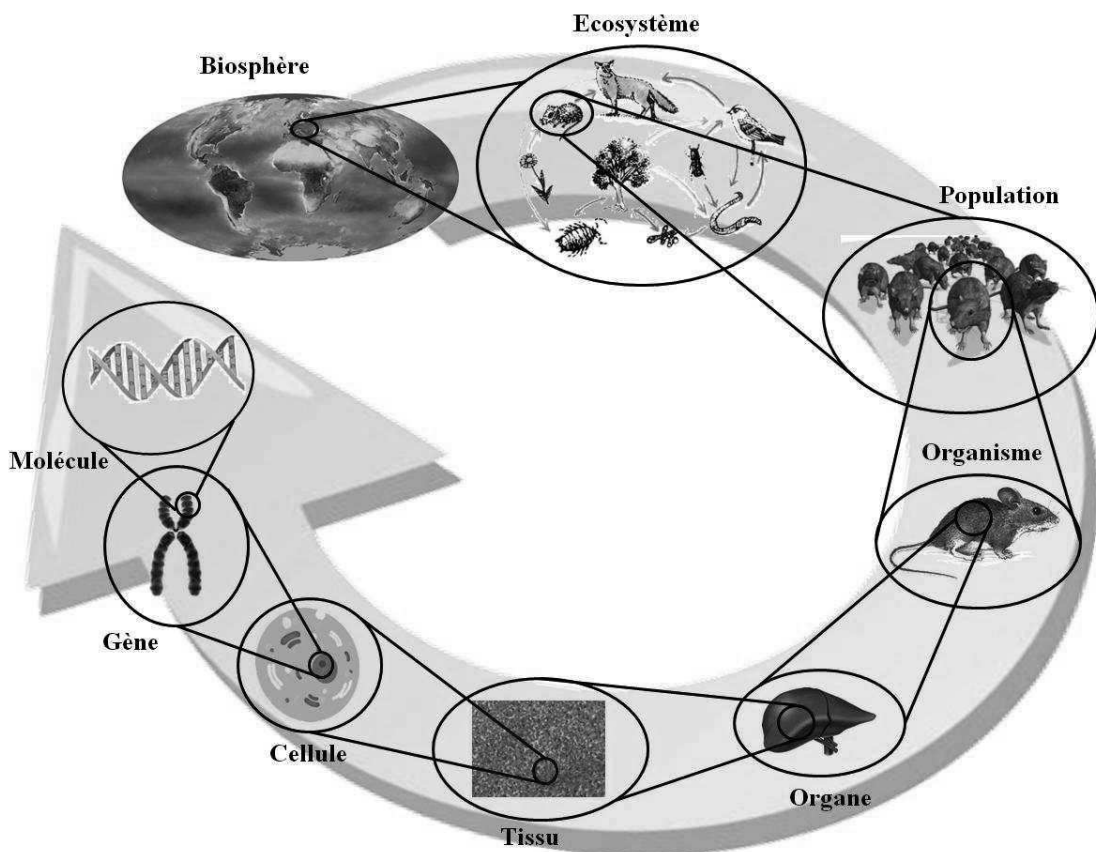


Figure I.1 Niveaux d'organisation biologiques étudiés en écotoxicologie



## 1.2 De l'écotoxicologie vers l'écologie du stress

L'intérêt de l'écotoxicologie, comme vu précédemment, est d'étudier les mécanismes conduisant les toxiques à altérer le fonctionnement des individus, ainsi que les conséquences potentielles à l'échelle populationnelle, communautaire et/ou écosystémique. Pour ce faire, de nombreuses études de laboratoire ont été réalisées en conditions contrôlées. Ces études ont permis d'évaluer les effets d'un polluant ou d'un groupe de polluants à divers niveaux d'organisation biologique. Ces tests, appelés « tests d'écotoxicité », comprennent un large éventail de méthodes qui dépendent du niveau d'organisation considéré ou de la durée d'exposition, et qui permettent de relier la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants à des effets toxiques sur une (tests monospécifiques) ou plusieurs espèces (tests plurispécifiques) (Shore et Rattner, 2001). Les paramètres écotoxicologiques issus de ces tests (NOEC (No Observed Effect Concentration), EC50 (Effective Concentration) par exemple) peuvent ensuite être utilisés afin d'extrapoler les risques liés à la présence de contaminants sur des sites pollués. Les résultats de l'ensemble des tests réalisés sur différents taxons peuvent également être utilisés afin de modéliser et prédire la proportion de taxons à risque au sein d'un réseau trophique en fonction des concentrations d'un polluant. En d'autres termes, ces méta-analyses permettent de déterminer des concentrations seuils afin d'assurer la survie d'une partie des taxons du réseau trophique (généralement 90% ou 95% des taxons). C'est le principe de l'approche « Species sensitivity distribution » décrite par Posthuma et al (2002) (Figure I.2).

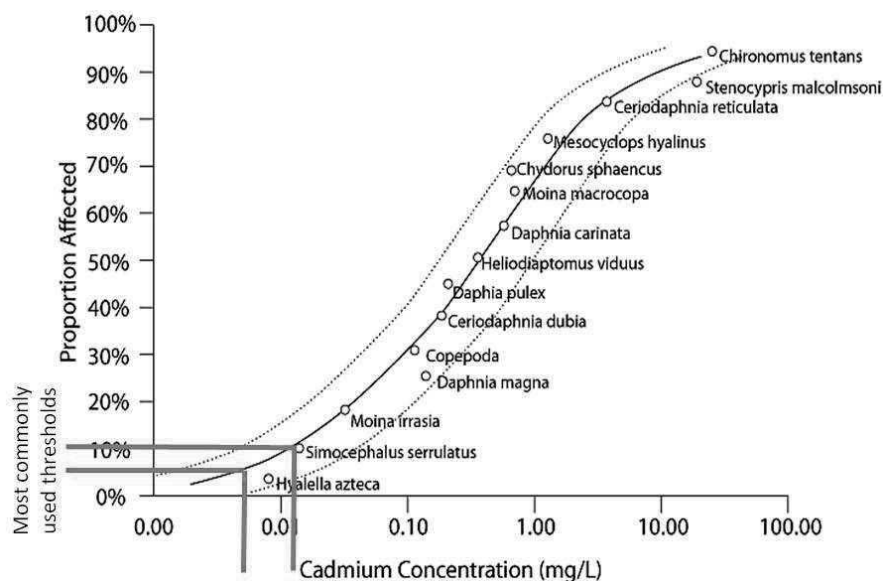


Figure I.2 Graphique de SSD montrant la distribution des CL<sub>50</sub> pour différentes espèces d'arthropodes exposés au Cd (Conditions expérimentales : eau à 15°C, exposition 48-72h). Les intervalles de confiance à 95% sont représentés par des lignes pointillées. Les données ont été obtenues à partir de la base de données ECOTOX de l'US EPA (Posthuma et al, 2002).

Cependant, l'extrapolation des résultats de tests d'écotoxicité, fiables et reproductibles en conditions contrôlées, à des contextes environnementaux complexes, peut poser problème (van Gestel et van Straalen, 2008). Une étude récente a par exemple mis en évidence des différences de sensibilité chez des animaux d'une même espèce soumis à une contamination en cadmium (Cd), dont une partie de la population provenait d'un élevage en laboratoire et l'autre partie était prélevée sur le terrain (Salinska et al, 2013). Les auteurs ont montré que les campagnols roussâtres (*Clethrionomys glareolus*) sauvages, ramenés en laboratoire, étaient plus sensibles aux concentrations de Cd contenues dans la nourriture que les individus qui provenaient de l'élevage. De même, les campagnols sauvages présentaient plus d'altérations histologiques dans le foie et les reins (Salinska et al, 2013). Ce phénomène peut être expliqué par le fait que dans leur milieu naturel, les animaux sont soumis à de multiples sources de stress. En effet, les contaminants potentiellement non toxiques peuvent le devenir dans des conditions environnementales dégradées ; l'altération de l'habitat ou les quantités de ressources alimentaires peuvent notamment jouer un rôle important sur la toxicité des polluants (Shore et Rattner, 2001).

Dans des conditions environnementales réalistes, certains stress, selon leurs origines, peuvent être considérés comme naturels. Nous appellerons « stress naturels » l'ensemble des stress qui ne sont pas directement induits par l'activité humaine : fluctuation de ressources alimentaires, prédation, climat, parasitisme... D'autres stress, induits par l'impact direct des sociétés humaines sur l'environnement, seront appelés « stress anthropiques » dans ce document : pollution, fragmentation du paysage, changement d'occupation du sol, surexploitation des ressources... Des analogies entre effets des polluants et perturbations naturelles sont possibles car les réponses des organismes face à ces deux types de stress peuvent être similaires (Forbes et Forbes, 1994). Il apparaît donc primordial, en écotoxicologie, d'évaluer de la manière la plus réaliste possible les effets de la pollution sur les écosystèmes dans des conditions « environnementales pertinentes ». Cette approche dérive de l'approche « systémique » qui se propose d'étudier les écosystèmes dans leur ensemble, de façon interdisciplinaire, à différents niveaux d'organisation biologique et à plusieurs échelles de temps et d'espace (Giraudoux et al, 2007). Les études de terrain permettent d'obtenir, par rapport aux expériences réalisées sous conditions contrôlées, des données plus pertinentes mais qui sont également souvent plus difficiles d'interprétation en raison de la variabilité importante de la contamination des milieux, de l'exposition des organismes et de leurs multiples réponses biologiques. Cette approche consiste donc à étudier *in situ* la biodisponibilité, le transfert et/ou les effets des polluants sur les organismes en intégrant un

certain nombre de facteurs pouvant interagir. Il est nécessaire de considérer le système étudié dans son ensemble et d'étudier les variables potentiellement impliquées les phénomènes observés. Ceci revient à étudier les animaux dans leur milieu naturel, en prenant en compte l'état initial du système (état physiologique des animaux étudiés et état initial de l'environnement), afin de discriminer les effets liés aux polluants des effets imputables aux stress ou aux fluctuations naturels. C'est le principe de l'approche globale, aussi appelée par certains auteurs évaluation « intégrée » du risque, ou encore « écologie du stress » (van den Brink, 2008; van Gestel et van Straalen, 2008; van Straalen, 2003).

En parallèle de ces approches « intégratrices », il apparaît également primordial d'intégrer la notion temporelle dans l'étude de l'exposition et des effets des polluants sur les écosystèmes. En effet, les tests de toxicité en laboratoire permettent une évaluation fiable des effets néfastes des polluants dans le cas de toxicités aiguës ou sub-aiguës, mais ne rendent pas (ou peu) compte des effets écotoxiques liés à des contaminations chroniques (notamment à cause des contraintes techniques et financières liées aux manipulations de laboratoire). Dans le cadre des expérimentations de terrain, les prélèvements d'animaux pour des études écotoxicologiques est létal dans la majorité des cas, et ne permet pas le suivi temporel des effets néfastes des polluants sur la santé des organismes étudiés. De même, la capture létale d'un certain nombre d'individus peut perturber la dynamique des populations étudiées, surtout si les prélèvements sont réalisés de manière répétée (mensuellement ou saisonnièrement par exemple) sur les mêmes sites. Ces prélèvements peuvent potentiellement provoquer des effets biologiques sur les populations étudiées qui peuvent se conjuguer de manière complexe avec les effets des contaminants, rendant hasardeuse l'interprétation des résultats au regard de la pollution. Les perspectives de recherches en écotoxicologie doivent donc intégrer le besoin croissant de suivis de long terme pour l'évaluation de la santé des écosystèmes. Les méthodes non-létales constituent une des approches possibles pour cela.

### 1.3 Le développement des méthodes non létales en écotoxicologie

---

Aujourd'hui, l'exposition des polluants est traditionnellement mesurée dans les tissus cibles, ce qui implique le prélèvement d'organes et donc le sacrifice des individus étudiés. Cependant, des approches non-létales peuvent être envisagées pour obtenir des informations relatives à la contamination des individus. Ces approches peuvent par exemple reposer sur l'échantillonnage non léthal de tissus animaux comme les phanères (poils, plumes, écailles, griffes...) (Beernaert et al, 2007), le sang (Rogival et al, 2006) ou encore de déchets abandonnés par les animaux comme les fèces (Dauwe et al, 2000) et les pelotes de régurgitation (Newton et al, 1994). Les concentrations en contaminants mesurées dans ces échantillons sont généralement bien corrélées à l'exposition, voire aux concentrations internes des organismes, ce qui permet une évaluation non létale des teneurs internes en polluants. Les prélèvements de cheveux et de poils, par exemple, sont couramment utilisés chez les humains (Li et al, 2011) et dans les élevages d'animaux domestiques (Nageeb Rashed et Soltan, 2005). De même, certains échantillons non létaux, par exemple les prélèvements sanguins, peuvent être utilisés afin d'obtenir des informations sur l'état de santé des individus. Les problèmes liés aux prélèvements létaux ont été identifiés depuis longtemps par les écologues travaillant sur les relations entre l'état de santé des individus et les dynamiques des populations ou des communautés (Norrdahl et Korpimaki 2002; Norrdahl et al, 2004). Ils ont donc, entre autres, développé divers marqueurs morphologiques, généralement appelés indices de condition corporelle, qui évitent le sacrifice des animaux (Schulte-Hostedde et al, 2005).

Outre les problèmes limitant l'interprétation scientifique des résultats, les captures létales posent également des questions d'ordre éthique. Même si la société occidentale a une conception utilitariste des animaux, le rapport de la société aux animaux a largement évolué depuis le milieu du XX<sup>ème</sup> siècle et de nombreuses mesures en matière d'éthique médicales et vétérinaires ont été mises en place. En 1959, en France, apparaît dans le code pénal « *le cas de mauvais traitements des animaux domestiques et sauvages* », décret n°59-1051 du 7 septembre 1959 (<http://legifrance.gouv.fr>). La loi n°63-1143 du 19 novembre 1963 crée le délit d'acte de cruauté, qui prévoit la remise de l'animal à une œuvre en cas d'acte barbare (<http://legifrance.gouv.fr>). En 1976, pour la première fois dans l'histoire, l'article 9, de la loi du 10 juillet, reconnaît à l'animal sa nature d'être sensible « [...] *Tout animal, étant un être sensible, doit être placé par son propriétaire dans des conditions compatibles avec les impératifs biologiques de son espèce* [...] » (<http://legifrance.gouv.fr>). L'animal a donc le droit de ne pas souffrir inutilement et de ne pas être mis à mort sans nécessité. En 1992, la

législation évolue encore, le législateur marque la distinction qui s'impose entre l'animal " être vivant " et les autres biens de nature matérielle (<http://legifrance.gouv.fr>). De plus, une limitation légale est apportée au droit de propriété des animaux; les maîtres doivent se comporter envers leurs animaux selon une éthique sanctionnée par la loi pénale.

La réglementation spécifique à l'utilisation des animaux dans un cadre scientifique a également largement évolué ces dernières années. En 1986, la convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques (CEE86/609) a été signée (<http://legifrance.gouv.fr>). En 2005, le décret d'application 2005-265 impose la création d'un comité national de réflexion sur l'expérimentation animale qui réunit l'ensemble des comités d'éthique locaux ou régionaux (<http://legifrance.gouv.fr>). En 2010, la Directive Européenne UE2010/63, mettant en place de nouvelles dispositions plus contraignantes pour l'utilisation d'animaux en recherche biomédicale, est publiée, avec pour objectif d'améliorer leur protection (<http://legifrance.gouv.fr>). En 2013, par l'application de cette Directive, la réglementation française évolue encore afin de garantir un plus haut niveau de respect de la sensibilité animale dans le cadre des expérimentations scientifiques (<http://legifrance.gouv.fr>). Dorénavant, le recours aux animaux pour la recherche et l'enseignement est encadré par un important dispositif réglementaire. La France conditionne l'utilisation des animaux à des fins scientifiques à une autorisation préalable du projet par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Cette autorisation s'appuie sur la conformité à la réglementation en vigueur et sur l'avis du Comité d'Éthique (obligatoire) dont dépend l'établissement où sont conduites les études. La démarche éthique permet également de mettre en place des règles de conduite et des recommandations qui contribuent à Réduire le nombre d'animaux utilisés, Remplacer les expériences par des méthodes alternatives et Raffiner les techniques (règle des 3R, Russel et Burch, 1959). Au delà des textes réglementaires, l'utilisation des animaux est également soumise à de multiples pressions. Parmi elles, la pression croissante des citoyens ou des éditeurs scientifiques vis-à-vis de l'éthique en matière d'expérimentation scientifique. Dans ce contexte, le développement de méthodes non-létales apparaît comme indispensable pour les futures études écotoxicologiques, autant du point de vue scientifique que du point de vue éthique.

## 2 Les animaux et le stress

D'un point de vue neurophysiologique, le stress est défini comme l'ensemble des réponses d'un organisme aux contraintes environnementales. L'agent stressant, le « stressor », est l'évènement induisant ces réponses (Romero, 2004). Le stress met en jeu le système nerveux sympathique (par exemple libération d'adrénaline, de noradrénaline...) et le complexe hypothalamo-hypophysaire (cortisol, corticoïdes...) (Figure I.3).

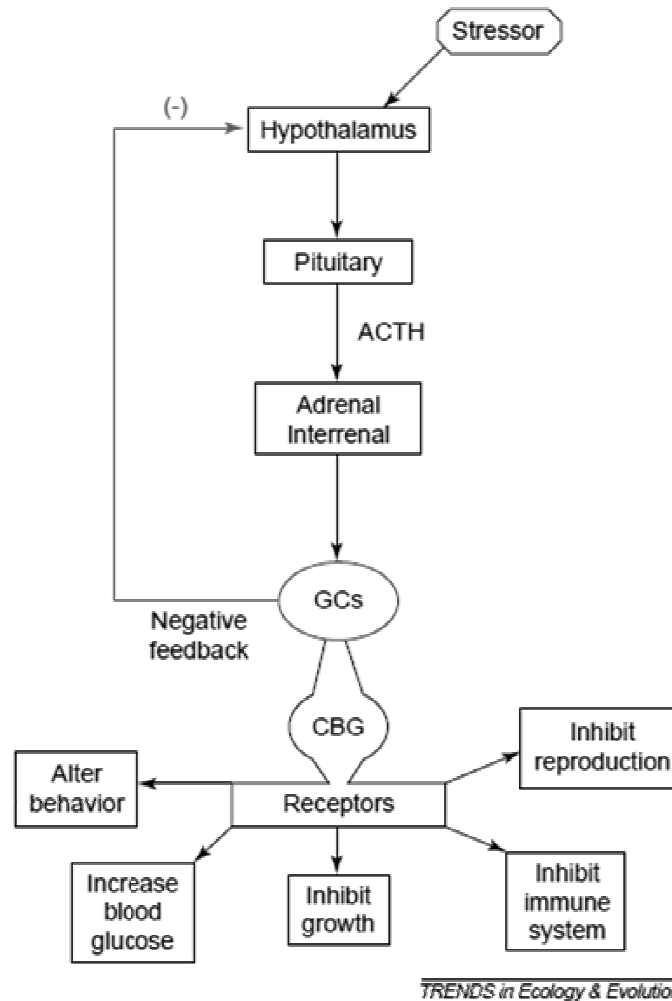


Figure I.3 Cascade des réponses de l'axe hypothalamo-hypophysaire-surrénalien sous l'application d'un stress. (Romero, 2004). Un facteur de stress aigu est détecté par le cortex du cerveau qui envoie un signal neuronal à l'hypothalamus. L'hypothalamus envoie alors un signal hormonal à l'hypophyse (*Pituitary*), qui envoie à son tour un signal hormonal à la glande surrénale (*Adrenal*) ou interrénale (*Interrenal*) (selon l'espèce) pour libérer des glucocorticoïdes (GCs). Les GCs ont de multiples effets qui sont modulés par des protéines transportées dans le sang (transcortine ou *CBG* en anglais) et deux récepteurs différents (de type I et de type II). Une boucle de rétroaction négative se met également en place pour arrêter la libération de GCs. Si le stress persiste et que les GCs restent élevés, la boucle de rétroaction négative cesse de fonctionner et les effets chroniques néfastes causés par les GCs commencent.

Si l'organisme dispose de suffisamment d'énergie, le stress va induire un phénomène de compensation avec un retour à l'équilibre dynamique, l'homéostasie, qui permet le maintien des constantes physiologiques (Romero, 2004). Si le stress dépasse les capacités de retour à l'équilibre dynamique, l'individu rentre dans un état de détresse (Figure I.4). Cet état est notamment rencontré en milieu naturel dans le cas de stress dits « non physiologiques », pour lesquels, la mobilisation des ressources métaboliques est importante (protection de territoire, recherche de partenaire sexuel, résistance au parasitisme...). Dans ce cas, si le stress perdure, une atteinte des fonctions biologiques primaires est observée, induisant des effets potentiels sur la santé de l'organisme.

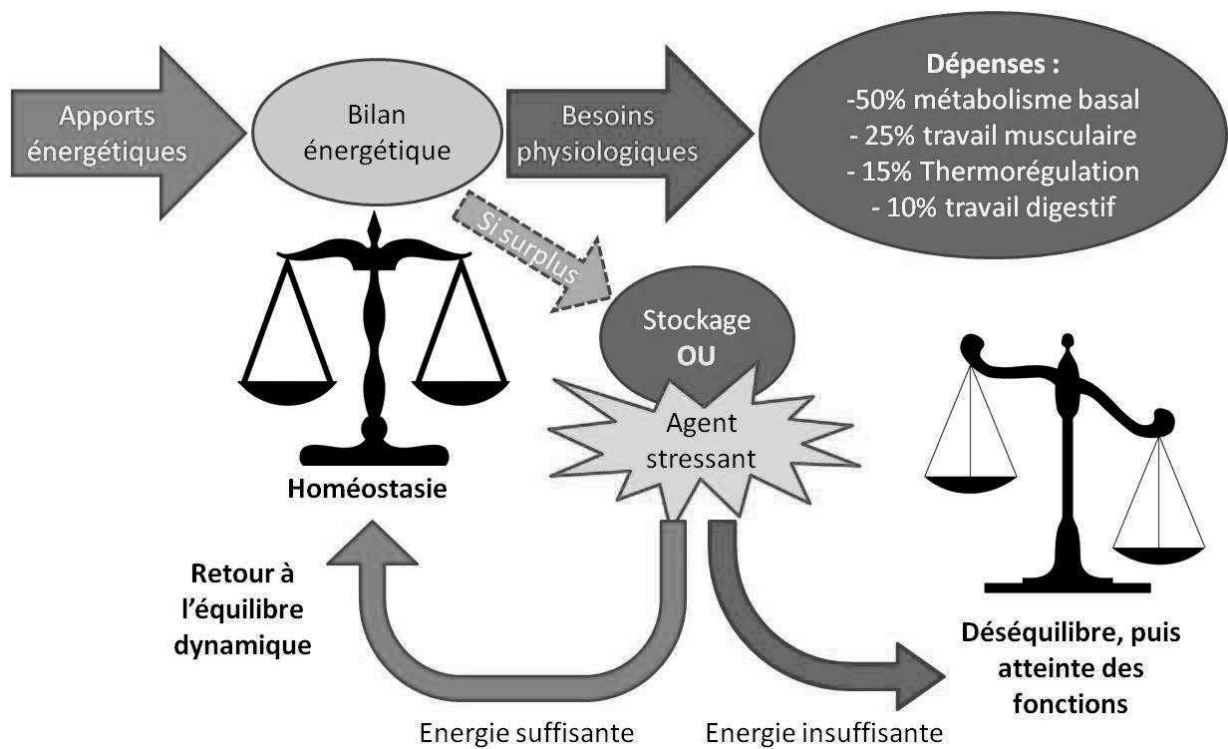


Figure I.4 Schéma simplifié de l'action d'un stress sur l'équilibre homéostatique.

2.1 La pollution aux ETMs

Les éléments traces métalliques (ETMs) sont définis comme des substances non biodégradables, appartenant à la famille des métaux et présentes naturellement en faibles concentrations dans la croûte terrestre (fond pédo-géochimique) (Figure I.5, Shore et Rattner, 2001). Les ETMs sont considérés comme des polluants lorsqu'ils sont mobilisés et concentrés par les activités humaines dans des matrices qui peuvent causer des dommages environnementaux (Shore et Rattner, 2001). Sur certains sites pollués, à cause des activités humaines, les concentrations de certains ETMs ont augmenté de plusieurs ordres de grandeurs. Ceci est principalement dû à l'exploitation de mines et aux activités métallurgiques inhérentes, l'incinération des déchets, l'extraction et la raffinerie et la combustion de pétrole et de gaz (Shore et Rattner, 2001). Certains ETMs, appelés oligo-éléments, sont dits « essentiels » car ils participent à certains processus cellulaires (zinc, magnésium, calcium...). Cependant, lorsque leur apport est inadéquat, l'homéostasie n'est plus respectée, et ces éléments peuvent devenir toxiques à des concentrations excessives. Inversement, ils peuvent provoquer des carences à des concentrations insuffisantes. D'autres ETMs sont dits « non essentiels » car ils ne possèdent pas de fonction biologique connue (sauf à l'état d'ultra-trace pour certains d'entre eux et chez certains organismes). Ils peuvent induire des effets toxiques lorsque leurs concentrations dépassent les capacités d'excrétion ou de détoxification de l'organisme.

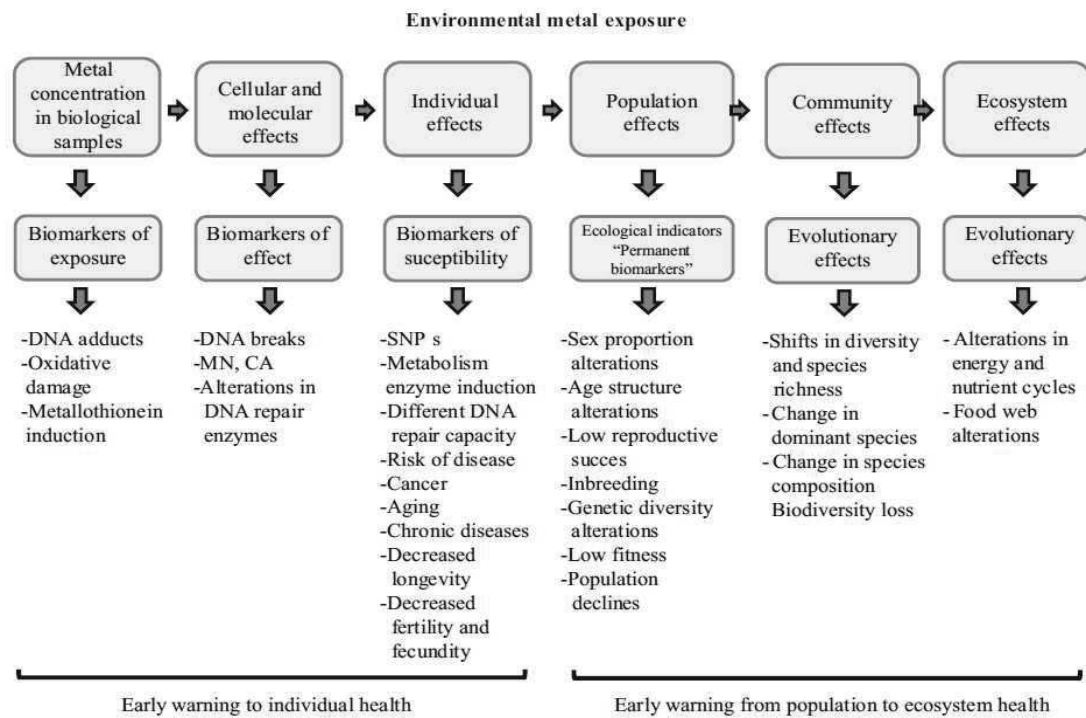
Periodic Table of the Elements

1 H																	2 He
3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
55 Cs	56 Ba	*	72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
87 Fr	88 Ra	**	104 Rf	105 Ha	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Uub	113 Uut	114 Uuq	115 Uup	116 Uuh	117 Uus	118 Uuo
* Lanthanide Series			57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu
** Actinide Series			89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr

Figure I.5 Tableau périodique de Mendeleïev. En rouge sont indiqués les éléments considérés comme les plus toxiques pour l'homme et l'environnement (Source : <http://www.senat.fr/rap/100-261/100-26150.html> - ADEME, retombées atmosphériques des métaux en France).



Les pollutions environnementales en ETMs induisent une multitude de réponses biologiques à tous les niveaux d'organisation biologique, depuis des altérations moléculaires jusqu'à la perte d'intégrité des écosystèmes, en passant par les effets sur la santé des individus. L'impact néfaste des ETMs sur la santé animale est étudié depuis la fin du XVIII<sup>ème</sup> siècle (Calvert, 1876 ; Grinell, 1894). De nombreux signaux d'alerte (« *early-warning signals* » en anglais) ou « biomarqueurs » ont été développés afin de refléter les atteintes biologiques à ces différents niveaux (Bickham et al, 2000; Mussali-Galante et al, 2013). Un biomarqueur est défini comme un changement observable et/ ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant (Lagadic et al, 1997). Certains marqueurs vont informer sur le transfert et l'accumulation de polluants (concentrations dans les organes cibles, dans les fèces et phanères...), d'autres vont donner une indication de la réponse physiologique (libération d'hormones, battements cardiaques, comportement...). Enfin, d'autre marqueurs vont permettre d'évaluer les effets néfastes à plus ou moins long terme (lésions tissulaires, impact sur la reproduction, perte de poids...). Comme les réponses biologiques sont très variées, le type de biomarqueur sélectionné pour une étude va dépendre du niveau d'organisation biologique considéré (Figure I.1, Figure I.6).



**Figure I.6** Biomarqueurs les plus utilisés afin d'étudier les réponses toxiques aux ETMs à différents niveaux d'organisation biologique. MN = Micronuclei, CA = Chromosome Aberrations, SNPs = Single Nucleotide Polymorphisms. (Mussali-Galante et al, 2013).

Le niveau d'organisation va également conditionner l'échelle de temps considérée (de la réponse instantanée, avec les variations de taux hormonaux, à la réponse à long terme avec le développement de pathologies ou le déclin de populations). Plus le niveau d'organisation sera faible, plus le marqueur sera spécifique au toxique étudié et plus les liens de causes à effets entre toxique et réponse observée seront évidents (Figure I.7, Mussali-Galante et al, 2013).

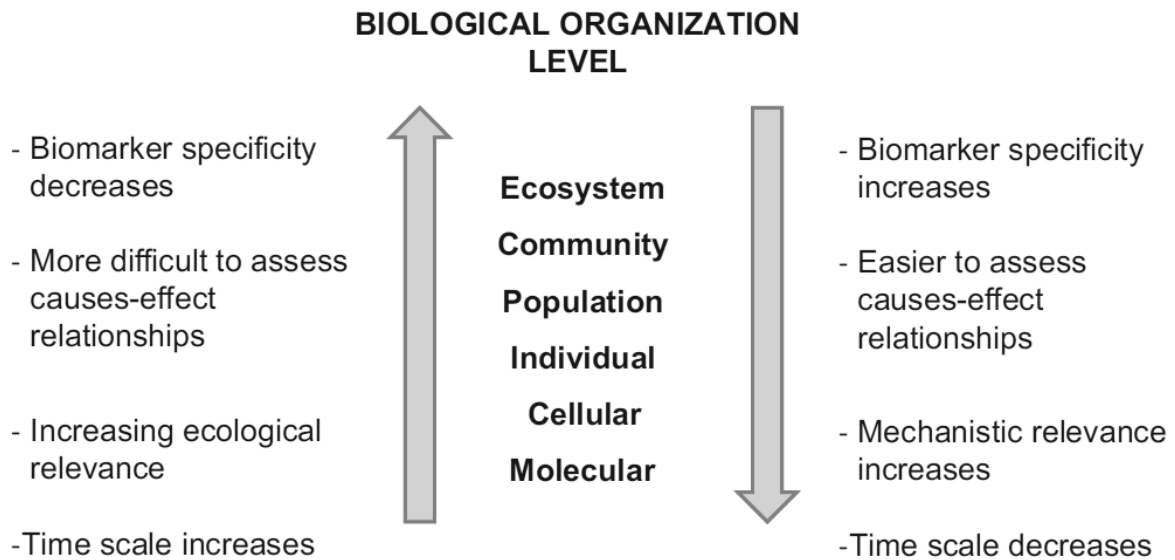


Figure I.7 Spécificités des biomarqueurs à prendre en compte lors de leur utilisation en tant que biomarqueurs d'effets de la pollution en fonction des différents niveaux d'organisation biologiques. (Mussali-Galante et al, 2013)

### 2.1.1 Le cadmium

Parmi les ETMs non essentiels se trouve le cadmium (Cd), un métal blanc et mou, souvent présent en tant qu'impureté dans les minerais d'autres métaux, notamment de zinc (Zn). Ses utilisations principales incluent la production de batteries (70%), la production de pigments (13%), les revêtements de surface (8%), la stabilisation (notamment pour le PVC) (7%) et les alliages (2%). En 1996, Furness estimait que 30 000 tonnes de Cd étaient introduites annuellement dans l'environnement par les activités humaines (Furness, 1996). Dans un environnement non contaminé, les concentrations en Cd dans le sol sont généralement très faibles (< 1µg/g de sol). Lors d'émission de particules de Cd dans l'atmosphère, celles-ci sont retenues et accumulées dans les sols et les plantes, elles peuvent alors être retrouvées dans les écosystèmes terrestres (Shore and Rattner, 2001). Le Cd biodisponible est principalement transféré le long des réseaux trophiques par inhalation et par l'ingestion de nourriture contaminée (Shore and Rattner, 2001). Comme le taux d'excrétion du Cd incorporé dans l'organisme est généralement supérieur à celui de l'ingestion, les mammifères et les oiseaux accumulent le Cd contenu dans leurs ressources alimentaires tout au long de leur vie dans les

organes cibles (foie et reins) (Cooke et Johnson, 1996). Peu d'études ont mis en évidence des effets directs du Cd sur la faune sauvage. Cependant, les principaux effets observés incluent des anémies, des retards de développement des gonades, des gonflements articulaires, un aspect « écailleux » de la peau, une réduction de la croissance ainsi que des dommages aux reins et au foie (Shore and Rattner, 2001). Le rein est d'ailleurs considéré comme l'organe le plus sensible à la toxicité chronique du Cd. Quand les concentrations dépassent certains seuils (compris entre 100 et 200 $\mu$ g/g de masse fraîche chez les mammifères et les oiseaux), les metallothionéines (MTs), protéines liant les métaux et impliquées dans la protection contre la toxicité des ETMs, ne peuvent plus assurer leur fonction et plusieurs pathologies peuvent être observées. Parmi les néphropathies les plus couramment observées, nous pouvons citer la nécrose cellulaire des tubules ou une protéinurie (présence de protéines dans les urines), signe d'un dysfonctionnement rénal (Cooke and Johnson, 1996; Wren et al, 1995).

### 2.1.2 Le plomb

---

Le Pb est un métal gris bleuâtre et malléable naturellement présent dans la croûte terrestre avec une concentration moyenne de 1,6g pour 100kg de sol (Pain, 1995). Même si son utilisation était déjà courante il y a plusieurs millénaires, les concentrations en Pb dans certains milieux urbains contaminés sont aujourd'hui 3 à 4 fois supérieures à celles de l'époque préindustrielle. De plus, les particules de Pb émises dans l'atmosphère peuvent être transportées sur de longues distances et contaminer les milieux ruraux généralement plus éloignés des sources d'émissions (Pain, 1995). Les pollutions importantes en Pb observées aujourd'hui proviennent de son utilisation massive au cours du XX<sup>ème</sup> siècle (dans l'essence, les batteries, les pigments, le calfeutrage et la construction de bâtiments). Dans les années 80, environ 4 millions de tonnes de Pb étaient raffinées annuellement (Eisler, 1988). Les principales sources de contamination pour l'environnement proviennent de l'exploitation minière, de la fonte et du raffinage du Pb et d'autres métaux, de l'émission de gaz d'échappement des véhicules ainsi que des industries impliquées dans la production, l'utilisation ou le recyclage du Pb. Avec les restrictions internationales en matière d'utilisation du Pb, les sources de contamination ont largement été réduites au cours des dernières décennies. Cependant, le Pb déposé dans le sol peut être transféré vers les plantes par absorption racinaire (Rutter and Russell-Jones, 1983). Il est ensuite transféré le long des réseaux trophiques principalement par ingestion d'aliments contaminés dans les écosystèmes terrestres (Shore et Rattner, 2001). Chez les vertébrés, les particules de Pb circulent dans le système sanguin avant d'être déposées dans le foie, les reins ainsi que les os (Shore et Rattner,

2001). Les études menées en laboratoire et sur le terrain ont mis en évidence de multiples effets toxiques chez les mammifères : cécité, atteintes histopathologiques dans le foie et les reins, hémorragies, anorexie, anémie, inhibition de l'activité de la Aminoévolinate Dehydratase (ALAD), réduction de la masse cérébrale (avec apparition de potentielles pathologies), manque de coordination, convulsions, perte de motricité, hyperactivité, troubles du sommeil, effets sur la reproduction (avec une augmentation de la mortalité fœtale) ainsi qu'une diminution de l'espérance de vie (Eisler, 1988; Ma, 1996; Pain, 1995).

## 2.2 Les organismes pathogènes

---

En plus des effets néfastes potentiels induits par la pollution, les animaux sauvages doivent faire face à de nombreux facteurs de stress naturels (parasitisme, fluctuation de la disponibilité des ressources alimentaires, prédation, compétition intra- ou inter-spécifique ou encore variations du climat). La faune est soumise à de multiples maladies dont l'origine peut être infectieuse (virale, bactérienne...) ou parasitaire (protozoaires, nématodes...). Dans ce manuscrit, le terme de parasitisme est utilisé au sens large et inclut l'ensemble des organismes vivant aux dépens d'un ou plusieurs autres organismes (hôtes) dont ils peuvent altérer la santé. Les parasites, peuvent être répartis en trois catégories : les ectoparasites qui vivent à la surface (pou) ou dans l'épiderme (sarcopte) de l'hôte, les mésoparasites qui occupent les cavités naturelles, reliées au milieu extérieur de leur hôte (poumons, tube digestif, vessie, voies génitales) et les endoparasites qui vivent dans des microbiotopes déconnectés du milieu extérieur (organes, système circulatoire et lymphatique, cellules). Afin d'assurer sa pérennité, le parasite est amené à subir des transformations au cours de son cycle biologique. Différents acteurs interviennent au cours de ce cycle : l'hôte définitif (HD) qui héberge la forme adulte ou sexuée du parasite, un ou plusieurs hôtes intermédiaires (HI) potentiels qui hébergent la forme larvaire ou non sexuée (il assure la maturation et/ou la multiplication du parasite), des hôtes facultatifs ou auxiliaires : les vecteurs (agents transmetteurs des parasites), les réservoirs de parasites (hôtes qui hébergent un parasite à potentialité pathogène tout en restant bien portants et qui constituent une source de diffusion du parasite). La contamination des parasites se fait par la voie orale (alimentation), cutanée (et/ou muqueuse), transcutanée (piqûres ou blessures) ou aérienne (inhalation). La diffusion des formes de résistance et/ou de contamination se fait par les voies digestive, urinaire, aérienne ou cutanée (y compris muqueuses). La transmission des parasites est dépendante de nombreux facteurs biotiques (âge ou sexe des animaux, prédisposition génétique, densité de population, présence de

vecteurs, ressources alimentaires...) et abiotiques (climat, qualité de l'habitat...) (Figure I.8, Meerburg et al, 2009).

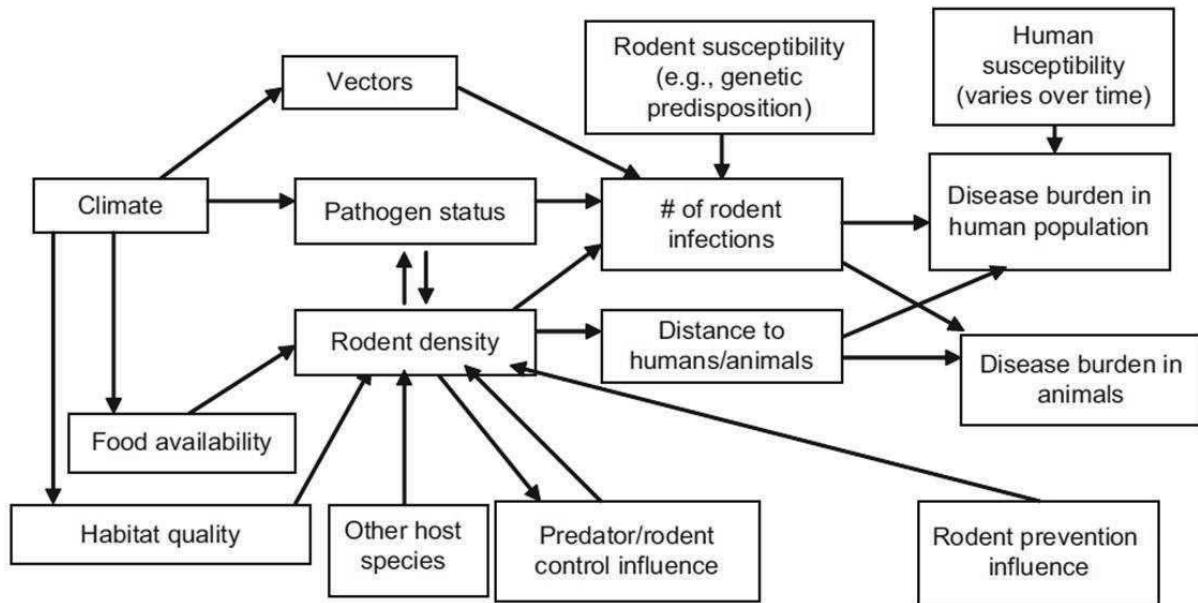


Figure I.8 Modèle simplifié présentant les multiples facteurs qui peuvent intervenir dans la transmission des parasites chez les rongeurs (Meerburg et al, 2009).

Le parasitisme constitue un facteur important de régulation chez les populations de mammifères sauvages (Borgsteede, 1996). Selon le type de parasite considéré, les effets sur la santé animale peuvent être divers et, en fonction de leur virulence, les parasites peuvent provoquer une mort directe ou indirecte des individus, modifier les comportements ou provoquer un large panel de symptômes plus ou moins graves (Borgsteede, 1996). Parmi les parasites, les maladies infectieuses sont la deuxième cause de mortalité humaine dans le monde et environ les deux tiers d'entre elles sont des zoonoses (définies comme des maladies transmissibles à l'homme par les animaux) (Cleaveland et al, 2001; OMS, 2013). Par leur capacité à se propager dans les populations humaines (grippe, choléra) ou à se maintenir dans des réservoirs animaux (fièvre hémorragique, peste porcine), les zoonoses ont un impact significatif sur la santé publique, l'agriculture et la faune sauvage (Cleaveland et al, 2001; Daszak et al, 2001; Kruse et al, 2004). En France, ces maladies sont responsables de 5 % des décès humains chaque année (Institut national de veille sanitaire, InVS, 2012). La liste nationale des zoonoses prioritaires, potentiellement transmises par les rongeurs, comprend la brucellose, l'hydatidose, la leptospirose, la maladie de Lyme, la fièvre Q, la tularémie, les infections par des hantavirus, la rage, la toxoplasmose et la fièvre du Nil occidental (InVS, 2012). Ces zoonoses sont considérées soit comme les plus largement répandues, soit comme ayant une incidence élevée sur la mortalité ou provoquant des coûts élevés pour le système de

santé publique en raison de leur prévention ou de leur traitement (Epstein et al, 2009). L'étude des prévalences, chez la faune sauvage, des pathogènes responsables de zoonoses apparaît donc comme une priorité afin d'anticiper et de limiter la transmission de ces maladies chez les humains.

### 2.3 Interactions entre différents stress

---

Lorsque certains individus vivent dans des conditions défavorables (dégradations environnementales, stress anthropiques), l'énergie allouée aux fonctions biologiques primaires est plus faible (Figure I.4). Elle peut potentiellement conduire à une plus faible immunocompétence, une baisse de la condition physique et donc à une fitness (définie comme la capacité à transmettre ses gènes) plus faible (Beldomenico et al, 2008; Borgsteede, 1996; Møller et al, 2000; Pedersen et Greives, 2008). Comme les défenses antiparasitaires sont liées à l'efficacité du système immunitaire et à la condition physique, ces facteurs de stress supplémentaires peuvent augmenter la susceptibilité d'être infecté ou co-infecté par plusieurs parasites (Beldomenico et al, 2008; Borgsteede, 1996). En outre, comme dans un cercle vicieux, une mauvaise condition physique prédispose l'hôte à de nouvelles infections ce qui réduit par la suite encore plus sa condition physique et ainsi de suite (Beldomenico et al, 2008; Borgsteede, 1996).

Dans un contexte d'étude intégrée, il est nécessaire de prendre en compte l'ensemble des stress qui peuvent interagir ensemble et donc jouer un rôle important sur la réponse des animaux face aux pollutions en ETMs. A ce jour, peu d'études ont permis d'étudier les interactions entre la pollution et les prévalences parasitaires chez la faune sauvage terrestre. La plupart des études portant sur les interactions entre le parasitisme et la pollution ont été réalisées sur la faune aquatique (Sures, 2004, 2007). Sures et al (1999) ont estimé qu'il existait approximativement entre 130 et 150 travaux publiés depuis les années 80 concernant les interactions entre parasites et pollution, et que la large majorité d'entre eux concernait les écosystèmes aquatiques. Les mécanismes sous-jacents qui relient la pollution et les infections parasitaires ne sont toujours pas bien compris et plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer comment la pollution pouvait influencer le parasitisme (Lafferty, 1997). D'une part, l'exposition aux polluants, connus pour avoir des effets immunotoxiques (Krzystyniak et al, 1995), tels que certains ETMs (Cd, Pb...), peut réduire l'immunocompétence et accroître la prévalence et/ou la richesse parasitaire chez les hôtes (Sures 2004, 2007). D'autre part, certaines études montrent un effet négatif sur la diversité parasitaire dans certains écosystèmes soumis à diverses pollutions (King et al, 2010; Lafferty, 1997). Parmi les travaux

résumés dans la synthèse de Sures (2004) (Figure I.9), certains montrent que les effets de la pollution sur les populations et les communautés sont variés (augmentation, diminution, pas d'effet observé). De plus, ces relations pollution-parasitisme apparaissent comme dépendantes du groupe de parasite considéré, des hôtes impliqués et du type de pollution ou de contamination étudiée (Sures, 2004). Il apparaît que malgré un nombre croissant de travaux publiés sur les interactions pollution-parasitisme, dans les écosystèmes aquatiques, il est aujourd'hui toujours difficile de prédire comment la pollution interagit avec les prévalences ou les communautés parasitaires chez les hôtes concernés. De plus, la majorité des travaux ont été réalisés sur des écosystèmes aquatiques et il semble donc difficile de généraliser les concepts et hypothèses décrites dans ces travaux aux écosystèmes terrestres.

Parasite group	Host	Pollution/contamination	Effect on parasites	Ref.
Component community	<i>Perca fluviatilis</i> (perch)	Acidification	Reduced parasite diversity	[27]
<i>Gyrodactylus</i> sp.	<i>Hippoglossoides platessoides</i> (American plaice)	Contaminated sediments	Higher abundance	[28]
<i>Trichodina</i> sp.	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Contaminated sediments	Decrease	[28]
Intestinal digeneans	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Contaminated sediments	No effect	[28]
Trichodinid ciliates	<i>Platichthys flesus</i>	Eutrophication	Increase in prevalence and density	[29]
Trichodinid ciliates	<i>Platichthys flesus</i>	Eutrophication, general marine pollution	Increase in abundance and intensity	[30]
Component community	<i>Rutilus rutilus</i> (roach) and <i>Perca fluviatilis</i>	Eutrophication	Increase in parasite richness	[31]
Parasite community of snails	<i>Physella columbiana</i> (rotund physa) and <i>Lymnaea palustris</i> (marsh snail)	Heavy metals	Lower diversity and intensity	[32]
Acanthocephalans	<i>Tautoglabrus adspersus</i> (cunner)	Municipal and industrial effluents	Increase in prevalence and intensity	[33]
Trichodinid ciliates	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (three-spined stickleback)	Organic pollution	Increase in density	[34]
Component community	<i>Leuciscus cephalus</i> (chub)	Organic pollution	Decrease in species richness	[35]
Component community	<i>Sigmodon hispidus</i> (cotton rat)	Petrochemicals	Decrease in number of helminth species	[36]
Dactylogyrids	<i>Rutilus rutilus</i>	Pulp and paper mill effluent	Reduced abundance and mean number of species	[37]
<i>Rhipidocotyle fennica</i> (Digenea)	<i>Rutilus rutilus</i>	Pulp and paper mill effluent	Higher abundance and intensity	[38]

Figure I.9 Effet de la pollution sur les populations ou communautés de parasites (Sures, 2004).

En milieu terrestre les quelques travaux réalisés concernant les interactions entre pollution et parasitisme ont montré des résultats contrastés. Tersago et al (2004) ont, par exemple, trouvé une relation positive entre le nombre de nématodes présents dans l'intestin grêle du mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*, Linné, 1758) et les concentrations en Cd dans le foie. De même, Halbrook et al (1993) ont montré que les prévalences de *Taenia taeniaeformis* chez les rats musqués étaient plus élevées dans les populations habitant un site contaminé par un mélange de polluants que chez les populations provenant d'un site non contaminé. A l'inverse, Faulkner et Lochmiller (2000) ont observé une plus faible abondance et une diminution de la richesse de la communauté d'helminthes chez les rats du coton (*Sigmodon hispidus*) habitant un site contaminé par des produits pétrochimiques par rapport à ceux provenant du site témoin.

## 2.4 L'influence du paysage sur la réponse des animaux face aux stress

---

Les modifications du paysage peuvent aussi avoir de nombreuses conséquences sur la santé des organismes sauvages. Ces conséquences peuvent être directes ou indirectes et peuvent se répercuter à différents niveaux d'organisation biologique : à l'échelle de la communauté avec, par exemple, la destruction de milieu ambiant à cause des feux de forêts (Zwolak, 2009), à l'échelle de la population avec les inondations saisonnières de certains cours d'eau, ou encore à l'échelle individuelle, lorsque la diminution en ressources alimentaires impacte la santé des animaux (Marchand et al, 2003). Les changements d'occupation des sols, la destruction des habitats et la fragmentation liés aux activités humaines peuvent aussi influencer les dynamiques de population, les mouvements des animaux, la structure génétique des populations, ainsi que la transmission de parasites chez les rongeurs (Allan et al, 2003; Deter, 2007; Heyman et al, 2009). Les paramètres paysagers jouent notamment un rôle important en épidémiologie chez les animaux sauvages (notamment sur les interactions hôtes-pathogènes) (Meerburg et al, 2009) qui est parfois difficile à distinguer des autres facteurs environnementaux. L'impact des activités anthropiques sur le paysage (changement d'occupation des sols, déforestation, modification des pratiques agricoles, urbanisation) peuvent interagir avec les prévalences de certaines maladies chez la faune sauvage (Bradley et Altizer, 2007; Cutler et al, 2010; Daszak et al, 2001; Patz et al, 2000, 2004). Ces facteurs peuvent également agir sur la composition et la dynamique des populations animales et ainsi influencer la transmission d'agents infectieux (Daszak et al, 2001; Giraudoux et al, 2007, 2008).

D'un point de vue écotoxicologique, les paramètres paysagers peuvent moduler l'exposition et donc l'accumulation et les effets des polluants sur la faune sauvage (Smith et al, 2007). Dans les paysages hétérogènes, la durée, la fréquence et l'intensité de l'exposition peut varier spatialement car le temps passé par les animaux dans un milieu va varier avec l'occupation du sol (Fritsch, 2010). De plus, en fonction des types paysagers dans lesquels ils se trouvent, les animaux modifient leur comportement, leurs mouvements, ainsi que leur régime alimentaire. Ces différences vont moduler l'exposition et donc induire une accumulation différentielle en polluants dans les organes cibles en fonction du paysage. Plusieurs travaux ont par exemple démontré l'influence de la composition du paysage sur les relations entre contaminations environnementales et contaminations internes chez les rongeurs (Fritsch et al, 2010a; Marcheselli et al, 2010; van den Brink et al, 2008; Wijnhoven et al, 2007). Les résultats d'une étude menée par van den Brink (van den Brink et al, 2008) ont



également montré que si les concentrations environnementales à elles seules n'expliquaient que peu les concentrations internes mesurées chez les animaux, la répartition des différents types d'habitats, la structure du paysage et le domaine vital des animaux modulaient largement les concentrations dans les organes analysés.

### 3 Le modèle d'étude: le mulot sylvestre

---

#### 3.1 Utilisation des rongeurs en écotoxicologie

---

Pour répondre aux multiples questions concernant le devenir et les effets des polluants au sein des écosystèmes, de nombreux modèles biologiques sont utilisés en écotoxicologie. Un modèle d'étude et, plus précisément un bioindicateur, est défini comme un « dispositif destiné à collecter, systématiquement et régulièrement, des données sur des animaux exposés à la pollution environnementale. Ces données sont ensuite analysées pour identifier les dangers potentiels pour la santé de l'homme et de l'environnement » (selon le National Research Council, 1991). A la différence des animaux sentinelles où l'un des seuls critères retenus est la plus ou moins grande abondance d'individus, le bioindicateur fait appel à la variation de paramètres aux niveaux moléculaire, cellulaire ou tissulaire. En écotoxicologie, les modèles biologiques ont été choisis dans de nombreux taxons et, en écotoxicologie terrestre, les micromammifères sont largement utilisés. Ceci provient de leur utilisation massive en toxicologie humaine mais ce choix est également motivé par plusieurs autres facteurs. En tant que vertébrés, les rongeurs ont un métabolisme proche de celui des humains. De par leur proximité génétique avec les humains (90% du patrimoine génétique est partagé entre les souris de laboratoire et les humains), les souris (originellement issues de l'espèce *Mus musculus*) sont en effet largement utilisées afin de prévoir les effets curatifs ou toxiques de nombreuses molécules pharmacologiques lors de leur mise sur le marché. De plus, le choix des rongeurs dans de nombreuses études scientifiques est également motivé par des raisons financières et techniques. En effet, lors du choix des modèles biologiques, il est indispensable de prendre en compte les difficultés liées à la capture, à la maîtrise de l'élevage (besoin biologiques des animaux), à la maîtrise des lignées, à l'effectif nécessaire, aux difficultés liées à la contention lors des manipulations, etc.

D'après les résultats obtenus dans le cadre d'études précédemment réalisées sur le site de Metaleurop Nord (site d'étude de la présente thèse), les espèces de micromammifères les plus abondantes sont le mulot sylvestre et le campagnol roussâtre (*Clethrionomys glareolus*), ainsi que la crocidure musette (*Crocidura russula*) et la musaraigne carrelet (*Sorex araneus*) (Fritsch, 2010). De par son abondance et ses caractéristiques biologiques et écologiques, le modèle biologique retenu dans le présent projet est le mulot sylvestre (Figure I.10).



Figure I.10 Modèle d'étude retenu, le mulot sylvestre (Crédits photos, <http://www.genera.hr>).

### 3.2 Biologie et écologie du mulot

Le mulot sylvestre est un rongeur de la famille des Muridés et de la sous-famille des Murinés. C'est une des espèces les plus anciennes de mammifères établies en Europe, dont l'installation est antérieure aux glaciations quaternaires (Butet et Paillat, 1997). De ce fait, cette espèce est largement distribuée dans tout le continent eurasiatique à l'exception du nord de la Scandinavie. En France, elle est présente sur l'ensemble du territoire, y compris la Corse et les îles proches des côtes (Butet et Paillat, 1997). D'un point de vue morphologique, le mulot sylvestre est discernable d'une souris par sa taille et son poids moyen plus élevés, environ 23 g pour 88 mm (tête et corps inclus) (Butet et Paillat, 1997). Le dimorphisme sexuel entre mâle et femelle est peu marqué, mais, à âge égal, les femelles sont légèrement plus petites que les mâles. Le sevrage des nouveaux nés a lieu à un mois, pour un poids avoisinant les 10 g et une longueur de 60 mm et l'arrêt de croissance se situe entre 7 et 9 mois (Saint-Girons, 1966, 1967).

Le mulot sylvestre constitue l'espèce ubiquiste par excellence, avec la valence écologique la plus développée au sein des rongeurs (Orsini, 1981). De nombreux auteurs ont souligné la diversité des milieux qu'il peut fréquenter (Khidas, 1993; Saint-Girons, 1973; Spitz, 1974; Zejda, 1965). Il est entre autre considéré comme l'espèce pionnière des milieux nouvellement créés (Dickman et Doncaster, 1989; Halle, 1993). Le mulot utilise l'hétérogénéité de l'espace en fonction des disponibilités en ressources alimentaires (Angelstam et al, 1987; Montgomery et al, 1991). Ses préférences en termes d'habitat peuvent donc varier au cours de l'année (forêts, haies, milieux agricoles, friches herbacées...). Le mulot sylvestre peut également être rencontré dans les habitats largement anthropisés, même s'il est moins commensal que la souris commune. Cette espèce est considérée comme strictement nocturne et vit la majeure partie du temps dans des terriers dans lesquels il stocke des réserves de nourriture. La forme et

la taille du domaine vital varient largement et dépendent de trois paramètres principaux : l'agencement de la végétation, la topographie et la répartition des ressources alimentaires (Saint-Girons, 1960). Le mulot sylvestre est principalement granivore (Butet, 1986; Hansson, 1985; Montgomery, 1989). Cependant, il n'est pas rare d'observer dans les contenus digestifs des restes d'animaux (lombrics, escargots, araignées, myriapodes, insectes...) et végétaux (Obrtel et Holisova, 1979). Certains cas exceptionnels de prédation sur des oisillons ou encore des cas de cannibalisme ont également été démontrés (Bailey, 1970; Obrtel, 1975).

Le *sex-ratio* semble toujours légèrement décalé en faveur des mâles, entre 53 et 60% selon les études (synthèse bibliographique dans Butet et Paillat, 1997). La reproduction est maximale entre juin et juillet et comprend 2 à 9 jeunes par portée, en moyenne 4,5. Au printemps, les populations de mulots sylvestres sont donc principalement composées d'adultes puis, au cours de l'été, les classes de juvéniles, sub-adultes et adultes tendent à s'équilibrer (Butet et Paillat, 1997). Les densités maximales sont observées en milieu forestier (jusqu'à 50 ind/ha) mais certaines valeurs extrêmes ont déjà été observées (100 ind/ha) lorsque le mulot n'entre pas en compétition avec d'autres espèces (Jamon, 1986; Montgomery, 1980; Watts, 1969). L'espérance de vie se situe entre 2 et 4 mois et la durée de vie maximale est de 12 à 15 mois, les mulots ne pouvant apparemment pas supporter plus d'un hiver (Jamon, 1986; Kolcheva, 1986). La prédation par les rapaces nocturnes et les petits carnivores semble être la première cause de mortalité de l'espèce.

Le mulot apparaît comme une espèce porteuse de nombreux parasites, notamment des parasites digestifs et des ectoparasites, tels que les puces, poux et tiques. Gilot (1985) note la présence de diverses espèces de tiques appartenant au genre *Ixodes*, impliquées dans la dissémination de nombreuses zoonoses. D'un point de vue épidémiologique, le mulot sylvestre constitue donc un hôte potentiel de pathogènes et, comme de nombreux rongeurs, il est impliqué dans la transmission de zoonoses éventuellement graves pour l'homme. Il a notamment été décrit comme porteur de plusieurs maladies bactériennes transmises par les tiques, la fièvre Q, l'anaplasiose ou encore la maladie de Lyme, transmissibles à l'homme (Barandika et al, 2007).

Parmi les rongeurs utilisés en écotoxicologie, de nombreuses études menées en Europe ces dernières décennies ont utilisé le mulot sylvestre comme modèle biologique. Cette utilisation massive du mulot en tant que bioindicateur s'explique par le fait qu'il soit largement répandu en Europe, omnivore et abondant dans la nature (Rogers and Gorman, 1995), mais également grâce à la sensibilité qu'il présente face aux perturbations anthropiques telles que la pollution (e.g. Rogival et al, 2006, Sanchez-Chardi et al, 2007, Scheirs et al, 2006, Tersago et al, 2004).

Le mulot constitue un taxon qui réagit aux perturbations anthropiques et qui est impliqué dans la transmission de certaines zoonoses à l'homme, il apparaît donc comme un modèle biologique pertinent pour le présent projet.

## 4 Accumulation des ETMs et réponses des mulots

### 4.1 Marqueurs d'accumulation des ETMs

Un des tests les plus simples consiste à mesurer la concentration d'un (ou plusieurs) polluant(s) dans les tissus d'animaux capturés *in situ* (le long d'un gradient de contamination par exemple). Ces concentrations dites « internes » peuvent être comparées à des valeurs toxicologiques de référence (Shore and Douben, 1994a, 1994b). Dans le cas du Cd et du Pb, les organes cibles dans lesquels les concentrations sont le plus couramment mesurées sont le foie et les reins (Shore and Douben, 1994a, 1994b). Pour le Cd, les concentrations moyennes ou médianes les plus élevées recensées dans la littérature chez le mulot sont de  $31,4 \pm 7,0$   $\mu\text{g/g}$  (Beernaert et al, 2007) et  $41,4 \pm 12,0$   $\mu\text{g/g}$  (Scheirs et al, 2006) dans le foie, et de  $30,9$   $\mu\text{g/g}$  [13,3 – 136,7] (Fritsch et al, 2010b) et  $135,7 \pm 26,9$   $\mu\text{g/g}$  (Scheirs et al, 2006) dans les reins. Dans le cas du Pb, les concentrations les plus élevées rapportées dans la littérature sont de  $3,9$   $\mu\text{g/g}$  [0,3 – 14,4] (Fritsch et al, 2010b) et  $6,08 \pm 2,2$   $\mu\text{g/g}$  (Tersago et al, 2004) dans le foie et de  $39,7$   $\mu\text{g}$  [9,9 – 149,5] (Fritsch et al, 2010b) dans les reins.

Comme vu précédemment, il est nécessaire de développer des méthodes alternatives, non létales et peu intrusives en écotoxicologie. Malgré l'intérêt que représentent les phanères (ongles, griffes, poils, plumes...) ou les déjections des animaux en tant que marqueurs d'accumulation, peu d'études ont été réalisées sur ces matrices. Chez le mulot, seulement deux travaux ont cherché à évaluer l'utilisation des poils en tant qu'estimateurs des concentrations internes (Marcheselli et al, 2010; Beernaert et al, 2007). Les résultats sont présentés dans le Tableau I.1.

**Tableau I.1 Coefficient de détermination entre les concentrations en Cd et Pb dans les poils des mulots et celles dans le foie et les reins.**

	Cd		Pb		<i>n</i>	Statistique	Référence
	Foie	Reins	Foie	Reins			
Poils	$p < 0.01$ $R^2 = 0,69$	$p < 0.01$ $R^2 = 0,61$	$p < 0.01$ $R^2 = 0,32$	$p < 0.01$ $R^2 = 0,38$	26	Pearson	Marcheselli et al (2010)
	$p < 0.001$ $R^2 = 0,30$	$p < 0.001$ $R^2 = 0,45$	$p < 0.001$ $R^2 = 0,31$	$p < 0.001$ $R^2 = 0,44$	98	Fisher	Beernaert et al (2007)

## 4.2 Marqueurs d'effets des ETMs

---

Divers biomarqueurs ont également été développés afin d'évaluer les effets des polluants métalliques sur la santé des animaux. Le choix des marqueurs va dépendre du type de polluant considéré, de son action (cinétique ou à un temps donné), ou du niveau d'organisation biologique considéré. Le Tableau I.2 résume l'ensemble des biomarqueurs qui ont été étudiés chez le mulot sylvestre dans un contexte de pollution aux ETMs. Parmi ces biomarqueurs certains se situent :

- au niveau moléculaire, avec l'étude des dommages génétiques (Lourenço et al, 2013; Sanchez-Chardi et al, 2007; Scheirs et al, 2006),

- au niveau cellulaire, avec l'étude des concentrations en métallothionéines (Fritsch et al, 2010b; Rogival et al, 2007a), de paramètres hématologiques (Rogival et al, 2006; Sanchez-Chardi et al, 2007; Topashka-Ancheva et al, 2003) ou d'atteintes immunologiques (Tersago et al, 2004),

- au niveau tissulaire, avec l'étude des altérations histologiques (Martiniaková et al, 2010; Sanchez-Chardi et al, 2009a) ou des indices somatiques (Sanchez-Chardi et al, 2007; Tersago et al, 2004),

- au niveau individuel, avec l'étude du statut nutritionnel ou de la condition corporelle (González et al, 2008; Sanchez-Chardi et al, 2007),

- au niveau populationnel, avec l'étude de la diversité génétique (Berckmoes et al, 2005) ou de la structure de la population (Dmowski et al, 1995).

Parmi ces biomarqueurs, les indices de condition corporelle/physique et les indices somatiques sont déjà largement utilisés dans le domaine de l'écologie (Green, 2001; Schulte-Hostedde et al, 2005). La condition physique est généralement définie comme une mesure de l'état énergétique ou nutritionnel d'un animal (Green, 2001; Schulte-Hostedde et al, 2001) et elle permet une évaluation rapide et non intrusive de l'état de santé global des individus (Stevenson et Woods, 2006). Peu d'études ont évalué la variation de la condition physique dans un contexte écotoxicologique et les résultats sont contrastés. Une étude a montré que des mulots habitant une décharge contaminée en ETMs présentaient une diminution de l'indice de condition physique (Sanchez-Chardi et al, 2007). A l'inverse, pas de différence de condition corporelle n'a été observée entre des souris (*Mus spretus*) prélevées sur un site pollué aux ETMs et sur un site témoin (Nunes et al, 2001). D'autres études menées sur différentes espèces de micromammifères ont également montré des différences significatives d'indices

somatiques (masse relative d'un organe par rapport à la masse totale de l'individu) entre individus capturés sur des sites témoins et des sites contaminés (Fritsch, 2010; Sanchez-Chardi et al, 2009b). Ces résultats montrent généralement une augmentation de la masse relative des organes tels que le foie ou les reins sur les zones polluées par rapport aux zones témoins, suggérant des altérations dans ces tissus (Ma, 1989; Milton et al, 2003; Sanchez-Chardi et al, 2007, 2009b). Cependant, ces résultats sont contrastés car certaines études ont montré une diminution des indices somatiques (Nunes et al, 2001) ou n'ont pas pu établir de lien avec la pollution (Pereira et al, 2006).

Les marqueurs histopathologiques permettent de détecter un effet toxique au niveau tissulaire et (sub)cellulaire. Des coupes histologiques de foie et de reins de micromammifères (rongeurs, insectivores) capturés sur des sites pollués et témoins ont montré des altérations de ces tissus, en lien avec l'exposition aux polluants métalliques (Sanchez-Chardi et al, 2008, 2009a, 2009b). Certains paramètres hématologiques, issus de prélèvements non létaux et peu intrusifs, sont également considérés comme des marqueurs précoces d'effets toxiques des ETMs (Rogival et al, 2006). Plusieurs études ont déjà indiqué des changements hématologiques chez des animaux de laboratoire (Bersenyi et al, 2003; Friberg et al, 1986; Hiratsuka et al, 1996) et chez des micromammifères sauvages (Gorriz et al, 1996; Nunes et al, 2001) exposés à des ETMs. Même si ces réponses peuvent varier en fonction de certains facteurs biotiques, tels que l'âge, le sexe ou des différences génétiques (Biser et al, 2004; Miller, 1996), le comptage des érythrocytes donne une indication générale de l'état de santé d'un individu (Tersago et al, 2004). De même, les mesures d'hématocrite et d'hémoglobine sont considérées comme des mesures de la capacité de transport de l'oxygène dans le sang (Tersago et al, 2004), et le changement du nombre de leucocytes peut être interprété comme une résistance non spécifique à certaines maladies (Rogival et al, 2006).



**Tableau I.2 Principaux biomarqueurs utilisés et effets observés dus aux ETMs rapportés dans la littérature (présentées anti-chronologiquement) pour *A. sylvaticus*. Ag = Argent, Al = Aluminium, As = Arsenic, Be =, Cr = Chrome, Co = Cobalt, Cu = Cuivre, Fe = Fer, Hg = Mercure, Mg = Magnésium, Mn = Manganèse, Mo = Molybdène, Ni = Nickel, Sr = Strontium, U = Uranium, Zn = Zinc.**

ETMs analysés	Effets étudiés	Biomarqueurs utilisés	Effets observés chez les mulots contaminés	Références
Al, Be, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb, Sr, U, Zn	Dommmages génétiques	Test des comètes Expression génétique Polymorphisme nucléotidique	Perte d'intégrité de l'ADN Surexpression d'un gène impliqué dans l'apoptose cellulaire Polymorphisme rencontré chez 2 mulots sur 5	Lourenço et al (2013)
Cd, Pb, Zn, Cu	Capacité de séquestration des ETMs	Concentration de metallothionéine	Augmentation avec concentrations en Cd dans le sol et le foie	Fritsch et al (2010b)
Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn	Allérations histologiques	Longueur et masse du fémur Coupe histologique du fémur	Augmentation longueur et masse sur site pollué Pas d'altération histologique observée	Martiniaková et al (2010)
Cd, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Pb, Zn	Allérations histologiques	Coupe histologique de gonade, glande surrénale, rein, poumon, oesophage, rate, foie, intestin et pancréas	Augmentation des altérations histologiques dans le foie et les reins	Sanchez-Chardi et al (2009a)
Cu, Mn, Zn	Statut nutritionnel	Indice de masse corporelle	Diminution avec le Cu dans les reins	González et al (2008)
Cd, Cu, Zn	Capacité de séquestration des ETMs	Concentration de metallothionéine	Augmentation avec concentrations en Cd et Zn	Rogival et al (2007a)
Cd, Cr, Cu, Fe, Hg, Mg, Mn, Mo, Pb, Zn	Condition physique Atteinte des organes Hématologiques Dommmages génétiques	Indice de masse corporelle Indices somatiques du foie et des reins Paramètres plasmatiques Test des micronoyaux d'érythrocytes	Pas de variation Pas de variation Augmentation de certains paramètres plasmatiques et de la fréquence des micronoyaux sur les sites pollués	Sánchez-Chardi et al (2007)
Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn	Hématologie	Hématocrite Hémoglobine Comptage globules rouges et blancs Activité de la lysozyme	Diminution de l'hématocrite Pas de variation des autres paramètres	Rogival et al (2006)
Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Pb, Zn + composés organochlorés	Dommmages génétiques	Test des comètes	Dommmages génétiques supérieurs chez les animaux capturés autour de la source de pollution	Scheirs et al (2006)
Ag, As, Cd, Cu, Pb	Diversité génétique d'une population	Microsatellites ADN	Pas de différence de diversité entre populations sur site pollué et témoin	Berckmoes et al (2005)
Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	Immunotoxicité	Comptage d'endo- et ecto-parasites Masse de la rate	Augmentation de la présence de certains parasites Augmentation de la masse de la rate	Tersago et al (2004)

## I. Introduction générale

Cu, Cd, Pb, Zn	<p>Hématologie</p>	<p>Comptage globules rouges et blancs            Activité de la lyzosome            Apoptose des globules blancs</p> <p>Comptage globules rouges et blancs            Morphologie des érythrocytes</p>	<p>Diminution des globules rouges            Apoptose précoce supérieure</p> <p>Pas de variation des comptages            Apparition de granulations basophiles dans les érythrocytes</p> <p>Topashka-Ancheva et al (2003)</p>
Cu, Mn, Se, Zn	<p>Défences antioxydantes</p>	<p>Activité enzymatique</p>	<p>Pas de variation</p> <p>Lopes et al (2002)</p>
Cd, Pb, Zn	<p>Structure de population</p>	<p>Densité d'individus capturés</p>	<p>Densités augmentent sur site pollué</p> <p>Dmowski et al (1995)</p>

#### 4.3 Facteurs de variabilité dans les réponses aux stress du mulot

---

De nombreux paramètres peuvent moduler l'accumulation et la réponse des animaux face aux stress rencontrés. Les caractéristiques individuelles (sexe, âge, statut nutritionnel, diversité génétique, expression phénotypique...) et les facteurs environnementaux (propriétés physico-chimiques des sols, dégradation des habitats, fragmentation paysagère, variation des ressources alimentaires...) peuvent notamment jouer un rôle important sur l'accumulation et les réponses aux stress. Dans le cadre d'une approche intégrée, ces paramètres doivent être pris en compte afin d'améliorer les prédictions entre les concentrations d'un polluant et les effets néfastes potentiels observés sur la santé des modèles étudiés.

De nombreuses études ont tenté de relier les concentrations internes en polluants avec les concentrations dans les horizons supérieurs du sol (Beernaert et al, 2007; Fritsch et al, 2010b; Gonzales et al, 2008; Lopes et al, 2002; Sanchez-Chardi et al, 2009b; van den Brink et al, 2010). Même si les concentrations dans les sols semblent partiellement gouverner les teneurs dans les organes cibles, une large partie de la variabilité des concentrations internes observées n'est pas expliquée par les concentrations environnementales. Tout d'abord, les propriétés du sol et les caractéristiques paysagères peuvent affecter la biodisponibilité des ETMs (Bradham et al, 2006; Fritsch et al, 2010a; Marcheselli et al, 2010; Spurgeon et al, 2006; van den Brink et al, 2008; Wijnhoven et al, 2007), ce qui affecte l'exposition de la faune sauvage. Les variables individuelles des modèles biologiques étudiés, telles que l'âge et le sexe, peuvent également influencer le transfert et l'accumulation des ETMs. Plusieurs études ont déjà mis en évidence une variation des concentrations internes avec l'âge ou le sexe chez le mulot sylvestre (Beernaert et al, 2007; Lopes et al, 2002) et dans d'autres mammifères (Outridge et Scheuhammer, 1993; Sanchez-Chardi et al, 2007; Scheirs et al, 2006). De même, la composition du régime alimentaire peut influencer l'accumulation des polluants (van den Brink et al, 2011). Tous les facteurs peuvent également varier au cours du temps et dans l'espace induisant de potentielles différences entre des études réalisées à différentes saisons ou sur différents sites ne présentant pas les mêmes caractéristiques. Lorsque des travaux sont réalisés sur la faune sauvage, il est donc nécessaire d'avoir des effectifs importants qui permettent de limiter l'influence de ces variables confondantes sans quoi des erreurs d'interprétation des résultats peuvent survenir (González et al, 2006).

Plusieurs études ont également démontré l'influence des caractéristiques biologiques sur les réponses des animaux dans le cadre de contaminations aux ETMs. Ainsi, les indices de condition corporelle et somatiques, peuvent être influencés par l'âge et le sexe des individus

notamment à cause de certaines allométries de développement (Nunes et al, 2001; Peig et Green, 2009, 2010). De même, Jacoby et al (2002) et Kohn et Clifford (2002) ont montré que les lésions histologiques étaient plus développées avec l'âge chez différentes espèces de rongeurs. Enfin, les paramètres hématologiques varient avec les facteurs biotiques tels que l'âge, le sexe ou le patrimoine génétique (Biser et al, 2004 ; Miller, 1996). Au même titre que pour la bioaccumulation, l'influence des caractéristiques biologiques sur les biomarqueurs d'effets doit donc être prise en compte afin d'éviter des interprétations erronées.

## 5 Objectifs de la thèse

---

En intégrant cette étude dans un contexte d'écologie du stress, l'objectif général de cette thèse est d'évaluer l'exposition et les effets des ETMs et du parasitisme sur le mulot sylvestre et de contribuer au développement de marqueurs non létaux d'exposition et d'effets toxiques. A travers l'utilisation d'effectifs importants d'animaux (mulots sylvestres) prélevés *in situ*, sur plusieurs sites, ce projet a également pour objectif de prendre en compte l'influence des caractéristiques individuelles (âge et sexe) et des caractéristiques paysagères pouvant faire varier les réponses observées. D'un point de vue opérationnel, les études menées au cours de la thèse ont été réparties en quatre objectifs (Figure I.11).

L'objectif 1 de la thèse propose d'utiliser les indices de condition corporelle (marqueur non létaux) et les indices somatiques, dans un contexte écotoxicologique, en tant que marqueurs d'effets des ETMs (Figure I.11). Pour ce faire, les indices ont été reliés aux concentrations en Cd et Pb mesurées dans les organes cibles (foie et reins) et dans l'environnement (sols). A la différence d'études précédentes, réalisées avec des effectifs faibles et qui ont montré des résultats contrastés, dans ce projet, 560 mulots récoltés sur 30 sites de capture différents, ont été analysés, permettant de prendre en compte l'effet du paysage qui peut impacter le statut nutritionnel. Comme les caractéristiques individuelles (âge et sexe) peuvent influencer ces indices, ils ont été calculés selon une méthode récemment proposée (SMA, standard major axis regression), censée limiter l'effet lié aux allométries de développement et au dimorphisme sexuel sur les indices. Cet objectif a été concrétisé par un article publié dans la revue PLoS ONE.

L'objectif 2 est de savoir s'il est possible d'utiliser les poils des animaux en tant que marqueurs non létaux d'exposition (Figure I.11). Même si les poils ont déjà été proposés comme un tissu alternatif permettant de mesurer le transfert des ETMs, très peu d'études ont été réalisées chez les micromammifères. De plus, aucune étude n'a pu vérifier la répétabilité des résultats sur des animaux appartenant à la même espèce mais provenant de populations différentes. Afin de répondre à cet objectif, les concentrations en ETMs présentes dans les poils des mulots ont été corrélées aux concentrations dans les organes cibles (foie et reins) et dans l'environnement (sols). Comme les relations entre concentrations en ETMs dans les poils et dans les organes cibles ou dans les sols peuvent varier au cours du temps (mues, changement de régime alimentaire, etc.), 321 mulots ont été capturés au cours de deux

sessions de capture, l'une ayant eu lieu à l'automne 2010 et l'autre au printemps 2011. Ce chapitre est composé d'un article soumis à *Ecotoxicology and Environmental Safety*.

L'objectif 3 est d'étudier les effets des ETMs sur la santé des mulots à travers deux marqueurs d'effets (Figure I.11). A notre connaissance, aucune information concernant les altérations structurelles causées par une exposition chronique au Cd et au Pb sur le mulot n'est disponible dans la littérature. Donc, dans une première partie, des observations histologiques ont été réalisées sur des coupes de foie et de reins des mulots (Partie 1). Les altérations structurelles recherchées ont été décrites comme spécifiques de certaines atteintes causées par les ETMs et permettent une observation précise des effets néfastes induits. Cependant, ces analyses nécessitent le sacrifice des individus étudiés. Dans une seconde partie, afin de développer des marqueurs d'effets non létaux et peu intrusifs, l'impact des ETMs (présents dans l'environnement et dans les organes cibles) sur certains paramètres hématologiques (hématocrite, taux de leucocytes, taux d'érythrocytes granules) a également été étudié (Partie 2). En parallèle de ces deux marqueurs, les teneurs en ETMs ont été comparées à des seuils toxiques de référence afin d'estimer la proportion d'individus présentant des risques accrus de développer des pathologies à cause des concentrations en Cd et Pb dans les organes. Ce chapitre est composé de deux articles, l'un publié dans *Science of the Total Environment* et l'autre en préparation.

L'objectif 4 s'inscrit dans le développement des approches multi-stress et cherche à étudier les potentielles interactions entre les concentrations en ETMs et les prévalences parasitaires chez les mulots (Figure I.11). Des travaux ont déjà été réalisés sur les écosystèmes aquatiques mais il y a un manque d'information concernant les écosystèmes terrestres. De plus, les résultats de ces études sont contrastés et difficilement transposables. Afin de répondre à cet objectif, un diagnostic parasitaire, comprenant des bactéries transmises par les tiques et des protozoaires (transmission directe), en partie responsables de zoonoses, a été réalisé. Les prévalences et la richesse parasitaire ont été reliées aux concentrations en ETMs dans les organes cibles (foie et reins) et environnementales. Afin d'intégrer certaines métriques paysagères (diversité, composition, structure) pouvant moduler l'accumulation des ETMs et les prévalences parasitaires, les individus ont été prélevés sur 7 sites de captures différents. Ce chapitre est constitué d'un article en préparation.

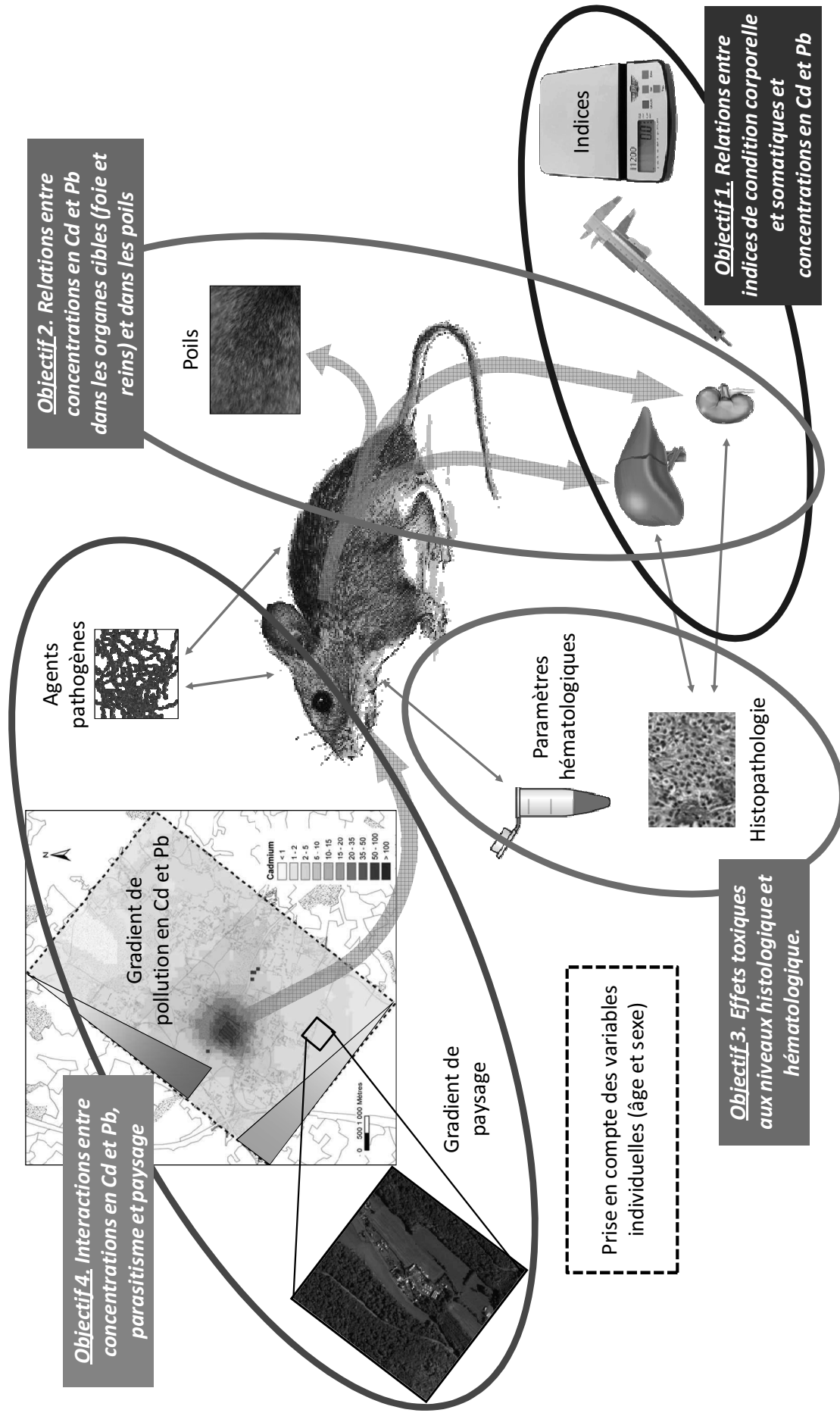


Figure I.11 Schéma général des objectifs de la présente thèse.





---

## *II. Matériels et méthodes*

---



## 1 Site d'étude

---

### 1.1 Contexte socio-économique du bassin industriel du Nord Pas-de-Calais

---

Le Nord Pas-de-Calais se classe aujourd'hui comme la troisième région économique française et elle a toujours été un moteur économique (CCI-NPdC). Après la révolution industrielle, son activité, basée sur l'exploitation du charbon, de l'acier, et du textile, a permis à cette région de se placer au premier rang national dans ces trois secteurs. L'industrialisation a notamment été rendue possible grâce à l'abondance des ressources naturelles, des matières premières et à une main d'œuvre importante. Pendant sa « grande période », le secteur de l'industrie du Nord Pas-de-Calais était composé de 1300 entreprises et de 39000 salariés (CCI-NPdC). Cependant, depuis la fin des 30 Glorieuses et de l'ère industrielle, la désindustrialisation à l'échelle française s'est en effet traduite par des problèmes très importants à l'échelle régionale. A partir de la fin des années 70, les premières mines, houillères et aciéries commencèrent à cesser leurs activités. Ce phénomène s'est amplifié jusqu'à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle. Depuis quelques années, les politiques locales du Nord Pas-de-Calais tentent d'effacer les cicatrices profondes de l'industrialisation mais ces traces persistent, entre autres par la présence de terrils et d'anciens sites industriels plus ou moins fortement contaminés.

### 1.2 Contexte environnemental

---

C'est dans le cadre de la désindustrialisation qu'en 2004 Metaleurop Nord, l'une des dernières fonderies de la région, ferma définitivement. Située à Noyelles-Godault (50°25'42 N 3°00'55 E), à proximité de Douai, cette fonderie était spécialisée dans la production, la transformation et la valorisation des métaux non ferreux : plomb et zinc. Le site de Metaleurop Nord en activité pendant plus d'un siècle (1895-2003) appartenait à la filiale française du groupe Metaleurop SA (aujourd'hui renommée Recyclex).

En 2001, cette usine employait plus de 900 salariés et avait une production annuelle de 115 000 tonnes de Pb, de 87 000 tonnes de Zn et de 150 000 tonnes de scories (déchets solides provenant des opérations de traitement des minerais métallifères). En 2002, malgré d'importantes améliorations techniques au cours des années 1970, les rejets atmosphériques annuels autour de la fonderie étaient encore de 16,9 tonnes de Pb, 31,6 tonnes de Zn et 950 kg de Cd (Douay et al, 2009; DRIRE, 2003). La contamination des sols induite par Metaleurop s'étend sur une large zone de plusieurs dizaines de kilomètres carrés, partagée entre des zones

urbaines à forte densité de population (moyenne estimée de 458 habitants par km<sup>2</sup> autour du site de Metaleurop Nord), des surfaces agricoles et des zones forestières (Douay et al, 2009).

Depuis la fermeture des principales usines de la région Nord Pas-de-Calais, les mesures de concentrations en ETMs dans l'air indiquent une nette diminution des métaux toxiques rejetés ces dernières années (Rapport DREAL). Les concentrations en ETMs dans l'air sont aujourd'hui proches de la moyenne française et sont en dessous des réglementations imposées par l'union européenne (Bilan Atmo, 2008). Aujourd'hui, malgré l'arrêt des rejets atmosphériques en ETMs depuis la fermeture du site de Metaleurop Nord en 2004, la contamination des sols en ETMs aux alentours de l'ancien site reste très élevée.

### 1.3 Contamination du site d'étude

---

Les résultats des analyses de sols indiquent que l'activité industrielle liée à Metaleurop Nord, par le rejet de poussières dans l'air pendant plus d'un siècle, a provoqué une forte pollution des sols (Douay et al, 2008, 2009 ; Sterckeman et al, 2002). Les valeurs observées se situent largement au dessus des médianes de fonds pédogéochimiques mesurées pour le Nord-Pas-de-Calais (tout type de sols confondus) de 0,40 [0,03 – 1,39] µg/g MS de sol pour le Cd et de 29,7 [13,4 - 198,1] µg/g MS de sol pour le Pb (Sterckeman et al, 2007). Certaines teneurs mesurées sont considérées comme extrêmes et font du site de Metaleurop Nord l'un des plus pollués en Cd, Pb et Zn en Europe. En effet, la concentration médiane en cadmium sur l'ensemble du site est de 4,8µg/g et cette concentration atteint jusqu'à 2402 µg/g dans un prélèvement. Il en est de même pour le plomb (médiane de 280 µg/g et concentration maximale de 41 960 µg/g) et pour le zinc (médiane de 434µg/g et concentration maximale de 38 760 µg/g). Les concentrations de ces ETMs diminuent avec l'éloignement à l'ancien site de l'usine et en fonction des vents dominants (Fritsch et al, 2010a). Cependant, les modes d'occupation des sols et les dominances paysagères influencent également les concentrations en ETMs dans les sols (des Ligneris et al, 1999; Fritsch, 2010; Fritsch et al, 2010a). Aux alentours de l'ancienne fonderie de Metaleurop Nord, les concentrations dans les horizons supérieurs de parcelles agricoles atteignent respectivement 21, 1 132 et 1 378 µg/g MS de sol en Cd, Pb et Zn (Douay et al, 2009). Dans les zones enherbées, ces concentrations atteignent 67, 4 890 et 2 685 µg/g MS de sol (Douay et al, 2009). Enfin, dans les zones urbaines, les résultats indiquent des concentrations de 31, 3 711 et 5 830 µg/g MS de sol (Douay et al, 2009). Les différences de concentrations en fonction des types d'occupation des sols sont, entre autres, dues aux différences d'interception des ETMs et donc de leur déposition (Fritsch

et al, 2010a), du pH du sol, de l'activité biologique ou de la composition de la couche organo-minérale (Douay et al, 2009).

Préalablement à la thèse, dans le cadre du programme STARTT, réalisé au laboratoire Chrono-Environnement de 2006 à 2009, les caractéristiques pédologiques et les teneurs en ETMs dans les sols de milieux ligneux (forêt, bois, haies, parcs urbains, etc) ont été déterminés. Pour ce faire, pour chacune des 160 mailles, quinze points de prélèvements de sols (constituant un échantillon composite) ont été réalisés à la tarière sur 10 habitats ligneux. La couche organo-minérale de sol (0-25 cm) a été prélevée de façon systématique sans tenir compte de l'organisation pédologique. Après leur prélèvement, les échantillons de sol ont été séchés à l'air libre puis conservés à une température inférieure à 40°C. Ils ont été homogénéisés, broyés manuellement, et tamisés à 2 mm. Les caractéristiques physico-chimiques des sols ont alors été mesurées (granulométrie, pH eau, capacité d'échange cationique, teneurs en matière organique, en calcaire total). Une partie du broyat a été tamisée jusqu'à 315 µm puis ré-homogénéisée (Douay et al, 2001a). Sur ce broyat, la teneur totale en ETMs (Cd, Pb et Zn) a été déterminée (analyses réalisées par le Laboratoire d'Analyse des Sols de l'INRA d'Arras). Une interpolation spatiale des concentrations en ETMs dans les sols (krigeage) a permis d'obtenir des courbes d'iso-concentrations pour le Cd et le Pb sur l'ensemble du site étudié (Fritsch 2010). Les cartes ci-dessous présentent les concentrations en Cd et en Pb sur le site aux alentours de l'ancienne fonderie Metaleurop (Figure II.1).

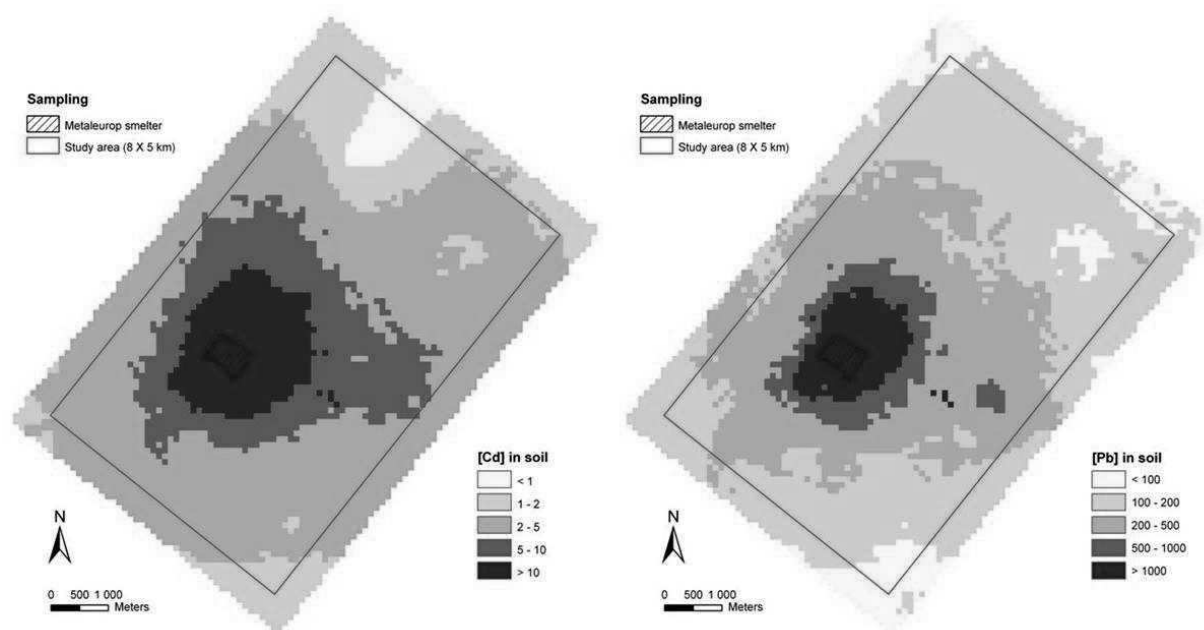


Figure II.1 Cartographie des contaminations des sols autour de l'ancien site industriel de Metaleurop Nord.

## 1.4 Stratégie d'échantillonnage du site d'étude

Le site d'étude retenu pour le présent projet est localisé autour de l'ancien site industriel de Metaleurop Nord. La zone d'étude s'étend sur une superficie de 40 km<sup>2</sup> (5 x 8 km) dont l'orientation a été déterminée selon les vents dominants (Sud-ouest/Nord-est). La zone d'étude a été subdivisée en 160 sites de capture numérotés (de 20 à 197), appelés « mailles », d'une dimension de 500 par 500 mètres de côté (Figure II.2).

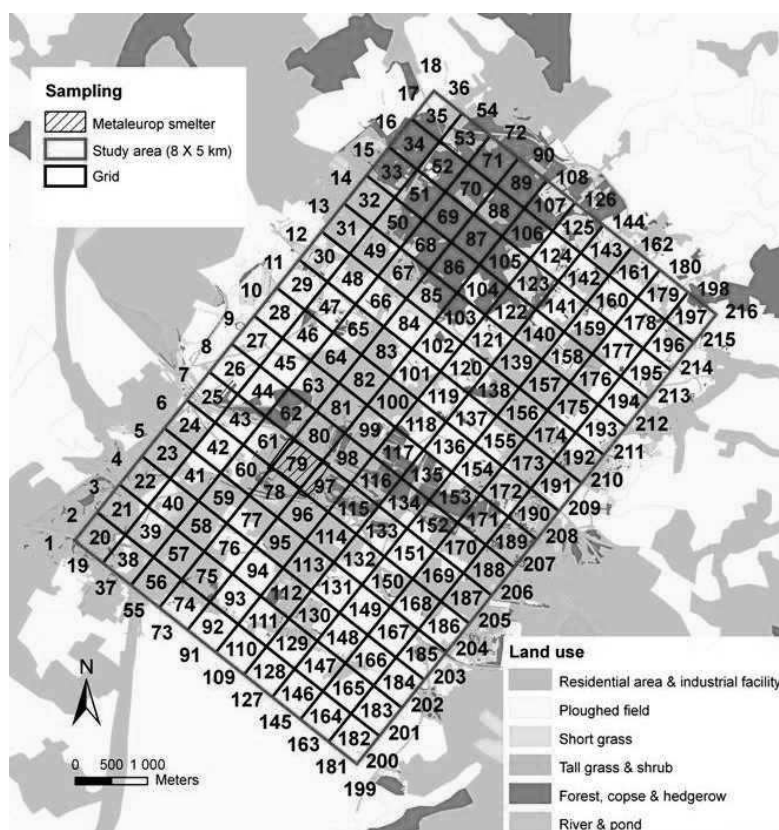


Figure II.2 Subdivision de la zone d'étude en maille

Dans le cadre du programme STARTT et afin de répondre à certains objectifs de la thèse, une maille témoin (TE2) de 500 mètres de côté, servant de référence, a également été échantillonnée lors de certaines sessions de capture (Figure II.3). Cette maille devait remplir plusieurs conditions : présenter des concentrations faibles par rapport aux mailles situées aux alentours de Metaleurop, être proche du site d'étude et être principalement composée de milieux boisés. La maille sélectionnée se situe à environ 10 km au nord-est de l'ancienne fonderie et présente des concentrations médianes en Cd, Pb et Zn du même ordre de grandeur que les mailles les plus faiblement contaminées du site d'étude :  $[Cd]_{\text{médiane}} = 1,5 \mu\text{g/g MS}$  de

sol,  $[Pb]_{\text{médiane}} = 105 \mu\text{g/g MS de sol}$   $[Zn]_{\text{médiane}} = 168 \mu\text{g/g MS de sol}$ . Elle est majoritairement composée de forêts naturelles (Figure II.3).

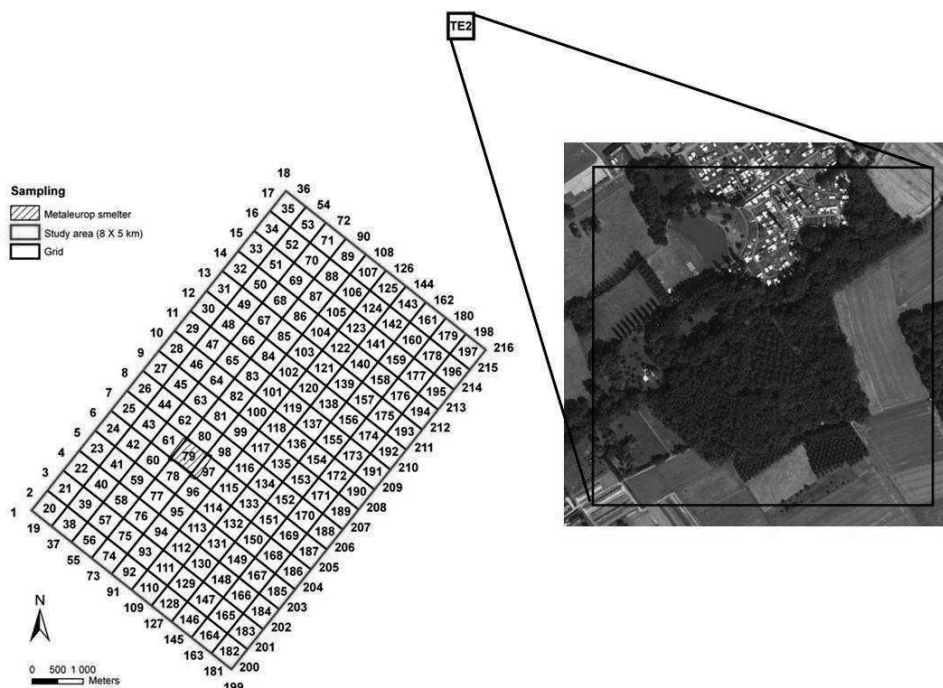


Figure II.3 Emplacement de la maille témoin par rapport au site d'étude et photo aérienne.

### 1.5 Analyse paysagère du site d'étude

Le type d'occupation des sols du site d'étude a été défini à l'aide du logiciel Corine Land Cover et de photos aériennes (Tableau II.1, Fritsch, 2010). Sur la base de cette carte d'occupation des sols, une classification ascendante hiérarchique a permis de déterminer une typologie de dominante paysagère caractéristique de chaque maille (Figure II.4, Fritsch, 2010). Sept types paysagers principaux ont été identifiés et retenus sur le site d'étude: des zones urbaines, des zones arbustives/de haies, des zones urbaines/agricoles mixtes, des zones agricoles, des forêts, des zones mixtes forêts/prairies, et l'ancienne fonderie (Figure II.4). Seules les mailles comprenant les quatre types de paysages les plus représentés sur la zone d'étude (zones agricoles, urbaines, forestières et de friches) ont été étudiées dans cette thèse.

**Tableau II.1 Classes d'occupation des sols et regroupement par catégorie d'occupation des sols autour du site de Metaleurop Nord.**

<b>Classes d'occupation du sol</b>	<b>Regroupement par type d'occupation du sol</b>
Tissu urbain discontinu Zones industrielles et commerciales Réseaux routier et ferroviaire et espaces associés Extraction de matériaux Décharges Chantiers Espaces verts urbains Equipements sportifs et de loisirs Metaleurop ancienne fonderie	Urbain
Terres arables hors périmètres d'irrigation Prairies Systèmes culturaux et parcellaires complexes Surfaces essentiellement agricoles, interrompues par des espaces naturels importants	Agricole
Forêts de feuillus	Forêt naturelle
Plantations d'arbres	Plantation
Landes et broussailles Prairies naturelles (prairies hautes, mégaphorbiaies, friches enherbées) Forêt et végétation arbustive en mutation (friche buissonnante) Roselières	Friches
Bosquets Haies	Bosquets et haies
Marais intérieurs Cours et voies d'eau Plans d'eau	Eau



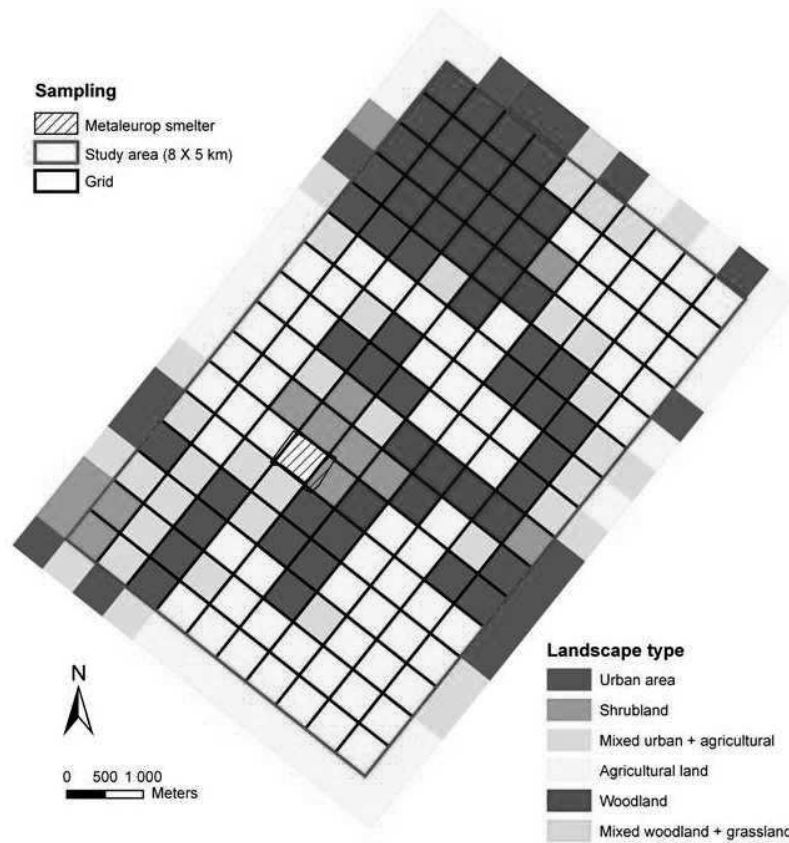


Figure II.4 Définition des dominantes paysagères pour chaque maille située autour de l'ancienne fonderie de Metaleurop Nord.

## 2 Sessions d'échantillonnages

---

La thèse s'articule autour de 3 sessions d'échantillonnages de micromammifères ayant eu lieu en automne 2006, en automne 2010 et au printemps 2011 sur différentes mailles du site d'étude aux alentours de Metaleurop. Dans le cadre de la thèse, j'ai co-organisé et participé aux sessions d'échantillonnage de 2010 et 2011. L'échantillonnage des rongeurs a toujours été effectué sur des zones ligneuses (forêts, plantations, haies...) proches des points de prélèvement de sols dans lesquels les concentrations avaient préalablement été mesurées dans les horizons supérieurs.

### 2.1 Session d'échantillonnage d'automne 2006

---

Afin de répondre au premier objectif de la thèse, au cours de l'automne 2006, les mulots ont été piégés dans 30 mailles sélectionnées parmi les 160 de la grille afin d'obtenir, lorsque c'était possible, plusieurs réplicas par niveau de pollution et par type de dominante paysagère (Tableau II.2, Figure II.5). Les mailles ont été réparties en 3 niveaux de contamination : "peu contaminées" (médiane [Cd]  $\leq 5 \mu\text{g/g}$  mat. sèche (MS) de sol et médiane [Pb]  $\leq 300 \mu\text{g/g}$  MS de sol), "modérément contaminées" ( $5 < \text{médiane [Cd]} \leq 10 \mu\text{g/g}$  MS de sol et/ou  $300 < \text{médiane [Pb]} \leq 600 \mu\text{g/g}$  MS de sol), et "très contaminées" (médiane [Cd]  $> 10 \mu\text{g/g}$  MS de sol ou médiane [Pb]  $> 600 \text{ MS } \mu\text{g/g}$  de sol) (Tableau II.2). Elles ont également été réparties selon 4 types de dominantes paysagères : agricoles, urbaines, forestières et friches (Tableau II.2). Dans chaque maille échantillonnée, 10 lignes de 10 pièges, de type « tapette à souris » appâtés et espacés chacun de 3 mètres, ont été disposées. Comme dans 3 mailles, les zones forestières étaient insuffisantes pour placer 10 lignes de pièges, le nombre de lignes a été réduit à 6-7 sur ces mailles. Les 290 lignes de pièges ont été vérifiées chaque matin pendant trois jours consécutifs et les pièges ont été ré-armés ou ré-appâtés si nécessaire. L'effort d'échantillonnage en équivalent nuits-pièges disposés est détaillé dans le Tableau II.2.

## II. Matériels et méthodes

Tableau II.2 Nombre de nuit-pièges, niveaux de contamination, nombre de mailles échantillonnées et contaminations médianes en Cd et Pb ( $\mu\text{g/g}$  MS de sol) par type de dominante paysagère.

Dominante paysagère	Agricole			Friches			Urbaine			Forestière		
Nuit-pièges	2900			580			2610			2610		
Niveau de contamination	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Nombre de mailles	3	4	5	0	0	2	1	2	3	6	2	2
[Cd] <sub>médiane</sub>	3,7	5,3	13,8			54,1	3,9	4,8	16,3	1,5	8,3	10,1
[Pb] <sub>médiane</sub>	189	337	710			1851	259	313	1392	179	548	416

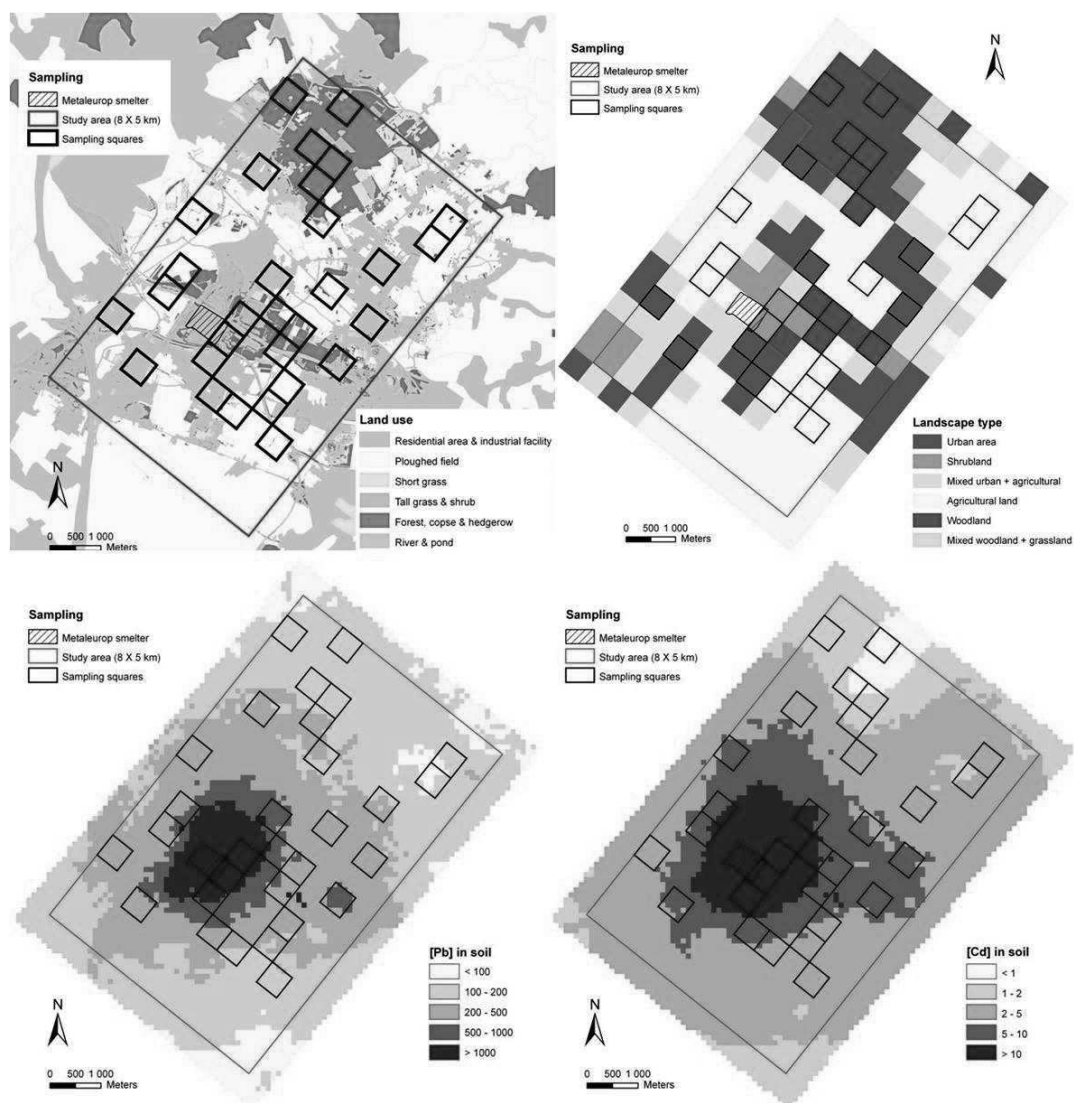


Figure II.5 Répartition des mailles sélectionnées pour la session 2006 ainsi que leur dominante paysagère et la contamination des sols en Cd et Pb.

## 2.2 Session d'échantillonnage d'automne 2010

Afin de répondre aux second et quatrième objectifs de la thèse, une seconde session de capture a été réalisée du 12 septembre au 3 octobre 2010. Les échantillonnages de micromammifères ont été réalisés le long de 2 gradients répartis sur le secteur de Metaleurop : un gradient offrant une diversité de paysages à niveau de contamination constant et un gradient de contamination ayant des dominantes paysagères identiques. Afin d'observer indépendamment les effets liés au gradient de pollution et à celui du paysage, une sélection de 7 mailles parmi les 160 de la grille a donc été réalisée (Tableau II.3). Quatre mailles ayant le même type paysager (forestier) ont été choisies le long du gradient de contamination : une maille témoin (TE2), faiblement polluée (103), moyennement polluée (117) et fortement contaminée (97). L'influence du paysage a été prise en compte par la sélection de trois mailles, à niveau de contamination similaire, mais de types paysagers différents : une maille forestière (171), urbaine (113) et agricole (43) (Figure II.6, Tableau II.3). Au cours de cette session, les individus ont été capturés de manière létale à l'aide de « tapettes à souris » disposés similairement à ceux de la session de 2006. Le Tableau II.3 récapitule les concentrations médianes dans les horizons supérieurs de sol ainsi que les équivalents nuit-pièges disposés lors de la session de capture de l'automne 2010.

**Tableau II.3 Dominante paysagère, niveaux de contamination, nombre de nuit-pièges et contaminations médianes en Cd, Pb et Zn ( $\mu\text{g/g}$  MS de sol) pour chacune des mailles échantillonnées.**

Maille	Gradient de pollution				Gradient paysager		
	TE2	103	117	97	171	113	43
Dominante paysagère	Forestier	Forestier	Forestier	Forestier	Forestier	Urbain	Agricole
Niveau de contamination	0	+	++	+++	++	++	++
Nuit-pièges	296	300	299	300	268	480	295
[Cd] <sub>médiane</sub>	1,5	4,3	9,1	48	7,5	11,5	15,2
[Pb] <sub>médiane</sub>	105	267	512	1295	584	679	323
[Zn] <sub>médiane</sub>	168	352	556	1874	1362	1000	512

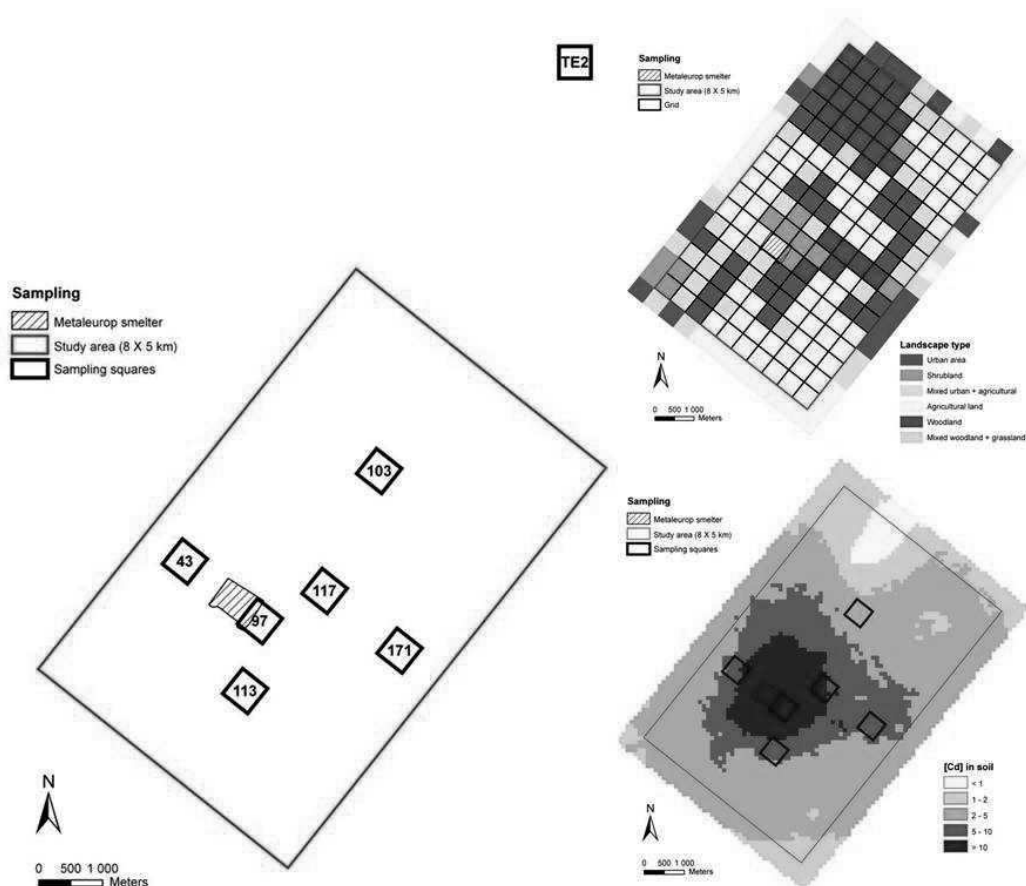


Figure II.6 Répartition des mailles sélectionnées pour la session 2010 ainsi que leur dominante paysagère et la contamination des sols en Cd.

### 2.3 Session d'échantillonnage du printemps 2011

Afin de répondre aux second et troisième objectifs, une troisième session de terrain s'est déroulée du 3 au 15 avril 2011. Les mulots ont été capturés le long du gradient de contamination sur 4 mailles (identiques à celles échantillonnées au cours de la session 2010) ; maille témoin (TE2), faiblement polluée (103), moyennement polluée (117) et fortement polluée (97) (Figure II.7). Afin de ne capturer que l'espèce nécessaire à cette étude, des pièges type INRA (non létaux) ont été utilisés en substitution aux tapettes à souris (Figure II.8). Ces pièges sont constitués d'une cage à l'arrière de laquelle est situé un « dortoir » avec de la nourriture et du foin permettant de maintenir les animaux vivants au moins une nuit. Les animaux n'appartenant pas à l'espèce *A. sylvaticus* ont été relâchés. Le Tableau II.4 récapitule les équivalents nuit-pièges disposés lors de la session de capture de printemps 2011.

Tableau II.4 Niveaux de contamination et effort d'échantillonnage pour les mailles échantillonnées lors de la session de capture 2011.

Maille	TE2	103	117	097
Niveau de contamination	0	+	++	+++
Nuit-pièges	599	360	199	278

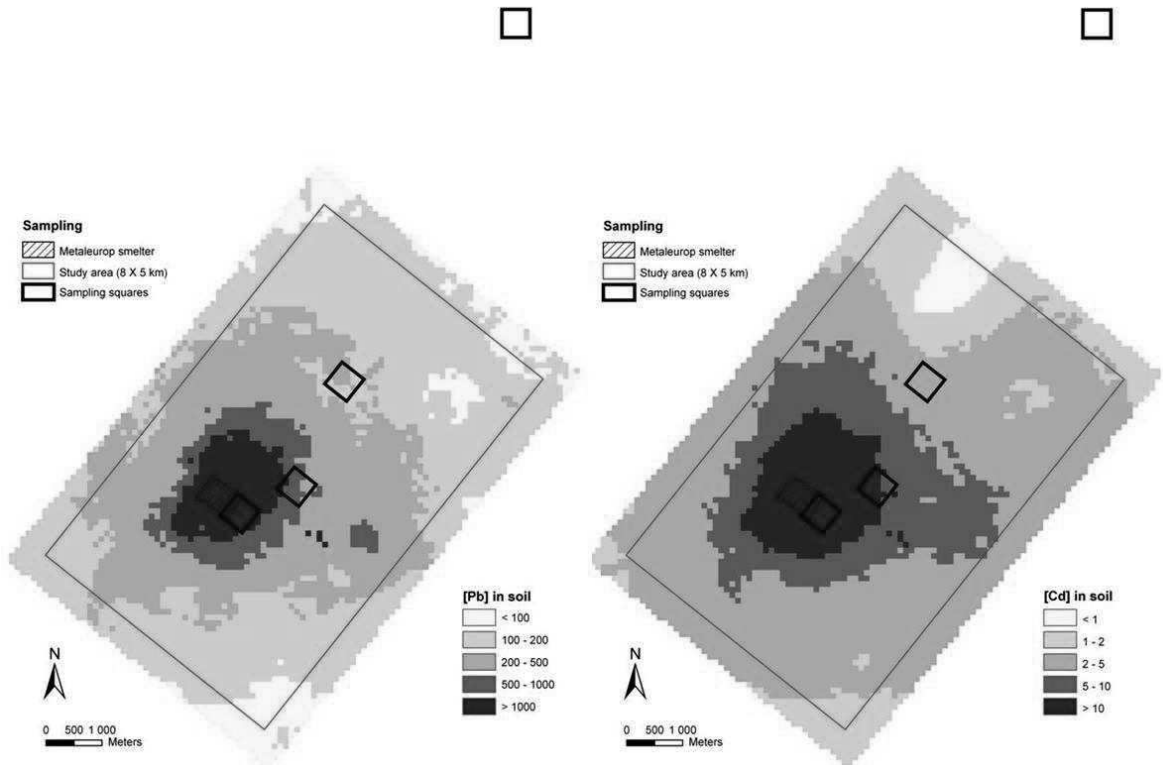


Figure II.7 Répartition des mailles sélectionnées pour la session 2011 le long du gradient de contamination.



Figure II.8 Piège de type « INRA » avec dortoir.

### 3 Résultats de capture et prélèvement des échantillons

Au cours des trois sessions d'échantillonnages, respectivement 560, 237 et 78 mulots ont été utilisés au cours des différentes analyses incluses dans la présente thèse (Tableau II.5). Le Tableau II.5 récapitule également l'ensemble des observations et prélèvements réalisés sur les mulots analysés. Pour chacune des sessions, les paramètres mesurés et les organes prélevés sont répertoriés sur des fiches de dissection (Figure II.9).

**Tableau II.5 Récapitulatif du nombre d'animaux capturés, analysés et des différentes observations et prélèvements réalisés dans le cadre de la thèse**

			Session 2006	Session 2010	Session 2011
<b>Captures</b>	<i>n</i> rongeurs capturés		1346	576	84
	<i>n</i> mulots analysés		560	237	78
<b>Observations</b>	Paramètres morphométriques	Longueur patte			
		Longueur corps			
		Masse corps			
	Paramètres individuels	Détermination du sexe			
	Statut reproductif	Pesée et mesure L x l testicules			
		Mesure diamètre utérus			
		Comptage cicatrices placentaires			
<b>Prélèvements</b>	Paramètres individuels	Age (cristallins)			
		Embryon			
	Dosage des ETMs	Foie			
		Reins			
		Poils			
	Analyses histologiques	Foie			
		Reins			
		Testicules			
	Analyses hématologiques	Sang			
	Parasitologie	Cerveau			
		Muscle (patte avant)			
		Cœur			
		Bouillie intestinale			
	Autres analyses	Rate			
		Oreille gauche			
		Tube digestif			
		Graisse sous-cutanée			
		Crâne et mandibule			
		Fèces			

## II. Matériels et méthodes

Session Metaleurop Printemps 2011

Exp. Names :		Time :		Experiment duration :		Date :		Sheet N°		
External Observations										
Identification		Observable sexual parameters			Body condition		External Parasitism			
Individu name	Code labo	Species	Sex	Suckling (0 or 1)	Body weight (g)	Head + body length (snout to anus)	Yes	No		
			F	M			Number :			
Internal Observations										
External Sampling		Organs weight (g)			Subcutaneous white adipose tissue thigh		Internal Parasitism			
Blood (qty)	Ear	Hair	Faeces	Cristallines	Liver	Spleen	Kidneys	Digestive tract	Yes	No
									Number :	
Sexual parameters										
Uterus diam./ embryos (1 mm if no emb.)		Placenta scars			Histology		Organs Sampling			
Testicule length x width	Seminal vesicle weight (g)				Bacteriology		Metal load			
L	X				LM : left kidney, 2/3 parts of liver lobes, left testis, (half) spleen, TEM : 1 liver lob part (0.5-1mm thickness), if possible lower part of the right kidney		Brain, Muscle (left front leg) & Heart			
R	X				Observations :					
Weight (g)					Head sampling :					
Blood Parameters										
Hématocrite (%) :										
Hémoglobine (g/dl) :										
Réalisation du frotis sanguin :										
Remarques										

Figure II.9 Exemple de fiche de dissection utilisée pour la session 2011.

L'ensemble des protocoles utilisés et la description des différentes analyses effectuées sont décrits dans les sections "Matériels et Méthodes" de chacun des chapitres concernés.



---

### *III. Résultats*

---



---

# *Chapitre 1: Can body condition and somatic indices be used to evaluate metal-induced stress in wild small mammals?*

---

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue PLOS ONE.

OPEN ACCESS Freely available online



## **Can Body Condition and Somatic Indices be Used to Evaluate Metal-Induced Stress in Wild Small Mammals?**

Nicolas Tête<sup>1\*</sup>, Clémentine Fritsch<sup>1</sup>, Eve Afonso<sup>1</sup>, Michaël Coeurdassier<sup>1</sup>, Jean-Claude Lambert<sup>1</sup>, Patrick Giraudoux<sup>1,2</sup>, Renaud Scheifler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Chrono-Environment, UMR UFC/CNRS 6249 USC INRA, University of Franche-Comté, Besançon, France, <sup>2</sup> Institut Universitaire de France, Paris, France

### **Abstract**

Wildlife is exposed to natural (e.g., food availability and quality, parasitism) and anthropogenic stressors (e.g., habitat fragmentation, toxicants). Individual variables (e.g., age, gender) affect behaviour and physiology of animals. Together, these parameters can create both great inter-individual variations in health indicators and interpretation difficulties. We investigated the relevance of body condition and somatic indices (liver, kidneys) as indicators of health status in wood mice (*Apodemus sylvaticus*,  $n = 560$ ) captured along a metal pollution gradient in four landscape types (30 sampling squares 500-m sided). The indices were calculated using a recently proposed standard major axis regression instead of an ordinary least square regression. After considering age and gender for the body condition index, no landscape type influence was detected in the indices. However, important index variability was observed between sampling squares; this effect was included as a random-effect in linear models. After integrating all individual and environmental variables that may affect the indices, cadmium (Cd) concentrations in both the liver and kidneys were negatively related to body condition and liver indices only for individuals from highly contaminated sites. Lead in the liver was negatively related to the liver index, and Cd in kidneys was positively linked to the kidney index, potentially suggesting metal-induced stress. However, interpretation of these indices as a wildlife ecotoxicology tool should be performed with caution due to the sensitivity of potentially confounding variables (e.g., individual factors and environmental parameters).

**Citation:** Tête N, Fritsch C, Afonso E, Coeurdassier M, Lambert J-C, et al. (2013) Can Body Condition and Somatic Indices be Used to Evaluate Metal-Induced Stress in Wild Small Mammals? PLoS ONE 8(6): e66399. doi:10.1371/journal.pone.0066399

**Editor:** Brock Fenton, University of Western Ontario, Canada

**Received:** February 14, 2013; **Accepted:** May 7, 2013; **Published:** June 18, 2013

**Copyright:** © 2013 Tête et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Field experiments and chemical analyses were financially funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR, contract n°ANR-05-ECCO-004) and the ADEME (contract n°0572C0058) within the framework of the STARTT program. Nicolas Tête was financially supported by the Conseil Régional de Franche-Comté and the ADEME. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: nicolas.tete@univ-fcomte.fr



## Can body condition and somatic indices be used to evaluate metal-induced stress in wild small mammals?

Nicolas Tête, Clémentine Fritsch, Eve Afonso, Michaël Coeurdassier, Jean-Claude Lambert, Patrick Giraudoux, Renaud Scheifler

### Abstract

Wildlife is exposed to natural (e.g., food availability and quality, parasitism) and anthropogenic stressors (e.g., habitat fragmentation, toxicants). Individual variables (e.g., age, gender) affect behaviour and physiology of animals. Together, these parameters can create both great inter-individual variations in health indicators and interpretation difficulties. We investigated the relevance of body condition and somatic indices (liver, kidneys) as indicators of health status in wood mice (*Apodemus sylvaticus*,  $n = 560$ ) captured along a metal pollution gradient in four landscape types (30 sampling squares 500-m sided). The indices were calculated using a recently proposed standard major axis regression instead of an ordinary least square regression. After considering age and gender for the body condition index, no landscape type influence was detected in the indices. However, important index variability was observed between sampling squares; this effect was included as a random effect in linear models. After integrating all individual and environmental variables that may affect the indices, cadmium (Cd) concentrations in both the liver and kidneys were negatively related to body condition and liver indices only for individuals from highly contaminated sites. Lead in the liver was negatively related to the liver index, and Cd in kidneys was positively linked to the kidney index, potentially suggesting metal-induced stress. However, interpretation of these indices as a wildlife ecotoxicology tool should be performed with caution due to the sensitivity of potentially confounding variables (e.g., individual factors and environmental parameters).

### Keywords:

Scaled mass index; wildlife; toxic effects; landscape ecotoxicology; stress ecology; *Apodemus sylvaticus*.

## 1 Introduction

---

A wide range of morphological, biochemical, and physiological metrics have been developed as health indices [1]. Body condition is commonly defined as a measure of the energetic or nutritional state of an animal [2,3]. Calculations and interpretation of body condition indices (BCI), which are often based on the relationship between body mass and length measurements, are highly debated, and BCI have been found to correlate with fitness parameters related to reproduction and survival in mammals and other taxa [4]. Individual quality, defined as an estimate of individual fitness, has been estimated by using somatic indices, i.e., the relative size of internal organs [5]. For instance, liver size and pancreas size have been shown to correspond to low quality foraging in herbivorous mammals [5].

Among the numerous markers developed to assess deleterious effects of trace metals (TMs) in wild small mammals, body condition and somatic indices have sometimes been used, with inconsistent results. For instance, Sanchez-Chardi et al. [6] observed that the body condition index and the relative liver weight (i.e., tissue weight divided by body weight) tended to decrease in adult wood mice, *Apodemus sylvaticus*, from a landfill site, while the relative kidney weight increased [6]. In the same site, no difference of morphological parameters (both body condition and somatic indices) was found in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula* [7]. Nunes et al. [8] found that body length was higher in *Mus spretus* mice from a reference site compared to mice inhabiting a metal-contaminated area. Body weight and BCI were influenced by both gender and reproductive activity, but not by the level of pollution. However, kidney and spleen relative weights were larger in the reference site [8].

These various studies may have suffered from several limitations that potentially explain these discrepancies. First, the sample sizes were relatively low ( $52 < n$  individuals  $< 147$ ) considering that multiple variables (gender, age, site, etc.) may impact BCI and somatic indices. Moreover, the calculations of BCI and somatic indices did not consider the variation in the relationship between mass and length as body size changes and growth occurs (allometry), which was recently noted as a potentially misleading bias [9,10]. In these studies [9,10], the authors proposed a new index calculation using a standard major axis (SMA) regression instead of the commonly used ordinary least square regression. Scaled mass index (SMI, defined as body condition index calculated following the SMA procedure) was shown to be a better indicator of the relative size of energy reserves and other body components compared with ordinary least square residuals [9,10]. Finally, in the comparison of individuals

from only one contaminated *versus* one reference area, site characteristics and confounding variables such as variations in resources availability and habitat or landscape features might influence the relationship between BCI/somatic indices and contamination, even though most contaminated and control study sites were selected for similar vegetation and climate conditions.

In this context, the aim of this work was to study the relationships between scaled mass index and somatic indices and concentrations of TMs in the tissues of wood mice from 30 sampling sites surrounding a large-scale smelter-impacted area in Metaleurop Nord, northern France. A large sampling effort was needed to simultaneously study the influence of several variables in a sufficient sample size. These variables include individual characteristics (age and gender) as well as metal concentrations in the soil and in two organs: the liver and kidneys. Landscape type has been shown to influence small mammal population dynamics and community composition, structure and dynamics [11-15]; thus, this variable was included in the models to test the potential modulation of body condition or somatic indices.

## 2 Materials and methods

---

### 2.1 Study site

---

Fieldwork was conducted around the former lead (Pb) and zinc (Zn) Metaleurop Nord smelter (Noyelles-Godault, Nord-Pas-de-Calais, northern France, 50°25'42 N 3°00'55 E). The study area, spanning 40 km<sup>2</sup> (Figure III.1) around the former smelter, was divided into 160 squares of 500x500 m that constituted our sampling units. Smelting activity for more than 100 years has caused dramatic pollution in this area by three main TMs: cadmium (Cd), Pb, and Zn [11,16]. To evaluate the concentration of TMs in the soil (0-25 cm depth), a composite soil sample (15 points in homogeneous woody patch) was taken in one to ten woody patches (for instance, hedgerows, tree plantations, copses, or woodlots) in each square during the autumn of 2006. Soil metal levels in the soil site ranged from 0.1 to 2,402 µg/g of dry matter (DM) for Cd, from 16 to 41,960 µg/g DM for Pb, and from 44 to 38,760 µg/g DM for Zn [11]. Three levels of soil contamination, defined as “light” (median [Cd] ≤ 5 µg/g DM soil and median [Pb] ≤ 300 µg/g DM soil), “moderate” (5 < median [Cd] ≤ 10 µg/g DM soil and/or 300 < median [Pb] ≤ 600 µg/g DM soil), and “high” (median [Cd] > 10 µg/g DM soil or median [Pb] > 600 DM µg/g soil), were allocated to each square. For graphical representation (Figure III.2a to d), the “highly polluted” class was subdivided into two classes of contamination, “highly polluted” (10 ≤ [Cd]<sub>soil</sub> ≤ 20 µg/g DM soil) and “extremely polluted” (20 ≤ [Cd]<sub>soil</sub> ≤ 70 µg/g DM soil).

A land use analysis was performed to determine the landscape composition of each square [17]. According to their dominant land cover, seven types of landscapes were identified throughout the area: urban area, shrubland, mixed urban/agricultural land, agricultural land, woodland, mixed woodland/grassland, and the Metaleurop former smelter (Figure 1). Only the four landscape types mainly represented in the area (dominated by agricultural land, urban areas, woodland, and shrubland) were studied here.



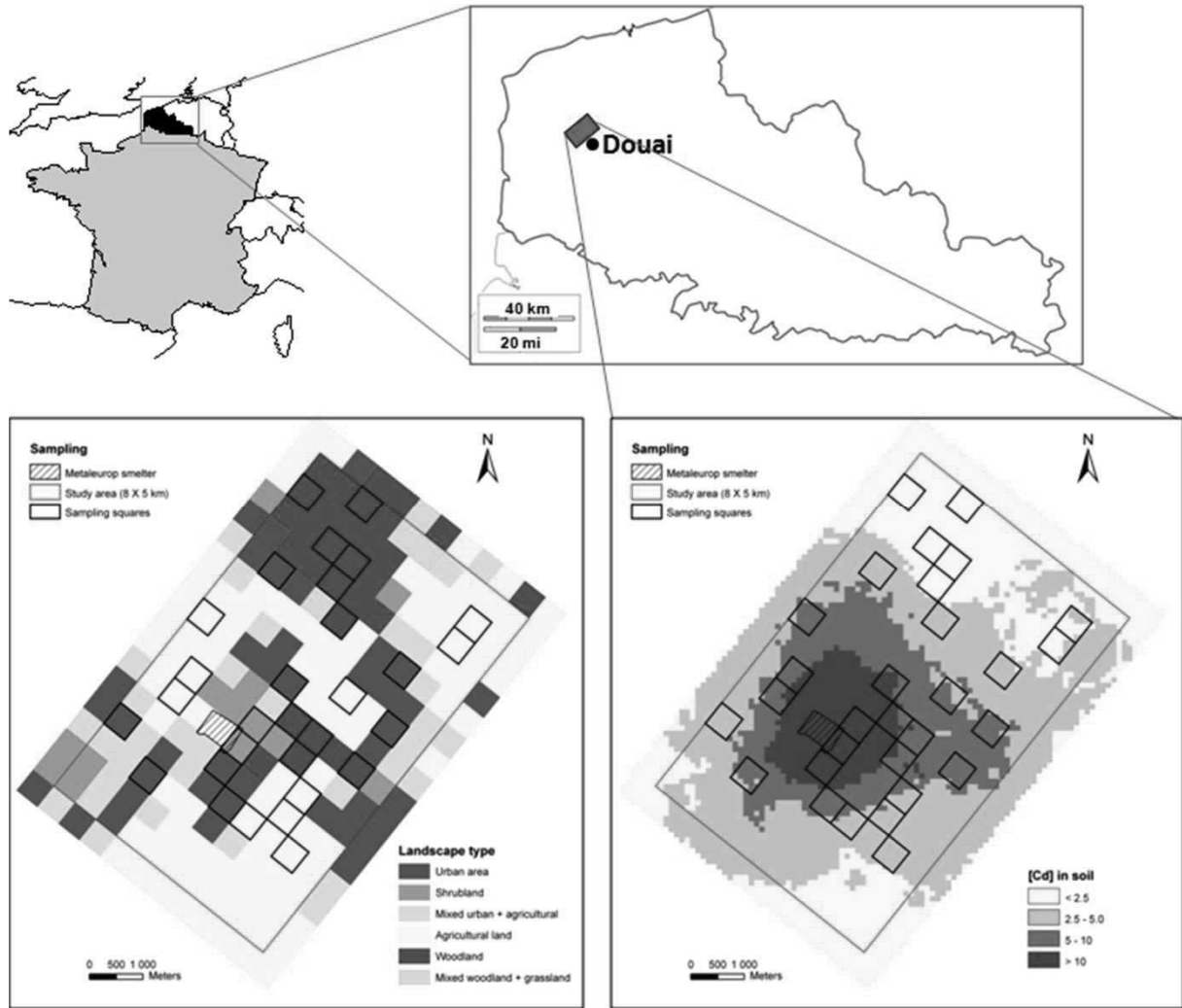


Figure III.1 Study site localisation, Cd contamination ( $\mu\text{g/g DM}$ ) in soils and landscape types. Study site located around the former Metaleurop Nord smelter (Nord-Pas de Calais, France); maps present the landscape types in each square and the Cd concentrations in the study area soils. Selected squares for wood mice sampling are bolded in both maps.

Tableau III.1 Pollution level, median Cd and Pb soil concentrations ( $\mu\text{g/g DM}$ ), and the number of sampling squares for each landscape type studied.

	Landscape type											
	Agricultural lands			Shrublands			Urban areas			Woodlands		
Pollution level	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	+	++	+++
Number of sampling squares	3	4	5	0	0	2	1	2	3	6	2	2
Median $[\text{Cd}]_{\text{soil}}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	3.7	5.3	13.8			54.1	3.9	4.8	16.3	1.5	8.3	10.1
Median $[\text{Pb}]_{\text{soil}}$ ( $\mu\text{g/g}$ )	189	337	710			1851	259	313	1392	179	548	416

Tableau III.2 For each soil contamination level, concentrations of Cd and Pb (minimum, mean, and maximum values, µg/g DM) in the liver and kidneys and number and percentage (in brackets) of wood mice at risk for metal-induced stress from the surroundings of the former Metaleurop Nord smelter.

Organs	Pollution level	n	Cd (µg/g DM)			Pb (µg/g DM)			Cd thresholds (µg/g DM)	Pb thresholds (µg/g DM)	Number (percentage) of individuals at risk for metal-induced stress	
			Min	Mean	Max	Min	Mean	Max			Cd	Pb
Kidneys	+	121	0.33	5.4	68	0.52	3.4	26	105	25	0	1 (0.8%)
	++	178	0.35	5.5	154	0.52	8.1	151			1 (0.6%)	16 (9.0%)
	+++	261	0.53	8.8	332	0.52	43.2	1282			4 (1.5%)	63 (24%)
Liver	+	122	0.14	2.5	38	0.12	0.72	13	15 - 140	10	4 (3.3%) - 0	1 (0.8%)
	++	178	0.01	4.1	209	0.12	0.95	14			12 (6.7%) - 1 (0.6%)	2 (1.1%)
	+++	260	0.01	3.7	91	0.12	3.4	50			24 (9.2%) - 0	21 (8.1%)

Individuals are considered at risk for metal-induced stress when TM concentrations were above the thresholds defined by Shore and Douben [22,23].

## 2.2 Small mammals sampling

---

During the autumn of 2006, small mammals were trapped in 30 squares selected from among the 160 squares of the grid to obtain several sampling square replicates for each pollution level in each landscape type (Figure III.1, Tableau III.1). Sampling was performed in the woody patches, where soil concentrations have been previously measured. In each sampling square, 10 lines of 10 3 m-spaced break-back traps were set. In 3 squares, the available areas of woody patches were insufficient to place 10 trap-lines; thus, the number of lines was reduced to 6-7 in these squares. The 290 trap-lines were checked every morning for three consecutive days and re-set/re-baited if needed. The sampling effort consisted of 2900, 580, 2610, and 2610 trap-nights in the ‘agricultural land’, ‘shrubland’, ‘urban’, and ‘woodland’ landscape types (surrounding the woody patches where animals were trapped), respectively. The percentage of captures, hereafter referred to as “capture success”, was calculated as the number of individuals trapped per 100 trap-nights. Sampling authorisation was given by the *Direction Régionale de l’Environnement, de l’Aménagement et du Logement* (DREAL) of Nord – Pas-de-Calais. Captured animals were frozen following capture and stored at -20°C until dissection.

## 2.3 Animal preparation and morphometric measurements

---

Animals were thawed, identified to specific levels based on morphometrics and skull and teeth characteristics [18,19], weighed, measured, dissected, sexed, and aged. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*, whose biomass largely dominates the community [20], is the only species studied in this work. Liver and kidneys were weighed. The age of rodents was estimated by measuring their crystalline dry weight (following Quéré and Vincent [21]).

Because body length measurement was problematical (heads were cut off prior to dissection), the left foot length was measured. Measurements were performed from the heel to the central claw, to the nearest 0.01 mm. However, the body length of small animals is considered to be a more suitable measure of structural length than foot length and is preferred for SMI computation [9]. The body length was predicted from the foot length using a linear model based on wood mice captured during another sampling session (autumn 2010) conducted in the same study site. Body and foot lengths were measured in 192 individuals following the exclusion of females showing reproductive traits and of individuals partially eaten in the traps. Body length was predicted using a linear model including “foot length”, “age”, “gender”, and interactions between foot length, age, foot length, and gender as

independent variables (Pearson  $r^2 = 0.83$ ,  $p < 0.001$ ). Body lengths of individuals captured in 2006, referred to as “body length” hereafter, were predicted from their foot lengths with the equation of the model described above.

The entire body (body and head) was weighed (to the nearest 0.01 g); after dissection, the digestive tract was subtracted prior to the calculation of the indices. Females showing reproductive traits (pregnancy or lactation) were excluded from the dataset to avoid biases in weight estimation due to physiology.

#### 2.4 Measure of TM concentrations in tissues

---

Metal concentrations (Cd, Pb) were measured in the liver and kidneys by furnace atomic absorption spectrometry (AAS, VARIAN 240Z) and expressed as  $\mu\text{g/g}$  dry mass (DM). Samples were digested with nitric acid (5 mL  $\text{HNO}_3$ , 65%, Carlo-Erba, analytical quality) in a drying oven (65°C) during 72 h. After digestion, samples were diluted by adding 20 mL ultra-pure water (Elga, 18.2  $\text{M}\Omega/\text{cm}^2$ ). Blanks (acid + water) and certified reference materials (CRM: TORT-2, lobster hepatopancreas, and DOLT-3, dogfish liver, from the National Research Council Canada) were prepared and analysed with the samples. Duplicates were performed for each analysis and repeated if the RSD was above 5%. Average CRM recoveries were calculated at  $98 \pm 28\%$  for Pb and  $100 \pm 17\%$  for Cd. Lead and Cd detection limits in organs were 0.24  $\mu\text{g/g}$  DM and 0.01  $\mu\text{g/g}$  DM for the liver, and 1.03  $\mu\text{g/g}$  DM and 0.04  $\mu\text{g/g}$  DM for kidneys, respectively. When a concentration value was under the detection limit, half of the detection limit value was used for statistical analyses.

The percentage of individuals considered at risk for metal-induced stress was estimated according to the thresholds proposed by Shore and Douben [22,23] as follows: number of individuals with Cd or Pb internal concentrations  $>$  thresholds  $\times 100$  / total number of individuals (Tableau III.2).

#### 2.5 Indices calculations and statistical analyses

---

Potential differences in population structure (sex ratio and mean age differences as estimated by crystalline lens mass) between pollution levels and landscapes were checked using  $\chi^2$  tests for the sex ratio and a Fisher test for age.

Relationships between TM concentrations (log10-transformed) in soils and organs were studied using a Pearson correlation test after graphically checking the normality of residuals of linear models and the variance homoscedasticity.

Body condition and somatic indices were calculated for 653 individuals out of the 859 individuals sampled after the suppression of partially eaten individuals and pregnant or lactating females [3]. Body condition was estimated using the method proposed by Peig and Green [9,10] based on a standardised regression axis (SMA) instead of an ordinary least squares (OLS) regression between individuals. The SMI standardises body mass at a fixed value of a linear body measurement based on the scaling relationship between mass and length according to the equation  $SMI = m_i(L_0/L_i)^{b_{SMA}}$ , where  $m_i$  and  $L_i$  are the body mass and the linear body measurement of an individual  $i$ , respectively;  $b_{SMA}$  is the scaling exponent estimated by the SMA regression of  $\ln M$  on  $\ln L$ ;  $L_0$  is an arbitrary value of  $L$  (e.g., arithmetic mean value for the study population); and  $SMI$  is the predicted body mass for individual  $i$  when the linear body measure is standardised to  $L_0$  [9,10]. For the purpose of homogeneity, somatic indices were built using an SMA regression. Somatic indices will hereafter be referred to as the scaled liver index (SLI, for the somatic index of the liver) and the scaled kidney index (SKI, for the somatic index of kidneys). In this study, the values of  $b_{SMA}$  were 3.14, 1.40, and 0.45 for SMI, SLI, and SKI, respectively. The  $b_{SMA}$  value for SMI slightly varied among sites: 3.50 for individuals from weakly polluted sites, 2.99 for moderately polluted sites and 3.06 for highly polluted sites; however, those differences were not significant ( $p > 0.050$ ). Although Peig and Green [10] suggested using only data from uncontaminated sites to estimate the  $b_{SMA}$  for the scaled mass index, the entire population  $b_{SMA}$  value was used in the present study because  $b_{SMA}$  did not differ among sites. In the literature, the  $b_{SMA}$  value for SMI lies within the range of 2.5-3.2, which is estimated to be a guideline to identify reliable estimates of the allometric exponent in mammals [9,10]. The same authors found a value of 2.71 (95% confidence interval: 2.43-2.99) for 97 wood mice individuals captured in an unpolluted site in northeastern Spain. The estimated  $b_{SMA}$  in both organs was remarkably constant along the pollution gradient (from 1.31 to 1.40 for SLI, and from 0.44 to 0.48 for the SKI). No comparable value of ontogenetic allometric exponents for the liver and kidneys was found in the literature. Correlations between SMI, SLI, and SKI were studied using a Pearson correlation test.

Linear mixed models were used to analyse the relationship between SMI or somatic indices and predictor variables. The spatial dependence of body condition and somatic indices was studied by computing omnidirectional empirical variograms with variographic envelopes obtained by permutation (99 simulations, Monte-Carlo method [24]). None of the variograms showed a spatial structure, and no significant spatial auto-correlation was detected. Therefore, spatial correlation structures were not included in further models. Individuals from the same

sampling square were assumed to be exposed to the same environmental constraints acting on indices, and the indices were highly variable between sampling squares; therefore, a variable “sampling square” was included as a random effect in the models. Even though the SMA regression used to calculate the indices is supposed to consider allometry, age and gender were still included in the models. Age, gender, landscape, and TM concentrations in organs and soil were included in the models as fixed predictor variables using the following procedure: age and gender were first considered in the models as single and second order interaction terms. The effect of age on indices was tested as a linear relationship to indices throughout life and as a polynomial function of degree 2 (increasing until adulthood and then decreasing for oldest ages). Finally, TM concentrations in organs, as well as their second order interactions with age, gender, landscape, and TM concentrations in soil, were included in the models. Random and fixed effects were tested with a likelihood ratio test (LRT,  $p < 0.050$ ). Fixed effects residuals of the final models were graphically checked for normality and variance homoscedasticity. The likelihood ratio  $R^2$  [25] was calculated to determine which part of the index variability was due to fixed effects. The proportion of random effects variance (hereafter referred to as  $V^2$ ) explained by the sampling square was estimated to evaluate the individual index variability between sampling squares.

All statistical analyses were performed with R 2.15.1 software with the additional libraries “lmmfit”, “lmodel2”, “nlme”, and “pgirmess” [26].

### 3 Results

#### 3.1 Sample size and wood mice population structure

During the field session, 859 wood mice were trapped. Although the global population was slightly dominated by males (54%), no difference in sex ratios was observed in different landscape types ( $\chi^2 = 4.5$ ,  $ddl = 3$ ,  $p = 0.210$ ) or contamination levels ( $\chi^2 = 0.25$ ,  $ddl = 2$ ,  $p = 0.882$ ). The capture success was 9.4% ( $n = 274$ ), 11.7% ( $n = 68$ ), 5.6% ( $n = 147$ ) and 14.2% ( $n = 370$ ) in the landscape types of agricultural land, shrubland, urban area, and woodland, respectively. Capture success differed between landscape types ( $\chi^2 = 109.9$ ,  $ddl = 3$ ,  $p < 0.001$ ); fewer wood mice were captured in urban landscapes than in woodland landscapes. Capture success differed along the soil pollution gradient; success was higher in squares considered to be highly polluted than in moderately and lightly polluted squares ( $\chi^2 = 55.1$ ,  $ddl = 2$ ,  $p < 0.001$ ). Mean age differences (estimated by crystalline lens mass) were observed along the contamination gradient ( $p = 0.009$ ); individuals from the moderately polluted site had a lower average age than in the other sites. Mean age differed between the four landscape types ( $p < 0.001$ ). On average, captured individuals were younger in agricultural and urban areas than in the two other landscape types.

#### 3.2 Accumulation of TMs in wood mice

Due to technical and time constraints, 560 individuals out of the 859 were randomly chosen for TM concentration measurements in organs. The concentrations of Cd and Pb measured in the liver and kidneys showed a high variability along the pollution gradient; the values ranged from 0.01 to 332  $\mu\text{g/g DM}$  for Cd and from 0.06 to 1,282  $\mu\text{g/g DM}$  for Pb (Tableau III.2). Cadmium and Pb concentrations were positively correlated between the liver and kidneys (respectively,  $r = 0.77$  for Cd, and  $r = 0.78$  for Pb,  $p < 0.001$ ). Average Cd and Pb concentrations were 2.4 and 12 times higher, respectively, in kidneys than in the liver. Organ concentrations of Cd and Pb increased with increasing TM soil concentrations ( $r_{\text{Cd kidneys}} = 0.24$ ,  $p < 0.001$ ;  $r_{\text{Cd liver}} = 0.14$ ,  $p = 0.001$ ;  $r_{\text{Pb kidneys}} = 0.53$ ,  $p < 0.001$ ;  $r_{\text{Pb liver}} = 0.50$ ,  $p < 0.001$ ). The percentage of individuals at risk for metal-induced stress increased along the contamination gradient (Tableau III.2) and ranged from 0 to 3.3% in lightly polluted squares, 0.6 to 9% in moderately polluted squares, and 1.5 to 24% in most polluted squares. The percentage of individuals at risk for metal-induced adverse effects was largely influenced by high Pb concentrations in kidneys.



### 3.3 Influence of individual and environmental factors on body condition and somatic indices

The SMI varied negatively with the age of wood mice ( $0.15 < R^2_{\text{age}} < 0.17$ ,  $p < 0.001$ , Tableau III.3) and did not have a better fit with a polynomial relationship than with a linear one (LRT,  $p = 0.063$ ). SMI for males were slightly higher than for females (mean SMI adjusted on age: females = - 0.49, males = 0.06;  $p = 0.035$ ). The SMI decrease with age was sharper for females than for males ( $p < 0.001$ ). Landscape type did not influence the SMI ( $p = 0.066$ ). After considering age, gender, and their second order interaction, the interaction between TMs in soil and TMs in organs was included in the models. The relationship between SMI and hepatic Cd concentrations varied depending on soil pollution, and a significant second order interaction existed between Cd concentrations in the liver and soil ( $R^2_{[\text{Cdsoil}]:[\text{Cdliver}]} = 0.05$ ,  $p < 0.050$ ). SMI increased with Cd concentrations in the liver for animals sampled in lightly and moderately polluted sites ( $[\text{Cd}]_{\text{soil}} \leq 10 \mu\text{g/g DM}$ ) and decreased for the most polluted sites (mean  $[\text{Cd}]_{\text{soil}} > 10 \mu\text{g/g DM}$ ; Figure III.2a, Table 3). The same pattern was observed for the relationship between SMI and renal Cd concentration ( $R^2_{[\text{Cdsoil}]:[\text{Cdkidneys}]} = 0.06$ ,  $p < 0.050$ ; Figure III.2b, Tableau III.3); the SMI of specimens from extremely contaminated sites decreased. Organ Pb concentrations were not related to SMI or their interaction with Pb soil concentrations. In all selected models, the proportion of random effects variance explained by the sampling square was large (0.36 to 0.41), showing a high individual SMI variability between sampling squares.

The SLI was positively related to age ( $0.04 < R^2_{\text{age}} < 0.13$ ,  $0.001 < p < 0.002$ ), but no gender-related differences were detected. The landscape did not significantly influence SLI. After considering the effect of age, the same pattern described above for SMI was observed for the SLI. SLI and interactions between Cd liver and Cd soil and between Cd kidneys and Cd soil were significant (respectively,  $R^2_{[\text{Cdsoil}]:[\text{Cdliver}]} = 0.04$ ,  $p = 0.004$  and  $R^2_{[\text{Cdsoil}]:[\text{Cdkidneys}]} = 0.10$ ,  $p < 0.010$ ; Figure III.2c and 2d, Tableau III.3). SLI decreased with Pb concentrations in the liver regardless of Pb concentrations in soil (Figure III.2e, Tableau III.3). Finally, neither Pb concentration in kidneys nor its interaction with Pb concentration in the soil was related to SLI.

The SKI was positively influenced by age ( $0.25 < R^2_{\text{age}} < 0.27$ ,  $p < 0.001$ ), indicating that older wood mice had heavier relative kidney mass than young ones. None of the tested predictor variables and second order interactions were related to SKI for Cd concentrations in

the liver or Pb concentrations in the liver and kidneys. However, SKI increased with Cd concentrations in kidneys (Figure III.2f, Tableau III.3).

Landscape types and second order interactions between TM concentrations in organs and age or gender were not related to the studied indices.

SMI, SLI, and SKI all positively correlated with each other ( $r_{SMI/SLI} = 0.30, p < 0.001$ ;  $r_{SMI/SKI} = 0.30, p < 0.001$ ;  $r_{SLI/SKI} = 0.61, p < 0.001$ ).

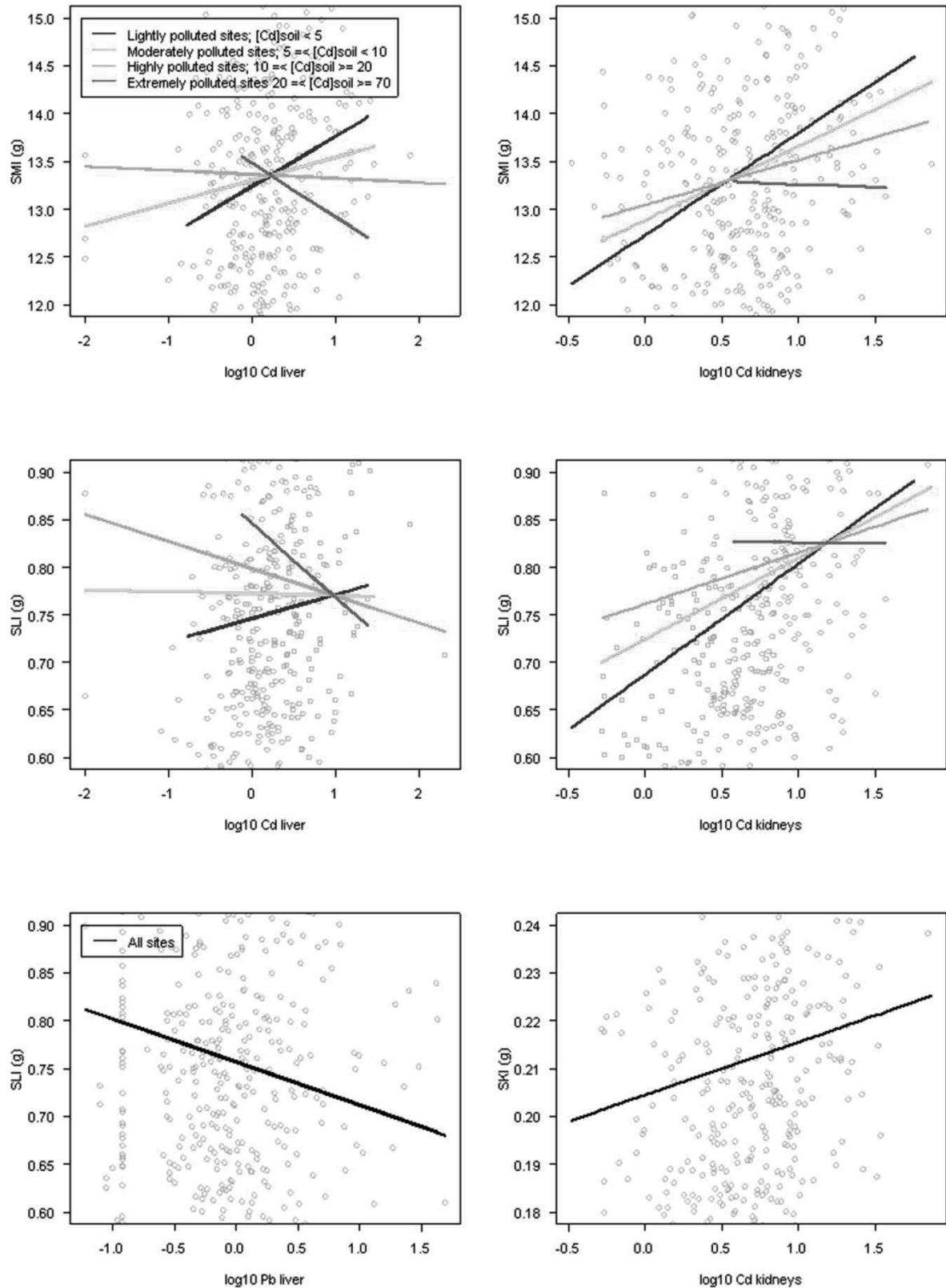


Figure III.2 Predicted relationships between indices and metal concentrations in organs ( $\mu\text{g/g DM}$ ). predictions between indices and TM concentrations are performed on wood mice from the former Metaleurop Nord smelter; (a) between SMI and  $[Cd]_{liver}$ ; (b) between SMI and  $[Cd]_{kidneys}$ ; (c) between SLI and  $[Cd]_{liver}$ ; (d) between SLI and  $[Cd]_{kidneys}$ ; (e) between SLI and  $[Pb]_{liver}$ ; and (f) between SKI and  $[Cd]_{kidneys}$ . For all figures, the age of individuals was

fixed (7 mg of crystalline lens mass, which corresponds to adulthood). For graphical representation, the “highly polluted” class was subdivided into two classes of contamination, “highly polluted” ( $10 \leq [\text{Cd}]_{\text{soil}} \leq 20 \mu\text{g/g DM}$ ) and “extremely polluted” ( $20 \leq [\text{Cd}]_{\text{soil}} \leq 70 \mu\text{g/g DM}$ ) in figures (a) to (d). For figures (a) and (b), predicted relationships are shown only for males. For figures (a) to (d), relationships between indices and TM concentrations are represented at different levels of soil contamination (lightly, moderately, highly and extremely polluted). Because interactions between concentrations in organs and soil were not significant in figures (e) and (f), predicted relationships are drawn for all contaminations levels.

Tableau III.3 Model outputs presenting partial  $R_{i,R}^2$  and  $p$ -values in brackets (F-statistics) for each variable and for the entire model.

	TMs variable	Age	Gender	[TM] <sub>soil</sub>	[TM] <sub>organ</sub>	Age:gender	[TM] <sub>soil</sub> : [TM] <sub>organ</sub>	$R_{i,R}^2$ (fixed effects)	$V^2$ (random effects)
SMI	Cd liver	0.15 ( $p < 0.001$ )	0.01 ( $p = 0.030$ )	0.02 ( $p = 0.028$ )	0.00 ( $p = 0.197$ )	0.05 ( $p < 0.001$ )	0.03 ( $p = 0.005$ )	0.26	0.38
	Cd kidneys	0.15 ( $p < 0.001$ )	0.01 ( $p = 0.027$ )	0.02 ( $p = 0.005$ )	0.02 ( $p = 0.004$ )	0.05 ( $p < 0.001$ )	0.02 ( $p = 0.011$ )	0.28	0.36
	Pb liver	0.17 ( $p < 0.001$ )	0.02 ( $p = 0.035$ )	NS	NS	0.06 ( $p < 0.001$ )	NS	NS	0.41
	Pb kidneys	0.17 ( $p < 0.001$ )	0.02 ( $p = 0.035$ )	NS	NS	0.06 ( $p < 0.001$ )	NS	NS	0.41
SLI	Cd liver	0.05 ( $p = 0.001$ )	NS	0.00 ( $p = 0.170$ )	0.00 ( $p = 0.989$ )	NS	0.04 ( $p = 0.004$ )	0.11	0.32
	Cd kidneys	0.04 ( $p = 0.001$ )	NS	0.00 ( $p = 0.563$ )	0.07 ( $p < 0.001$ )	NS	0.03 ( $p = 0.004$ )	0.14	0.30
	Pb liver	0.07 ( $p = 0.002$ )	NS	NS	0.05 ( $p = 0.008$ )	NS	NS	0.13	0.37
	Pb kidneys	0.13 ( $p = 0.002$ )	NS	NS	NS	NS	NS	0.13	0.35
SKI	Cd liver	0.27 ( $p < 0.001$ )	NS	NS	NS	NS	NS	0.27	0.34
	Cd kidneys	0.25 ( $p < 0.001$ )	NS	NS	0.01 ( $p = 0.023$ )	NS	NS	0.26	0.33
	Pb liver	0.27 ( $p < 0.001$ )	NS	NS	NS	NS	NS	0.27	0.34
	Pb kidneys	0.27 ( $p < 0.001$ )	NS	NS	NS	NS	NS	0.27	0.34

Models were constructed as follows: Index ~ age + gender + [TM]soil + landscape + [TM]organ + age:gender + age:[TM]organ + gender:[TM]organ + [TM]soil:[TM]organ + landscape:[TM]organ. Because landscape and two-way interactions between [TMs] in organs and age or gender were not significantly related to the studied indices in all tested models (LRT,  $p > 0.050$ ), these variables were not included in the table. When a two-way interaction was significant, all terms (even not significant ones) included in this interaction are presented in the table.

## 4 Discussion

---

### 4.1 Influence of individual variables on body condition and somatic indices: methodological considerations

---

Body condition and somatic indices are a much debated issue in ecology [2,4,9,10]. Calculation methods and interpretations of these indices are subjects of numerous discussions, including those on conceptual (relationships between indices and fitness) and applied (for instance, the use of BCI as useful non-lethal tools for wildlife and conservation studies) issues. In the ecotoxicology of wild small mammals, such indices have been scarcely used and have given inconsistent, if not contradictory, results. In the present work, we calculated the indices using the SMA method that has been shown to represent a better indicator of the relative size of energy reserves and other body components than the ordinary least square residuals, which was the most widely accepted calculation of condition indices until recently [9,10]. To enable meaningful comparison between individuals, this method of calculation of condition indices should remove the effects of ontogenetic growth (age) on the relationship between size and mass through standardisation [10]. Similarly, if males and females of a species exhibit a similar body shape, then differences in body condition indices between genders should not occur, even in the case of size dimorphism [10]. Contrary to the expected result of this new calculation, all the indices were influenced by age, and SMI was additionally influenced by gender. If the relationships of indices to age or gender are not due to experimental inaccuracies (e.g., measurements errors or prediction of body length from foot length), then the use of SMA models to consider allometric effects is insufficient to fully consider age- and gender-related patterns of mass/length relationships. It is reasonable to keep age and gender variables in models in an attempt to relate the indices, even “scaled mass” ones, to environmental variables of interest such as landscape and TM concentrations in the liver, kidneys and soil in the present case.

### 4.2 Influence of environmental characteristics on the indices

---

Our results showed that landscape type did not have a significant influence on SMI and somatic indices. To our knowledge, data considering the effect of landscape and/or habitat on body condition and somatic indices are scarce. The only relevant study we found is Tattersall et al. [27]: after cessation of breeding, male wood mice trapped in two sampling sites with the same characteristics had significant differences in body weight. The wood mice were significantly heavier in woodlands than along crop boundaries. In *Peromyscus leucopus*, an

American species ecologically equivalent to *A. sylvaticus*, body condition (assessed as the proportion of body mass to body size) was influenced by habitat succession induced by the use of herbicide and/or burning, with better conditions in artificially induced early successional habitats [28]. The authors suggest that an overall improvement in the nutritional quality of habitats might be involved rather than an increase of quantity of food, and the authors notice that an interaction with season often influences the effect of habitat on body condition and body mass. To our knowledge, SLI and SKI variations have not been studied in relation to landscape. Some studies, however, have used food quality or multiannual population cycle phases in the wild to investigate the indirect effects of habitat on somatic indices. For instance, Klemola et al. [29] tested the hypothesis of Seldal et al. [30], which states that chemical (proteinase inhibitors) plant defence induced by intensive grazing may cause cyclic fluctuations in the densities of small mammals and other herbivores. For this purpose, these authors studied the size of internal organs (pancreas and liver) as an indicator of nutritional state. These authors, however, did not observe obvious differences in the relative size of organs related to cycle phase [29]. Nonetheless, laboratory studies have found that the quality of food might lead to organ hypertrophy or hypotrophy. Harju and Tahvanainen [31] showed that when adult field voles, *Microtus agrestis*, were fed for two weeks with diets with increased levels of the birch *Betula pendula*, a diet item consumed by voles in times of high population densities, the field voles exhibited increased liver size. In their study on *P. leucopus*, McMurry et al. [28] found heavier livers and spleens in adult males from artificially induced early successional habitats. Taken together, these results suggest that habitat, most likely through food quality, may influence both body condition and somatic indices in wild small mammals.

Our results additionally showed that indices were largely variable between sites, which may be related to local unknown environmental features and ecological factors. Inclusion of the random effect of model sampling squares allowed consideration of site-specific index variability. This result raises questions regarding the number of sampling sites required and the number of animals that should be trapped in each site to consider site-specific variability of the markers under study. In fact, comparison of individuals from only one contaminated site *versus* one reference site (as commonly observed in the literature), could lead to misinterpretation of results even if the sites are selected for their apparent similarities.

#### 4.3 Use of somatic and condition indices as contamination and health status indicator

---

As the maximal internal Cd and Pb concentrations observed in this study are among the highest reported in wild rodents [6,32-34], one could argue that deleterious effects, and thus responses of the indices, would be obvious in such a contaminated site. This work considered individual (age, and gender for SMI models) variables and found slight but significant relationships between both condition and somatic indices and contamination variables (Cd and Pb) in the liver, in the kidneys, and in the environment. The relationships between SMI and Cd concentrations in the liver and kidneys differed depending on the level of soil contamination. SMI increased with Cd concentrations in both the liver and kidneys of animals living in lightly and moderately polluted areas, suggesting that these animals did not exhibit any adverse effects of internal contamination. However, the relationship became negative for animals trapped in highly polluted sites ( $[Cd] \geq 10 \mu\text{g/g DM soil}$ ). Previous studies have shown diminution or reduction tendency in body weight, carcass weight, and/or body condition in individuals from small mammal species that inhabit polluted sites [6,8,34,35]. Interpreted with other studied parameters, the decrease of this index in highly exposed animals was interpreted as a sign of poor health compared to the individuals living in a less polluted site. However, the attribution of these effects to TMs, other pollutants, or a combination of both remained speculative. The authors of several other studies failed to detect any significant differences in body condition/body weight in small mammals from polluted and reference sites [36,37]. The present results reveal complex relationships of SMI with both individual (age, gender, TM concentrations in tissues) and environmental (high intra- and inter-site variability) variables. Confounding variables included in this study contribute to an explanation of the discrepancies observed in the literature.

As for the SMI, results showed a slight but significant relationship between SLI and the Cd concentrations in kidneys; this relationship was dependent on the level of soil contamination. SLI increased with Cd in both the liver and kidneys of animals trapped in lightly and moderately polluted sites and decreased for animals trapped in highly polluted sites. The SLI was negatively influenced by Pb concentrations in the liver. Finally, the SKI was positively linked to Cd concentrations in the kidneys. An increase of the relative liver and/or kidney mass has been found in individuals from different species that live in contaminated sites compared to individuals from control sites [6,7,35,36,38]. The higher relative masses of the liver and kidneys were interpreted as structural alterations and oedema formations caused by exposure to elements or compounds at toxic levels [6,35,38]. However,



some authors failed to detect an adverse effect on relative organ mass [39]. We even found one study showing a reduced relative kidney mass in individuals from polluted sites compared to animals from reference populations [8]. Those findings highlight the difficulty of interpreting somatic indices as markers of TM toxicity.

Apart from the strong site-specific variability of indices, one of the most relevant study findings is that both body condition and somatic indices were related to TM concentration in organs and the degree of environmental contamination. The negative relationship between internal TM concentrations and indices in highly polluted sites has not been studied, but one could hypothesise that this negative effect is due to the reduction of food quality or food availability in the most contaminated sites.

## **5 Conclusion**

---

Most previous studies used body condition and somatic indices to discriminate populations inhabiting reference and polluted sites. In such a framework, most studies found lower body condition indices in individuals from polluted sites, suggesting a globally lower nutritional status in populations from contaminated areas. Similarly, liver and kidney indices usually showed higher relative organ masses in individuals from contaminated areas compared to those of reference animals, suggesting histopathological alterations or oedema. However, no direct evidence related those differences to pollution rather than other disturbances, such as food availability, food quality, or other variables that are rarely (if ever) studied in ecotoxicological studies. The present work used a large sample size of 560 individuals from 30 sites around a former Pb and Zn smelter, and we found slight yet significant relationships between body condition and liver indices, with interactions between Cd in the environment and Cd in the liver and kidneys. Relationships were significant between the liver index and Pb in the liver and between the kidney index and Cd in kidneys. Landscape, a variable used as an indirect indicator of habitat suitability, did not influence the indices, but the variability of indices between individuals sampled in different sites of capture was important. Studies based on the comparison of one reference and one contaminated site may be biased, with site-specific effects that may lead to misinterpretation of the results. Our work used indices calculated with a method that should consider allometry (due to gender dimorphism and growth) better than more classical methods (residuals from an ordinary least square regression), yet our indices were still influenced by the age of individuals (and gender for the body condition). Literature data show that indices may be influenced by season, food quality, or reproductive status. Based on the present results and literature data, we argue that indices are highly influenced by many biological and environmental parameters, and caution should be observed during index interpretation as an indicator of exposure to toxic elements or compounds. Even when used as part of a battery of parameters (histology, haematology, or biochemical biomarkers), the causal relationship between those indices and exposure to pollutants is rarely straightforward. For instance, it is well known that many histological alterations or haematological parameter variations may be due to infectious diseases, parasitism, or low quality and/or quantity of food [13]. Causal relationships between classical biomarkers used in wildlife ecotoxicology and various natural and anthropogenic stressors with which animals have to cope are greatly needed further research topics. Such research is

the purpose of *stress ecology*, an area of research for which several authors have advocated [40-42].

## 6 Acknowledgements

---

The authors gratefully thank Nadia Crini, Brice Mourier and Dominique Rieffel for their technical help and Cécile Grand from the *Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie* (ADEME) for fruitful scientific discussions. Jordi Peig is gratefully acknowledged for his help with calculation of the scaled mass index.

## 7 References

---

- [1] Stevenson RD, Woods Jr, Wittiam A (2006) Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integrative and Comparative Biology* 46: 1169-1190.
- [2] Green A (2001) Mass/length residuals: Measures of body condition or generators of spurious results? *Ecology* 82: 1473-1483.
- [3] Schulte-Hostedde A, Millar J, Hickling G (2001) Evaluating body condition in small mammals. *Canadian Journal of Zoology* 79: 1021-1029.
- [4] Schulte-Hostedde A, Millar J, Hickling G (2005) Condition dependence of testis size in small mammals. *Evolutionary Ecology Research* 7: 143-149.
- [5] Norrdahl K, Heinila H, Klemola T, Korpimaki E (2004) Predator-induced changes in population structure and individual quality of *Microtus* voles: a large-scale field experiment. *Oikos* 105: 312-324.
- [6] Sanchez-Chardi A, Peñarroja-Matutano C, Oliveira Ribeiro CA, Nadal J (2007) Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* 70: 101-109.
- [7] Sanchez-Chardi A, Nadal J (2007) Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part I. The greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Chemosphere* 68: 703-711.
- [8] Nunes A, Mathias M, Crespo A (2001) Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals. *Environmental Pollution* 113: 87-93.
- [9] Peig J, Green AJ (2009) New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118: 1883-1891.

[10] Peig J, Green AJ (2010) The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Functional Ecology* 26: 1323-1332.

[11] Fritsch C, Giraudoux P, Coeurdassier M, Douay F, Raoul F, Pruvot C, Waterlot C, de Vaufleury A, Scheifler R (2010) Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere* 81: 141-155.

[12] Cavia R, Cueto GR, Suárez OV (2009) Changes in rodent communities according to the landscape structure in an urban ecosystem. *Landscape and Urban Planning* 90: 11-19.

[13] Silva M, Hartling L, Opps SB (2005) Small mammals in agricultural landscapes of Prince Edward Island (Canada): Effects of habitat characteristics at three different spatial scales. *Biological Conservation* 126: 556-568.

[14] Burel F, Butet A, Delettre YR, Millàn de la Peña N (2004) Differential response of selected taxa to landscape context and agricultural intensification. *Landscape and Urban Planning* 67: 195-204.

[15] Kozakiewicz M, Van Apeldoorn R, Bergers P, Gortat T, Kozakiewicz A (2000) Landscape approach to bank vole ecology. *Polish Journal of Ecology* 48: 149–161.

[16] Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H, Perdrix E (2002) Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water, Air and Soil Pollution* 135: 173-194.

[17] Fritsch C, Coeurdassier M, Giraudoux P, Raoul F, Douay F, Rieffel D, de Vaufleury A, Scheifler R (2011) Spatially Explicit Analysis of Metal Transfer to Biota: Influence of Soil Contamination and Landscape. *PLoS ONE* 6(5): e20682.

[18] Le Louarn H, Quéré J, Butet A (2003) *Les Rongeurs de France - Faunistique et biologie*. Paris, France. 256 p.

[19] Chaline J, Baudvin H, Jammot D, Saint Girons M-C (1974) Les proies des rapaces. Petits mammifères et leur environnement. Paris, Ed. Doin 160 p.

[20] Fritsch C (2010) Utilisation intégrée de bioindicateurs pour la surveillance des sols et des écosystèmes terrestres / Integrated use of biomonitors for soil and terrestrial ecosystem survey. PhD Thesis of the University of Franche-Comté, 345 p.

[21] Quéré JP, Vincent JP (1989) Détermination de l'âge chez le Mulot gris par la pesée des cristallins. *Mammalia* 53(2): 287-293.

[22] Shore RF, Douben PET (1994) The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29: 101-112.

[23] Shore RF, Douben PET (1994) Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 134: 49-89.

[24] Bivand RS, Pebesma EJ, Gómez-Rubio V (2008) Applied spatial data analysis with R. Use R! series, Springer Business Media, LLC, New York, USA. 374 p.

[25] Magee L (1990) R<sup>2</sup> measures based on wald and likelihood ratio joint significance tests. *American Statistician* 44(3): 250-253.

[26] R Development Core Team (2012) R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available: <http://www.R-project.org>.

[27] Tattersall FH, Macdonald DW, Hart BJ, Manley WJ, Feber RE (2001) Habitat use by wood mice (*Apodemus sylvaticus*) in a changeable arable landscape. *Journal of Zoology London* 255: 487-494.

[28] McMurry ST, Lochmiller RL, Boggs JF, Leslie Jr DM, Engle DM (1996) Demography and condition of populations of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in late and early successional habitats. *Journal of Mammalogy* 77: 335-345.

[29] Klemola T, Koivula M, Korpimäki E, Norrdahl K (1997) Size of internal organs and forage quality of herbivores: are there differences between cycle phases in *Microtus* voles? *Oikos* 80: 61-66.

[30] Seldal T, Andersen KJ, Högstedt G (1994) Grazing-induced proteinase inhibitors: a possible cause for lemming population cycles. *Oikos* 70: 3-11.

[31] Harju A, Tahvanainen J (1994) The effect of silver birch (*Betula pendula*) powder on physiological performance of field voles (*Microtus agrestis*). *Annales Zoologici Fennici* 31: 229-234.

[32] Damek-Poprawa M, Sawicka-Kapusta K (2003) Damage to the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. *Toxicology* 186: 1-10.

[33] Shore RF, Rattner BA (2001) *Ecotoxicology of Wild Mammals*. London, UK: John Wiley & Sons. 752 p.

[34] Halbrook R, Kirkpatrick R, Scanlon P, Vaughan MR, Veit HP (1993) Muskrat populations in Virginia's Elizabeth river - physiological condition and accumulation of environmental contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25: 438-445.

[35] Ma WC (1989) Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18(4): 617-622.

[36] Sanchez-Chardi A, Oliveira Ribeiro C, Nadal J (2009) Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere* 76: 387-394.

[37] Knopper LD, Mineau P (2004) Organismal effects of pesticide exposure on meadow voles (*Microtus pennsylvaticus*) living in golf course ecosystems: developmental instability, clinical hematology, body condition, and blood parasitology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1512-1519.

[38] Milton A, Cooke JA, Johnson MS (2003) Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44: 405-411.

[39] Pereira R, Pereira ML, Ribeiro R, Gonçalves F (2006) Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus*) and Algerian mice (*Mus spretus*) from an abandoned mine area (Southern Portugal). *Environmental Pollution* 139: 561-575.

[40] van Straalen NM (2003) Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environmental Science and Technology* 37: 324A-330A.

[41] van den Brink PJ (2008) Ecological risk assessment: from book-keeping to chemical stress ecology. *Environmental Science and Technology* 42: 8999-9004.

[42] van Gestel CAM, van Straalen NM (2008) A stress ecology framework for comprehensive risk assessment of diffuse pollution. *The Science of the Total Environment* 406: 479-483.



---

*Chapitre 2: Hair as a non-lethal tool  
for risk assessment: do the  
concentrations of cadmium and  
lead in the hair of wood mice  
(*Apodemus sylvaticus*) reflect  
internal concentrations?*

---

Cet objectif a fait l'objet d'une publication, actuellement soumise dans la revue *Ecotoxicology and Environmental Safety*.



**Hair as a non-lethal tool for risk assessment: do the concentrations of cadmium and lead in the hair of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) reflect internal concentrations?**

**Nicolas Tête, Eve Afonso, Nadia Crini, Séverine Drouhot, Anne-Sophie Prudent,  
Renaud Scheifler**

**Abstract**

The aim of this work was to determine whether trace metal (TM) concentrations in hair could be used as an accurate non-lethal estimator of internal and environmental concentrations. For that purpose, 321 wood mice (*Apodemus sylvaticus*) were sampled on a 40 km<sup>2</sup> site around an ancient smelter over two sessions (fall 2010 and spring 2011) and the relationships between the cadmium (Cd) and lead (Pb) concentrations in hair and those in the liver, kidneys, and soil were described. The results indicated that hair concentration was a relatively good predictor of Pb concentrations in organs ( $0.46 < R^2 < 0.53$ ). In contrast, the Cd concentrations in organs were only weakly predicted by hair concentrations in session 2010 ( $R^2 = 0.10$ ), and no significant relationship was found in session 2011 ( $p > 0.050$ ). The Cd and Pb concentrations in the soil and in hair were related but could not be modeled by a linear model prediction. Linear equations representing internal concentrations as a function of hair concentrations differed significantly between the sampling sessions, especially for Cd. Individual characteristics (gender and body mass as a non-lethal estimation of relative age) increased the explained variability when they were included in Cd models but not in Pb models. In conclusion, hair should be used cautiously to predict internal Cd concentrations but can be considered as an accurate non-lethal estimator of internal Pb concentrations. Further studies should be performed to develop, generalize, and apply this useful possible tool for risk assessment in ecotoxicology.

### **Highlights**

- Metal concentrations in hair as predictors of those in organs are evaluated
- Individual characteristics (age, gender) and sampling sessions affected predictions
- Hair can be considered a useful estimator of Pb internal concentrations
- Cd concentrations in hair only weakly predicted Cd concentrations in organs
- Further studies should develop hair as a non-lethal tool for risk assessment

### **Keywords**

Bioaccumulation; Individual characteristics; Wildlife; Non-lethal approach; Trace metals

## 1 Introduction

---

Wild small mammals are commonly used as bioindicators of terrestrial ecosystem disturbances in ecotoxicology (Talmage and Walton, 1991), especially for risk assessments at polluted sites. When studying the transfer of pollutants from the environment to animal species, the most-used method is to trap animals, sacrifice them, and then to measure the internal concentrations of pollutants in their organs. However, the sacrifice of individuals not only potentially implies disturbances of population dynamics but also prevents time-related studies based on capture-mark-recapture techniques, e.g., toxicokinetic studies. Moreover, wildlife studies using lethal trappings are not relevant for endangered or protected species. For both ethical and technical reasons, these manipulations are thus increasingly discarded in favor of non-lethal sampling techniques.

Among samples that can be used in non-lethal ecotoxicological studies, hair has been proposed as an alternative tissue to measure the transfer of trace metals (TM) from the environment to individuals. Hair is continuously in contact with the bloodstream at the root and has a binding affinity for various metals (Beernaert et al., 2007; McLean et al., 2009). As a non-invasive approach, hair analysis is commonly used in human medicine (Li et al., 2011) and in farming (Nageeb Rashed and Soltan, 2005) to estimate internal TM concentrations. Concerning small mammals, studies have reported significant relationships between TM concentrations in organs and those in hair in marsupials (see McLean et al., 2009 for the Brown Antechinus, *Antechinus stuartii*), in rodents (see McLean et al., 2009 for the Brown Rat, *Rattus norvegicus*; McLean et al., 2009; Pereira et al., 2006 for the Black Rat, *Rattus rattus*, and Beernaert et al., 2007 for the wood mouse, *Apodemus sylvaticus*), and in insectivores (see D'Havé et al., 2006; 2007 and Vermeulen et al., 2009 for the European hedgehog, *Erinaceus europaeus*). In many cases, these studies have highlighted linear positive relationships between the hair concentrations of non-essential TMs (e.g., silver, aluminum, cadmium (Cd), cobalt, chromium, and lead (Pb)) and those in the liver, kidneys, muscles, blood, or in soils. However, the parameters of the linear equations relating TM concentrations in hair and those in other matrices (organs, blood, or soil) were very variable between species, and no study has been repeated on the same elements for the same species for comparison. To check the accuracy and the repeatability of hair analysis as a non-lethal tool for TM biomonitoring, comparisons for the same species between results obtained in controlled conditions and *in situ* conditions and between different field conditions are required.

Because it is omnivorous, widespread, and abundant in nature (Rogers and Gorman, 1995), the wood mouse has been frequently studied as a bioindicator of pollution in field studies (Beernaert et al., 2007; Frisch et al., 2010; Rogival et al., 2006, 2007; Sánchez-Chardi et al., 2007; Tête et al., 2013). However, to our knowledge, few studies have intended to relate the TM concentrations in organs to those in hair in the wood mouse, and only two works have dealt with Cd and Pb. The first study evaluated the strength of the relationships between hair and organ concentrations but with no attempt to model concentrations in organs from those in hair (Marcheselli et al., 2010). Only the second work aimed to predict Cd and Pb concentrations in the liver and kidneys from hair concentrations (Beernaert et al., 2007). The results suggested that the hair of wood mice could constitute a matrix that can be used for monitoring the exposure to TM (Beernaert et al., 2007).

In the present study, we hypothesized that including individual characteristics (such as relative age and gender) in models could improve predictions of Cd and Pb concentrations in organs according to hair concentrations. In fact, previous studies showed that some TMs, notably Cd, accumulate over an individual's lifespan with concentrations in the organs (Komarnicki, 2000; Rautio et al., 2010) and that sex-based dimorphism can lead to differences in contaminant burdens (Peakall and Burger, 2003). Although age and gender are easily collectable in lethal samplings (relative age can be estimated by the crystalline lens mass method (Quéré and Vincent, 1989), and gender determined by dissection), the use of alternative approaches is required when performing non-lethal samplings. In wood mice populations, molting occurs (Butet and Paillat, 1997) between the fall and spring seasons, and population age structure, metabolism, food resources, and thus diet habits can differ between seasons (Abt and Bock 1998; Corp et al., 1997; Khammes and Aulagnier, 2007; Rogers and Gorman, 2009). As these factors can also influence the bioavailability of TMs, the transfer of TMs along the food chain, and subsequently the accumulation of TMs in tissues, seasonal variations should be included in models relating organ and hair concentrations.

The aim of this study was to predict Cd and Pb concentrations in the liver, kidneys, and in the soil according to hair concentrations in a population of wild wood mice living in a highly polluted area along a gradient of contamination. As, in the present study, individuals were trapped over two sampling sessions (fall 2010 and spring 2011), animals from each session were analyzed separately to highlight potential organ/hair relationship differences between the sampling sessions. As predictions of internal concentrations by hair can potentially be improved by including individual characteristics, relative age and gender were integrated as explanatory variables in the models. Relative age was estimated using either an invasive

(crystalline lens mass) or a non-lethal (whole body mass) method, and gender was determined from the observation of the *perineum* region during dissection.

## 2 Materials and methods

---

### 2.1 Study site

---

Fieldwork was conducted in the vicinity of a former Pb and zinc (Zn) smelter called Metaleurop Nord (Noyelles-Godault, Nord-Pas-de-Calais, 50°25'42 N 3°00'55 E). The study area, spanning 40 km<sup>2</sup> around the former smelter, was divided into 160 squares of 500 x 500 m that constituted our sampling units. To evaluate the concentration of TMs in the soil (0–25 cm depth), composite samples (15 points in a homogeneous woody patch) were collected in five patches in each sampling unit during fall 2006. Soil TM levels ranged from 0.1 to 2,402 , from 16 to 41,960, and from 44 to 38,760 µg/g of dry matter (DM) for Cd, Pb, and Zn, respectively (Fritsch, 2010). An identification number (from 1 to 160) was assigned to each square around the smelter, as well as a category of landscape based on the square's primary land use (forest, urban, or agricultural) and a level of soil contamination based on the Cd and Pb concentrations (lightly (+), moderately (++) , or highly (+++) polluted soil) (Tableau III.). A control site (TE2), 10 km north of the study area, was also sampled during each session (Tableau III.).



Tableau III.1 Cd, Pb, and Zn median concentrations (µg/g DM) in the soil and in the liver, kidneys, and hair of wood mice for each sampling square. The level of contamination and landscape category of each unit are given. The range of concentrations is indicated in square brackets. For sampling session, “F/S” corresponds to squares sampled both in fall 2010 and in spring 2011 and “F” to squares sampled only in fall 2010. UDL = Under Detection Limit.

Sampling square	TE2	103	117	097	171	113	043
<b>Level of contamination</b>	Control	+	++	+++	++	++	++
<b>Landscape category</b>	Forest	Forest	Forest	Shrubland	Forest	Urban	Agricultural
<b>Sampling session</b>	F/S	F/S	F/S	F/S	F	F	F
<b>Soil</b>							
<b>(from Fritsch, 2010)</b>							
<b>Cd</b>	1.5 [0.86 – 2.5]	4.3 [1.6 – 6.0]	9.1 [3.6 – 13.3]	48 [15.3 – 78.6]	7.5 [5.5 – 14.1]	11.5 [3.9 – 10.8]	15.2 [1.3 – 15.2]
<b>Pb</b>	105 [43.3 – 199.8]	267 [237.5 – 333.0]	512 [244.6 – 805.6]	1295 [658.5 – 6,002.0]	584 [287.6 – 1,572.5]	679 [217.0 – 806.0]	323 [105.0 – 1,022.7]
<b>Zn</b>	168 [89.3 – 277.7]	352 [114.4 – 407.5]	556 [302.8 – 834.5]	1874 [1,069.2 – 7,263.5]	1362 [487.2 – 1,675.2]	1000 [294.0 – 1,170.4]	512 [153.9 – 920.7]
<b>Cd<sub>liver</sub></b>	1.2 [0.21 – 16.4]	3.5 [0.5 – 17.0]	7.4 [0.29 – 196.3]	2.8 [0.26 – 22.8]	1.7 [0.34 – 10.4]	1.0 [0.01 – 9.5]	1.2 [0.03 – 14.7]
<b>Cd<sub>kidneys</sub></b>	3.3 [0.30 – 40.3]	12.6 [1.2 – 34.8]	21.5 [1.3 – 120.0]	11.3 [1.2 – 76.2]	7.2 [0.6 – 38.4]	2.5 [UDL – 49.1]	2.4 [0.06 – 54.1]
<b>Cd<sub>hair</sub></b>	0.05 [UDL – 10.1]	0.05 [UDL – 0.23]	0.1 [UDL – 3.6]	0.4 [UDL – 4.5]	0.09 [UDL – 3.3]	0.04 [UDL – 15.4]	0.08 [UDL – 1.4]
<b>Wood mouse</b>	UDL	0.3 [UDL – 6.3]	0.5 [UDL – 5.9]	3.5 [0.19 – 33.6]	0.2 [UDL – 0.9]	0.6 [UDL – 4.2]	1.0 [UDL – 17.8]
<b>Pb<sub>liver</sub></b>	0.6 [UDL – 5.4]	2.2 [UDL – 35.0]	5.3 [0.6 – 281.7]	17.8 [3.4 – 268.3]	1.5 [UDL – 6.5]	4.5 [0.6 – 28.9]	4.7 [UDL – 111.8]
<b>Pb<sub>kidneys</sub></b>	0.6 [UDL – 4.4]	1.4 [0.6 – 6.1]	2.4 [0.9 – 7.1]	14.7 [1.9 – 86.7]	2.0 [UDL – 5.6]	1.4 [0.6 – 7.4]	2.3 [0.5 – 25.1]
<b>Pb<sub>hair</sub></b>							

## 2.2 Data collection

---

During the field sessions, 321 wood mice were collected around the former Metaleurop smelter. In fall 2010, 237 wood mice were trapped in seven squares (identification numbers 043, 097, 103, 113, 117, 171, and TE2); in spring 2011, 84 wood mice were trapped in four squares (numbers 097, 103, 117, and TE2); the squares where mice were trapped exhibited a large range of soil TM concentrations and land uses (Tableau III.1). Wood mice sampling was performed in woody habitats (hedgerows, copses, groves, and forests). Wood mice from fall 2010 were sampled using lines of baited snap traps. In spring 2011, animals were sampled using non-lethal traps (INRA live-traps), and only wood mice were sacrificed using cervical dislocation (a euthanasia technique approved for rodents in field situations by the American Veterinary Medical Association ethical guidelines, AVMA, 2013). At each site, 10 lines of 10 traps spaced 3 m apart were placed where the soil samples were collected. Individuals were frozen following capture and stored at -20°C until dissection. Individuals were weighed, measured, dissected, and sexed (through the observation of the perineum region during dissection). The crystalline lenses were sampled and kept in a 5% formalin solution. During dissections, at least 150 mg of hair from the lower left part of the back of each individual was shaved, and the liver and kidneys were sampled. Samples were stored at -20°C until analysis. The relative age of the rodents was estimated using two measures: the total body mass (including digestive tract and potential embryos) and the crystalline dry weight (protocol issued by Quéré and Vincent, 1989).

## 2.3 Evaluation of TM concentrations in tissues

---

Prior to the TM analyses, to remove external contamination, the hair samples were washed as advised by Peakall and Burger (2003). Washing consisted of six successive ultrasound baths of 5 mn, alternatively using three baths of acetone and three baths of ultra-pure water (UP water, Elga, 18.2 MΩ.cm). Samples (washed hair, liver, and kidneys) were then dried at 60°C to constant mass. The dried samples were then digested with nitric acid and diluted by adding ultra-pure water prior to AAS analyses. Concentrations of Cd and Pb were measured by furnace atomic absorption spectrometry (AAS, VARIAN 240Z) and expressed as µg/g dry mass (DM). Analysis accuracy was checked using certified references materials (TORT-2 and DOLT3, National Research Council Canada. Repeatability (within-run precision), the reproducibility of the measurements was surveyed (by checking RSD values and using internal standards), and quality control (using control solutions and blanks to check for the

absence of drift) was conducted during measurements. For concentrations under detection limits, half of the detection limit value was used for the statistical analyses. More details about the protocol, analytical quality control and detection limits are given in the Supplementary Material.

#### 2.4 Statistical analysis

---

Sex ratios were compared between sessions using a  $\chi^2$  test, and mean relative age, estimated by the crystalline lens mass of individuals, was compared between sessions using Fisher's test.

As the distributions of TM concentrations were skewed, the hair, liver, kidney, and soil concentrations for both Cd and Pb were log10-transformed. For each sampling session, the relationships between the TM concentrations in organs (liver or kidneys) and those in hair were studied using linear models and tested using Fisher's test. The normality of the distribution of residuals from the linear models was tested using the Kolmogorov-Smirnov test. As the residuals from the linear models between the TM concentrations in soil and those in the liver, kidneys, or hair were not normally distributed, those relationships were studied using Spearman's rank correlation.

Potential differences between sessions were tested using a Fisher test by including the variable "sampling session" and its interaction with hair concentration in the models. Final models were as follows:  $[TM]_{organ} \sim [TM]_{hair} + \text{sampling session} + [TM]_{hair} : \text{sampling session}$ .

For each sampling session, to observe whether individual characteristics improved predictions of TM concentrations in organs from concentrations in hair, total body mass (as an estimation of relative age) and gender were included in the models. Their relationship with the TM concentrations in organs was tested with Fisher's test. Prior to this analysis, to evaluate whether body mass was a good estimator of age, the relationship between the crystalline lens mass and the body mass was studied using a linear model and tested using Fisher's test. The normality of the distribution of residuals was checked for all linear models using Kolmogorov-Smirnov tests.

All results were considered significant when  $p < 0.050$ . All statistical analyses were performed using R 2.15.1 software (R Development Core Team, 2012) with the additional package "pgirmess".

### 3 Results

#### 3.1 Capture success, age, and gender

The capture success rate was 9% in fall 2010 and 6% in spring 2011, with corresponding sampling efforts of 2,238 and 1,436 trap-nights, respectively. For both sampling sessions, sex ratios were slightly biased in favor of males (0.59 and 0.55 in fall 2010 and spring 2011, respectively), and sex ratios did not significantly differ between the two sampling sessions ( $\chi^2 = 0.39$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.531$ ). On the other hand, mean crystalline lens mass significantly differed between sampling sessions ( $F = 187.7$ ,  $df = 1$  and 313,  $p < 0.001$ , Figure III.S1 Supplementary Material): individuals trapped during fall 2010 were significantly younger than the ones from spring 2011.

#### 3.2 Accumulation of TMs in the liver and kidneys in relation to soil accumulation

The individuals from each sampling square exhibited wide ranges of Cd and Pb concentrations in organs (Tableau III.). Concentrations of Cd in the liver did not significantly increase with Cd concentrations in soils for session 2010 ( $p = 0.972$ ) but did so for session 2011 ( $r_s = 0.34$ ,  $p = 0.001$ ). The same pattern was observed for Cd concentrations in the kidneys: the relationship with Cd in soils was not significant for session 2010 ( $p = 0.153$ ), whereas it was for session 2011 ( $r_s = 0.29$ ,  $p = 0.007$ ).

Lead concentrations in the liver were positively correlated with Pb concentrations in soils for both sessions (in 2010,  $r_s = 0.52$ ,  $p < 0.001$ ; and in 2011,  $r_s = 0.65$ ,  $p < 0.001$ ). Similar increases were observed in the kidneys for both sessions (for 2010,  $r_s = 0.50$ ,  $p < 0.001$ ; and for 2011,  $r_s = 0.67$ ,  $p < 0.001$ ).

Concentrations of Cd in the liver and kidneys were highly correlated for both sessions (in 2010,  $R^2 = 0.44$ ,  $F = 179.5$ ,  $df = 1$  and 229,  $p < 0.001$ ; and in 2011,  $R^2 = 0.62$ ,  $F = 134.2$ ,  $df = 1$  and 82,  $p < 0.001$ ). The same pattern was observed between Pb concentrations in the liver and in the kidneys (in 2010,  $R^2 = 0.61$ ,  $F = 362$ ,  $df = 1$  and 229,  $p < 0.001$ ; and in 2011,  $R^2 = 0.60$ ,  $F = 119.6$ ,  $df = 1$  and 82,  $p < 0.001$ ).

#### 3.3 Relationships between TM concentrations in organs or in soils and those in hair

Cadmium concentrations in hair weakly but significantly predicted concentrations in both the liver and the kidneys of individuals from session 2010 ( $R^2 = 0.10$ ,  $F = 25.2$ ,  $df = 1$  and 229,  $p < 0.001$  for liver; and  $R^2 = 0.10$ ,  $F = 26.0$ ,  $df = 1$  and 229,  $p < 0.001$  for kidneys, Tableau III., Figure IIIa and b). In session 2011, Cd concentrations in organs and in hair were

not significantly related ( $F = 1.3$ ,  $df = 1$  and  $82$ ,  $p = 0.252$  for liver, and  $F < 0.01$ ,  $df = 1$  and  $82$ ,  $p = 0.971$  for kidneys, Tableau III., Figure III d and e). Positive correlations were observed between the Cd concentrations in hair and those in soils for both sessions ( $r_s = 0.46$ ,  $p < 0.001$ , Figure III c for session 2010; and  $r_s = 0.33$ ,  $p = 0.002$ , Figure III f for session 2011).

For Pb, the relationships between concentrations in both organs and those in hair were significant, with a relatively high explained variability for both sessions (for session 2010:  $R^2 = 0.53$ ,  $F = 259.3$ ,  $df = 1$  and  $229$ ,  $p < 0.001$  for liver and  $R^2 = 0.49$ ,  $F = 216.0$ ,  $df = 1$  and  $229$ ,  $p < 0.001$  for kidneys; for session 2011:  $R^2 = 0.46$ ,  $F = 69.8$ ,  $df = 1$  and  $82$ ,  $p < 0.001$  for liver and  $R^2 = 0.46$ ,  $F = 70.9$ ,  $df = 1$  and  $82$ ,  $p < 0.001$  for kidneys, Tableau III., Figure III g, h, j, and k). Lead concentrations in hair were also correlated with soil concentrations for both sessions ( $r_s = 0.57$ ,  $p < 0.001$ , Figure III i for session 2010; and  $r_s = 0.70$ ,  $p < 0.001$ , for session 2011, Figure III).

Relationships between TM concentrations in organs and those in hair differed significantly between sampling sessions (Tableau III.). Intercepts (*i.e.*, TM concentrations in an organ for a theoretical null concentration in hair) differed between sampling sessions for Cd in the liver and kidneys and for Pb in the liver (Tableau III.). Moreover, for Pb in the liver, the slopes of the linear relation also differed between sampling sessions, with a stronger relationship between Pb in the liver and hair for session 2011 compared to session 2010 (Tableau III.).

#### 3.4 Impact of individual characteristics on hair predictions

---

The significant correlation and high explained variability between the crystalline lens mass and whole body mass ( $R^2 = 0.69$ ,  $F = 704.5$ ,  $df = 1$  and  $313$ ,  $p < 0.001$ ) suggested that body mass can be used here as an estimator of relative age instead of the commonly used crystalline lens mass (Figure III.S2 Supplementary Material). Body mass and gender were then included in the linear models to potentially improve the correlations between TM concentrations in organs and those in hair.

Body mass was significantly related to Cd in the liver and kidneys and to Pb in the liver for wood mice trapped in 2010, as well as to Cd in the kidneys for mice collected in 2011 (Tableau III.). Gender was significantly related to Cd in the liver for both sampling sessions and to Pb in the liver in 2010 (Tableau III.). Regarding Cd relationships, individual characteristics increased the explained variability of the models: for example, in 2010, the  $R^2$  for  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{liver}}$  modeling increased from 0.10 in the monovariate model (Tableau III.) to 0.27 in the multivariate model (Tableau III.). This was also true for the other models ( $R^2$

moved from 0.10 to 0.29 for  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{kidneys}}$  in 2010, and in session 2011, from 0.02 (not significant) to 0.11 for  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{liver}}$  with the exception of  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{kidneys}}$  modeling in 2011, which was still not significant after the addition of individual characteristics (Tableau III. and Tableau III.). In contrast to Cd, individual characteristics did not significantly improve the models for Pb (Tableau III.) except for the relationship between liver and hair Pb concentrations for session 2010.

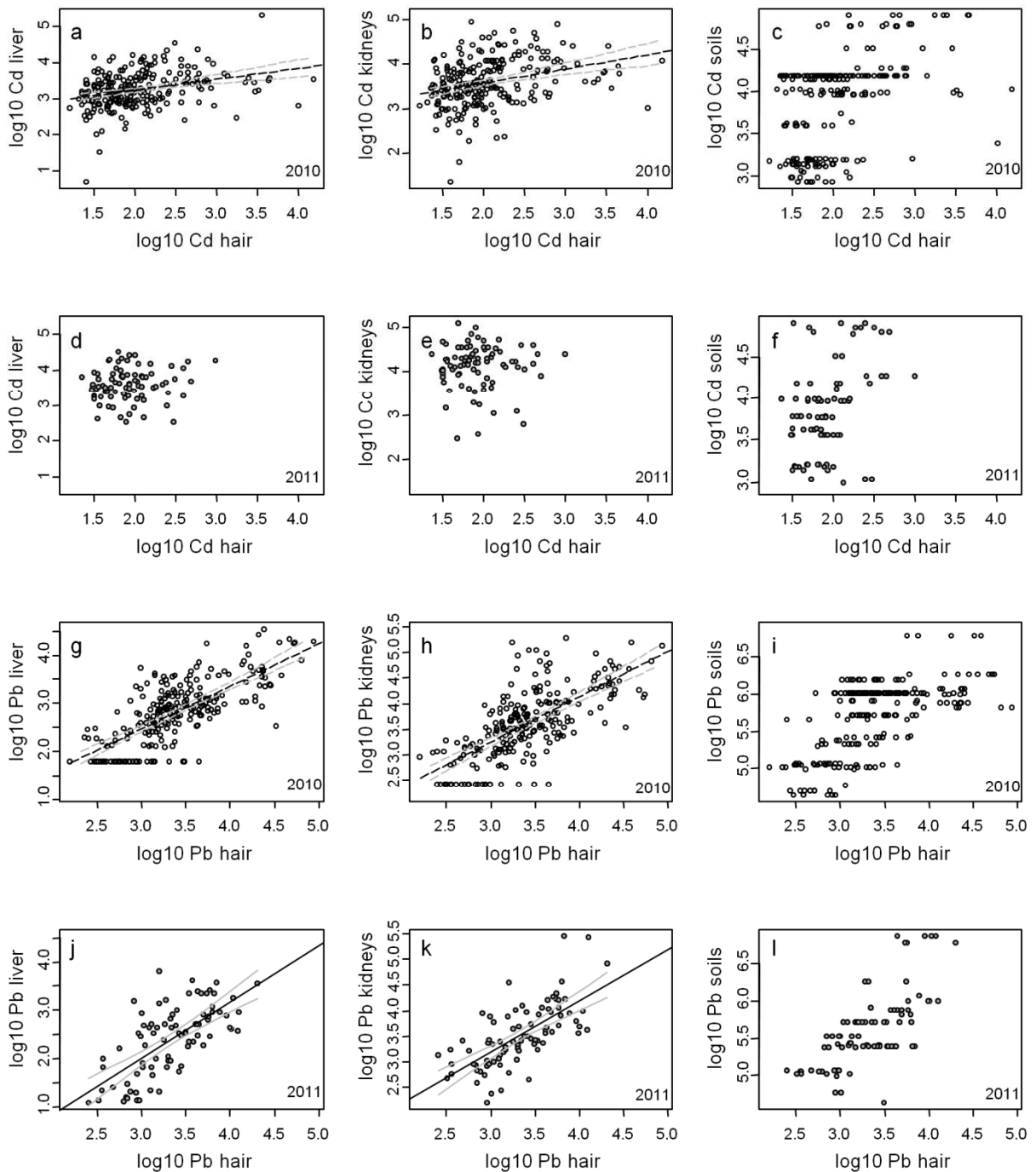


Figure III.1 Relationships between TM concentrations in the hair and organs of wood mice or in soil from the former smelter of Metaleurop Nord. For comparison with the literature, all graphics and linear equations are presented for  $\log_{10}$ -transformed concentrations expressed in ng/g. Linear regressions and 95% confidence intervals

(dashed lines) are plotted when relationships between TM concentrations in organs or in soil and those in hair are significant.

**For session 2010,** (a)  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{liver}} = 2.64 + 0.30 \cdot \log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$ ,  $R^2 = 0.10$ ,  $F = 25.2$ ,  $df = 1$  and  $229$ ,  $p < 0.001$ , (b)  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{kidneys}} = 2.94 + 0.32 \cdot \log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$ ,  $R^2 = 0.10$ ,  $F = 26.0$ ,  $df = 1$  and  $229$ ,  $p < 0.001$ , (c)  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{soils}}$  and  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$ ,  $r_s = 0.46$ ,  $p < 0.001$ , (g)  $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{liver}} = -0.17 + 0.88 \cdot \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$ ,  $R^2 = 0.53$ ,  $F = 259.3$ ,  $df = 1$  and  $229$ ,  $p < 0.001$ , (h)  $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{kidneys}} = 0.57 + 0.89 \cdot \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$ ,  $R^2 = 0.49$ ,  $F = 216.0$ ,  $df = 1$  and  $229$ ,  $p < 0.001$ , (i)  $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{soils}}$  and  $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$ ,  $r_s = 0.57$ ,  $p < 0.001$ .

**For session 2011,** (d)  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$  and  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{liver}}$ ,  $F = 1.3$ ,  $df = 1$  and  $82$ ,  $p = 0.252$ , (e)  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$  and  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{kidneys}}$ ,  $F < 0.01$ ,  $df = 1$  and  $82$ ,  $p = 0.971$ , (f)  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{soils}}$  and  $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$ ,  $r_s = 0.33$ ,  $p = 0.002$ , (j)  $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{liver}} = -1.50 + 1.17 \cdot \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$ ,  $R^2 = 0.46$ ,  $F = 69.8$ ,  $df = 1$  and  $82$ ,  $p < 0.001$ , (k)  $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{kidneys}} = 0.18 + 1.00 \cdot \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$ ,  $R^2 = 0.46$ ,  $F = 70.9$ ,  $df = 1$  and  $82$ ,  $p < 0.001$ , (l)  $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$  and  $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{soils}}$ ,  $r_s = 0.70$ ,  $p < 0.001$ .

**Tableau III.2 Relationships between hair/spine and liver/kidney/soil Cd and Pb concentrations in different small mammal species from the literature and from the present study. LM = Linear Models, NS = Not significant.**

Species	n	Matrix	Cd		Pb		Units	Statistics	Reference
			Liver	Kidneys	Liver	Kidneys			
<i>Apodemus sylvaticus</i> (fall 2010)	237	Hair	$R^2 = 0.10$ $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{liver}} = 2.64 + 0.30 * \log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$	$R^2 = 0.10$ $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{kidneys}} = 2.94 + 0.32 * \log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$	$R^2 = 0.53$ $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{liver}} = -0.17 + 0.88 * \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$	$R^2 = 0.49$ $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{kidneys}} = 0.57 + 0.89 * \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$	ng/g	F-test	Present study
<i>Apodemus sylvaticus</i> (spring 2011)	84	NS	NS	NS	$\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{liver}} = -1.50 + 1.17 * \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$	$\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{kidneys}} = 0.18 + 1.00 * \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$	ng/g	F-test	Present study
<i>Apodemus sylvaticus</i>	26	Hair	$R^2 = 0.69$	$R^2 = 0.61$	$R^2 = 0.32$	$R^2 = 0.38$	μg/g	Pearson	Marcheselli et al. (2010)
<i>Apodemus sylvaticus</i>	98	Hair	$R^2 = 0.30$ $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{liver}} = 2.64 + 0.63 * \log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$	$R^2 = 0.45$ $\log_{10}[\text{Cd}]_{\text{kidneys}} = 3.25 + 0.67 * \log_{10}[\text{Cd}]_{\text{hair}}$	$R^2 = 0.31$ $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{liver}} = 0.90 + 0.51 * \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$	$R^2 = 0.44$ $\log_{10}[\text{Pb}]_{\text{kidneys}} = 0.81 + 0.74 * \log_{10}[\text{Pb}]_{\text{hair}}$	ng/g	Pearson	Beernaert et al. (2007)
<i>Erinaceus europaeus</i>	43	Hair	NS	NS	$R^2 = 0.28$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{liver}} = 0.51 + 0.87 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{hair}}$	$R^2 = 0.43$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{kidneys}} = 0.24 + 0.92 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{hair}}$	ng/g	F-test	D'Have et al. (2006)
<i>Erinaceus europaeus</i>	43	Spine	$R^2 = 0.19$ $\log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{liver}} = 0.69 + 6.30 * \log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{spine}}$	$R^2 = 0.30$ $\log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{kidneys}} = 0.93 + 9.51 * \log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{spine}}$	$R^2 = 0.33$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{liver}} = 0.43 + 0.83 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{spine}}$	$R^2 = 0.38$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{kidneys}} = 0.24 + 0.74 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{spine}}$	ng/g	F-test	D'Have et al. (2006)
<b>Species</b>	<b>n</b>	<b>Matrix</b>	<b>Cd soil</b>	<b>Cd soil</b>	<b>Pb soil</b>	<b>Pb soil</b>	<b>Units</b>	<b>Statistics</b>	<b>Reference</b>
<i>Apodemus sylvaticus</i> (fall 2010)	237	Hair	$r_s = 0.46$	$r_s = 0.46$	$r_s = 0.57$	$r_s = 0.57$	ng/g	Spearman	Present study
<i>Apodemus sylvaticus</i> (spring 2011)	84	Hair	$r_s = 0.33$	$r_s = 0.33$	$r_s = 0.70$	$r_s = 0.70$	ng/g	Spearman	Present study
<i>Apodemus sylvaticus</i>	26	Hair	$R^2 = 0.44$	$R^2 = 0.44$	$R^2 = 0.50$	$R^2 = 0.50$	μg/g	Pearson	Marcheselli et al. (2010)
<i>Antechinus stuartii</i>	53	Hair	$R^2 = 0.15$ $\log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{hair}} = -0.54 + 0.69 * \log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.15$ $\log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{hair}} = -0.54 + 0.69 * \log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.06$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{hair}} = -0.23 + 0.60 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.06$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{hair}} = -0.23 + 0.60 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{soil}}$	μg/g	Pearson	Marcheselli et al. (2010)
<i>Rattus rattus</i>	40	Hair	$R^2 = 0.40$ $\log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{hair}} = -1.17 + 1.02 * \log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.40$ $\log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{hair}} = -1.17 + 1.02 * \log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.19$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{hair}} = 0.14 + 0.44 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.19$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{hair}} = 0.14 + 0.44 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{soil}}$	μg/g	F-test	McLean et al. (2009)
<i>Rattus norvegicus</i>	16	Hair	$R^2 = 0.34$ $\log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{hair}} = -1.10 + 1.12 * \log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.34$ $\log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{hair}} = -1.10 + 1.12 * \log_{10}[\text{Cd+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.49$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{hair}} = -0.29 + 0.64 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{soil}}$	$R^2 = 0.49$ $\log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{hair}} = -0.29 + 0.64 * \log_{10}[\text{Pb+I}]_{\text{soil}}$	μg/g	F-test	McLean et al. (2009)



Tableau III.3 Influence of the sampling session on the relationships between TM concentrations in organs and those in hair. Table shows partial  $R^2$  and  $p$ -values (in brackets) from F-tests for each variable (in bold when significant) and total explained variability ( $R^2$ ) of the complete models.

Response variable	Explanatory variables		$R^2$ of the complete model
	$\log_{10}$ [TM]	$\log_{10}$ [TM] in hair	
Cd liver	$R^2 = 0.05$ ( $p < 0.001$ )	$R^2 = 0.10$ ( $p < 0.001$ )	$R^2 = 0.15$
	$R^2 = 0.04$ ( $p < 0.001$ )	$R^2 = 0.19$ ( $p < 0.001$ )	
Cd kidneys	$R^2 = 0.48$ ( $p < 0.001$ )	$R^2 = 0.06$ ( $p < 0.001$ )	$R^2 = 0.23$
	$R^2 = 0.48$ ( $p < 0.001$ )	$R^2 = 0.01$ ( $p = 0.036$ )	
Pb liver	$R^2 = 0.48$ ( $p < 0.001$ )	$p = 0.430$	$R^2 = 0.55$
Pb kidneys	$R^2 = 0.48$ ( $p < 0.001$ )	$p = 0.814$	$R^2 = 0.48$

Tableau III.4 Influence of fresh body mass (as an estimator of relative age) and gender on the relationships between TM concentrations in organs and those in hair for both sampling sessions. Table shows partial  $R^2$  and  $p$ -values (in brackets) from F-tests for each variable (in bold when significant) and total explained variability ( $R^2$ ) of the complete models. NS = Not Significant.

Sampling session	Response variable log <sub>10</sub> TM concentration	Explanatory variables		$R^2$ of the complete model
		log <sub>10</sub> [TM] in hair	Fresh body mass (relative age)	
2010	Cd liver	<b><math>R^2 = 0.10</math></b> ( $p < 0.001$ )	<b><math>R^2 = 0.13</math></b> ( $p < 0.001$ )	<b><math>R^2 = 0.04</math></b> ( $p < 0.001$ )
	Cd kidneys	<b><math>R^2 = 0.10</math></b> ( $p < 0.001$ )	<b><math>R^2 = 0.19</math></b> ( $p < 0.001$ )	$p = 0.212$
2011	Cd liver	$p = 0.235$	$p = 0.124$	<b><math>R^2 = 0.11</math></b> ( $p = 0.021$ )
	Cd kidneys	$p = 0.970$	<b><math>R^2 = 0.05</math></b> ( $p = 0.032$ )	$p = 0.233$
2010	Pb liver	<b><math>R^2 = 0.53</math></b> ( $p < 0.001$ )	<b><math>R^2 = 0.03</math></b> ( $p < 0.001$ )	<b><math>R^2 = 0.01</math></b> ( $p = 0.008$ )
	Pb kidneys	<b><math>R^2 = 0.49</math></b> ( $p < 0.001$ )	$p = 0.240$	$p = 0.983$
2011	Pb liver	<b><math>R^2 = 0.47</math></b> ( $p < 0.001$ )	$p = 0.829$	$p = 0.376$
	Pb kidneys	<b><math>R^2 = 0.50</math></b> ( $p < 0.001$ )	$p = 0.050$	$p = 0.296$

## 4 Discussion

---

### 4.1 Use of hair as a non-destructive tool to predict internal and environmental TM concentrations

---

As a path for TM sequestration and excretion, hair accumulates TMs over the course of its growth, and accumulation is understood to be proportional to internal TM concentrations. In this study, Pb concentrations in both the liver and kidneys were significantly correlated with hair concentrations for both sampling sessions, and Cd concentrations in organs were weakly but significantly correlated with those in hair only for the 2010 session. Because the Cd and Pb concentrations in the organs of each individual were highly correlated, the equations for predictions from hair were very similar for the liver and kidneys (for both the slopes and the explained variability, Tableau III.).

To our knowledge, only three studies utilizing small mammals have tried to correlate Cd and Pb concentrations in organs and those in hair (results from these studies are provided in Tableau III.). Two of these works concerned the wood mouse (Beernaert et al., 2007; Marcheselli et al., 2010) and one insectivorous species, the European hedgehog (D'Havé et al., 2006). Authors found significant relationships between Cd concentrations in hair and those in the liver and kidneys for wood mice (Beernaert et al., 2007; Marcheselli et al., 2010, Tableau III.), but not for hedgehogs (D'Havé et al., 2006). When comparing linear regressions, the predictions of internal concentrations based on hair in previous works appear to be different from those in the present study. In the previous studies (Beernaert et al., 2007; Marcheselli et al., 2010), authors found better correlations between Cd concentrations in the liver and kidneys and those in hair (Tableau III.). The increase of Cd in organs predicted from Cd in hair was also approximately twice as high in the study from Beernaert et al. (2007) compared to the present study (Tableau III.). Moreover, in the present study, predictions of Cd concentrations in the organs (liver and kidneys) from hair were not significant for session 2010. This lack of significance may be explained by the fact that, for this session, Cd concentrations in organs did not significantly increase along the gradient of contamination, inducing unclear Cd accumulation patterns. On the other hand, when looking at Pb predictions, the results from the literature (Beernaert et al., 2007; D'Havé et al., 2006; Marcheselli et al., 2010) and the present study appear to be more similar (Tableau III.). The explained variability of Pb models from the literature and the present study range from 0.28 to 0.53 for the liver and from 0.38 to 0.49 for the kidneys (Tableau III.). Moreover, in the

literature, the variability of the slopes of predictions is globally lower for Pb than for Cd (Tableau III.).

Residual differences in predictions between studies may be due to multiple reasons. First, the comparison of our results with the hedgehog study is difficult because of species-related differences and notably because of the physiological differences between insectivores and rodents. Second, differences in slopes for the Pb and Cd predictions between the present study and the work of Beernaert (Beernaert et al., 2007) could be partially explained by the fact that, in their study, those authors excluded juvenile wood mice from their analyses. Juveniles were not excluded in the present work because molt is supposed to occur twice per year over the wood mouse's lifespan (Butet and Paillat, 1997) and should thus impact on the relationships between TM concentrations in the organs and hair no matter the relative age of individuals. However, to test whether the observed differences between studies were due to the presence of juveniles in the data set, the analyses were performed again with the exclusion of juveniles following the procedure described in Beernaert et al. (2007) (only individuals estimated to be older than 120 days were conserved, 47 individuals of the 321 captured were thus considered juveniles). The resulting equations and explained variability did not differ from those presented for the entire population and were not closer to those from Beernaert et al. (2007) (data not shown). Third, the animals from Beernaert et al. (2007) were trapped during the end of winter 2001 (from mid-February to the end of March), whereas animals from the present study were trapped in fall 2010 and spring 2011. Comparison between those two studies may thus not be accurate because of temporal variation. Finally, the important remaining difference between these studies may also be explained by site-specific parameters (*e.g.*, bioavailability of TMs, type of vegetation, food availability, diet...). Taking together, those differences may imply difficulties in extending formal equations to routinely use hair as a non-lethal tool, especially for Cd measurement.

Results from the present study showed highly significant but non-linear correlations between TM in soils and in hair. Hair-soil predictions were higher for Pb than for Cd concentrations. We found only two works relating Cd or Pb concentrations in soils and in the hair of small mammals (Marcheselli et al., 2010; McLean et al., 2009). These studies indicated significant increases in Cd and Pb concentrations in hair with those in soils for all studied species (three rodents and one marsupial species). Altogether, the results from previous and present studies suggest a significant relationship between levels of Cd and Pb in soils and those in hair but also highlight that the patterns differ depending on the study. This may be, for instance, due to species traits or the bioavailability of TM at particular study sites.

Despite the differences between these studies, it is notable that the coefficients of determination for the relationship between hair and soil concentrations were similar for the three species of rodents studied (the wood mouse, *Rattus rattus* and *Rattus norvegicus*) in the Marcheselli et al. (2010) and McLean et al. (2009) works (Tableau III.).

In the present work, the relationships between TM concentrations in organs and those in hair significantly differed between the two sampling sessions. TM concentrations for both the liver and the kidneys as a function of hair concentrations exhibited a sharper increase in spring 2011 than in fall 2010. As the individuals from spring 2011 were relatively older compared to fall 2010, molting may have occurred in springtime before the field session and may explain why animals trapped in spring exhibited lower levels of TM in hair but similar internal concentrations. Because available food resources are generally different between the fall and spring seasons (Abt and Bock 1998; Watts, 1968), the bioavailability of TM may also differ depending on the season.

#### 4.2 Influence of individual characteristics (body mass and gender) on the prediction of TM concentrations in organs from those in hair

---

As many individual characteristics can modulate the bioaccumulation of TM in animals (Peakall and Burger, 2003), age- and gender-related patterns may partially explain residual variability and improve model predictions. For instance, it is well known that under long-term exposure, Cd accumulates in the targeted organs over an individual's entire lifespan (Beernaert et al., 2007; Komarnicki, 2000; Shore and Douben, 1994a; Uchino et al., 1990). After considering TM concentrations in hair, relative age (estimated by body mass) was significantly related to Cd and Pb in the liver in session 2010 and to Cd in the kidneys for both sessions (Tableau III.). The addition of individual characteristics to the Cd models largely increased the proportion of explained variability compared to the Pb models. Rautio et al. (2010) studied the accumulation of eight metals in the kidneys, liver, and hair of an insectivorous species, the hedgehog (*Erinaceus europaeus*). These authors observed an increase in Cd concentration with the age of individuals in the liver and kidneys but not in hair. In the present study, except in the liver in 2010, no effect of age was detected on Pb accumulation. The weak effect of relative age (estimated by the body mass) on Pb concentrations in our study is consistent with the study of Beernaert (Beernaert et al., 2007). Those authors hypothesized that the absence of an age effect on Pb concentrations in organs could be because Pb accumulates preferentially in bone tissues with an age-related pattern (Shore and Douben, 1994b; Talmage and Watson, 1991).

Differences in accumulation between males and females have been highlighted in the literature in different species of small mammals (Beernaert et al., 2007; Komarnicki, 2000; Peakall and Burger, 2003; Sánchez-Chardi et al., 2007). In the present study, Cd concentrations in the liver for both sessions and Pb concentrations in the liver for session 2010 differed between males and females. Despite those results, as partial explained variability was small, gender did not appear to be highly related to internal concentrations in the present work (Tableau III.). However, we would advise including gender in further studies addressing the transfer and accumulation of TM, especially when sex ratios are skewed.

## 5 Conclusion

---

Given the need for developing non-lethal methods, TM concentrations in hair can constitute an alternative for TM burden estimation in internal tissues. In the present study, Cd concentrations in hair weakly predicted internal concentrations for session 2010 and were not significant for session 2011. The results indicated that relationships were not only species-specific, as highlighted in previous studies, but also time-specific and differed from previous works, making the development of this non-lethal tool even more complicated for Cd predictions. On the other hand, Pb concentrations in hair predicted internal concentrations in both organs more accurately than Cd, and predictions were weakly influenced by individual characteristics. Thus, the use of hair to estimate Pb concentrations in organs is a promising tool for non-lethal approaches, even though further studies are still needed to develop, generalize, and apply this tool in routine risk assessment. Peakall and Burger (2003) highlighted some environmental and individual characteristics that can modulate TM bioavailability, such as habitat composition, nutrition, and behavior. Those parameters should be integrated in further studies to develop more precise predictions.

If individual characteristics are considered in the estimation of TM concentrations in organs, their evaluation has to be adequate in the framework of a non-lethal approach. Gender, for instance, can be relatively easy to determine by a simple observation of the perineum region in adult individuals (without dissection) or by performing a conventional molecular analysis on tissues or feces sampled from each individual (Shaw et al., 2003). Estimation of the relative age of rodents by crystalline dry weight (Quére and Vincent, 1989) constitutes an invasive method and must be replaced. In this study, the results indicated that crystalline lens mass and body mass were highly correlated, and thus body mass, a non-invasive and easily accessible measure, could be used as an estimator of age in non-lethal approaches.

## 6 Acknowledgements

---

The authors gratefully thank Coline Druart for her help in analytical work. Field work was made possible thanks to the participation of Michaël Coeurdassier, Clémentine Fritsch, Patrick Giraudoux, Francis Raoul, and Dominique Rieffel. Cécile Grand from the ADEME is gratefully acknowledged for many scientific discussions. We would also like to thank the Conseil Régional de Franche-Comté and the ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) for financially supporting the present work.



## 7 References

---

Abt, K.F., Bock, W.F., 1998. Seasonal variations of diet composition in farmland field mice *Apodemus* spp. and bank voles *Clethrionomys glareolus*. *Acta. Theriol.* 43, 379-389.

AVMA - American Veterinary Medical Association - Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Available at: [https://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](https://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf)

Butet, A., Paillat, G., 1997. Insectivores et Rongeurs de France: le Mulot sylvestre *Apodemus sylvaticus* (Linné, 1758). *Arvicola.* 9, 7-23.

Beernaert, J., Scheirs, J., Leirs, H., Blust, R., Verhagen, R., 2007. Non-destructive pollution exposure assessment by means of wood mice hair. *Environ. Pollut.* 145, 443-451.

Corp, N., Gorman, M.L., Speakman, J.R., 1997. Ranging behaviour and time budgets of male wood mice *Apodemus sylvaticus* in different habitats and seasons. *Oecologia.* 109, 242-250.

D'Havé, H., Scheirs, J., Kayawe Mubiana, V., Verhagen, R., Blust, R., De Coen, W., 2006. Non-destructive pollution exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): II. Hair and spines as indicators of endogenous metal and As concentrations. *Environ. Pollut.* 142, 438-448.

D'Havé, H., Scheirs, J., Covaci, A., van den Brink, N.W., Verhagen, R., De Coen, W., 2007. Non-destructive pollution exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): IV. Hair versus soil analysis in exposure and risk assessment of organochlorine compounds. *Environ. Pollut.* 145, 861-868.

Fritsch, C. Utilisation intégrée de bioindicateurs pour la surveillance des sols et des écosystèmes terrestres / Integrated use of biomonitors for soil and terrestrial ecosystem survey. PhD Thesis. Besançon: University of Franche-Comté, 2010, p. 345.

Fritsch, C., Cosson, R.P., Coeurdassier, M., Raoul, F., Giraudoux, P., Crini, N., et al., 2010. Responses of wild small mammals to a pollution gradient: Host factors influence metal and metallothionein levels. *Environ. Pollut.* 158, 827-840.

Khammes, N., Aulagnier, S., 2007. Diet of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus* in three biotopes of Kabylie of Djurdjura (Algeria). *Folia zool.* 56, 243-252.

Komarnicki, G., 2000. Tissue, sex and age specific accumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) by populations of the mole (*Talpa europaea* L.) in a central urban area. *Chemosphere.* 41, 1593-1602.

Li Y., Yang L., Wang W., Li H., Lv J., Zou X., 2011. Trace element concentrations in hair of healthy Chinese centenarians. *Sci. Total Environ.* 409, 1385-1390.

Marcheselli, M., Sala, L., Mauri, M., 2010. Bioaccumulation of PGEs and other traffic-related metals in populations of the small mammal *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* 80, 1247-1254.

McLean, C.M., Koller, C.E., Rodger, J.C., MacFarlane, G.R., 2009. Mammalian hair as an accumulative bioindicator of metal bioavailability in Australian terrestrial environments. *Sci. Total Environ.* 407, 3588-3596.

Nageeb Rashed M., Soltan M.E., 2005. Animal hair as biological indicator for heavy metal pollution in urban and rural areas. *Environ. Monit. Assess.* 110, 41-53.

Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 56, 110-121.

Pereira, R., Pereira, M., Ribeiro, R., Gonçalves F., 2006. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus*, Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environ. Pollut.* 139, 561-575.

Quéré, J.P., Vincent, J.P., 1989. Détermination de l'âge chez le Mulot gris par la pesée des cristallins. *Mammalia.* 53, 287-293.

R Development Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org>

Rautio, A., Kunnasranta, M., Valtonen, A., Ikonen, M., Hyvärinen, H., Holopainen, I.J., et al., 2010. Sex, age, and tissue specific accumulation of eight metals, arsenic, and selenium in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). Arch. Environ. Contam. Toxicol. 59, 642-651.

Rogers, L.M., Gorman, M.L., 1995. The diet of the wood mouse *Apodemus sylvaticus* on set-aside land. J. Zool. 235, 77-83.

Rogival, D., Scheirs, J., de Coen, W., Verhagen, R., Blust, R., 2006. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. Environ. Toxicol.Chem. 25, 149-157.

Rogival, D., van Campenhout, K., Infante, H.G., Hearn, R., Scheirs, J., Blust, R., 2007. Induction and metal speciation of metallothionein in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a metal pollution gradient. Environ. Toxicol. Chem. 26, 506-514.

Sánchez-Chardi, A., Peñarroja-Matutano, C., Oliveira Ribeiro, C.A., Nadal, J., 2007. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. Chemosphere. 70, 101-109.

Shaw, C.N., Wilson, P.J., White, B.N., 2003. A reliable molecular method of gender determination for mammals. J. Mammal. 84, 123-128.

Shore, R.F., Douben, P.E.T., 1994a. The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. Ecotoxicol. Environ. Saf. 29, 101-112.

Shore, R.F., Douben, P.E.T., 1994b. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 134, 49-89.

Talmage, S.S., Walton, B.T., 1991. Small mammals as monitors of environmental contaminants. *Res. Environ. Contam. Toxicol.* 119, 47-145.

Tête, N., Fritsch, C., Afonso, E., Coeurdassier, M., Lambert, J.C., Giraudoux, P., et al., 2013. Can body condition and somatic indices be used to evaluate metal-induced stress in wild small mammals? *PLoS One* 8(6): e66399. doi:10.1371/journal.pone.0066399.

Uchino, E., Tsuzuki, T. Inoue, K., 1990. The effects of age and sex on 7 elements in Sprague-Dawley rat organs. *Lab. Anim.* 24, 253-264.

Vermeulen, F., D'Havé, H., Mubiana, V.K., Van den Brink, N.W., Blust, R., Bervoets, L., et al., 2009. Relevance of hair and spines of the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*) as biomonitoring tissues for arsenic and metals in relation to blood. *Sci. Total Environ.* 407, 1775-1783.

Watts, C.H.S., 1968. The Foods Eaten by Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*) and Bank Voles (*Clethrionomys glareolus*) in Wytham Woods, Berkshire. *J. Anim. Ecol.* 37, 25-41.

## 8 Supplementary Material

---

### 8.1 Detailed protocol for the measure of TM concentrations in tissues

---

Soft tissues (internal organs) were digested in nitric acid (5 mL HNO<sub>3</sub>, 65%, Carlo-Erba, analytical grade) at 65°C during 72 h. Hair was digested in a mix (1:3) of nitric acid and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at 65°C for 24h. After digestion, samples were diluted by adding UP water. Cadmium and Pb concentrations in hair and soft tissues of each individual were then measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS, VARIAN 220Z) and expressed as µg/g dry mass (DM) of the total sample. Blanks (nitric acid and UP water, or 1:3 nitric acid:hydrogen peroxide and UP water) and Certified Reference Materials (CRM: TORT-2, lobster hepatopancreas, and DOLT-3, dogfish liver, from the National Research Council Canada) were prepared and analyzed with the samples. Duplicates were performed for each analysis and repeated if the recovery standard deviation was above 5%.

### 8.2 Metrology for the measure of TM concentrations in tissues

---

For session 2010, average CRM recoveries were calculated for Cd at 108 ± 14% and 111 ± 16%, and for Pb at 92 ± 18% and 114 ± 19%, for DOLT-3 and TORT-2, respectively. Detection limits for session 2010 were 0.12 µg/g DM and 0.01 µg/g DM for liver, 0.52 µg/g DM and 0.05 µg/g DM for kidneys, and 0.39 µg/g DM and 0.02 µg/g DM for hair, for Pb and Cd, respectively. For session 2011, average CRM recoveries were calculated for Cd at 94 ± 20% and 97 ± 20%, and for Pb 98 ± 12% and 107 ± 11%, for DOLT-3 and TORT-2, respectively. Detection limits for session 2011 were 0.03 µg/g DM and 0.01 µg/g DM for liver, 0.32 µg/g DM and 0.04 µg/g DM for kidneys, and 0.39 µg/g DM and 0.04 µg/g DM for hair, for Pb and Cd, respectively. When a concentration value was under the detection limit, half of the detection limit value was assigned to the sample for statistical analyses.

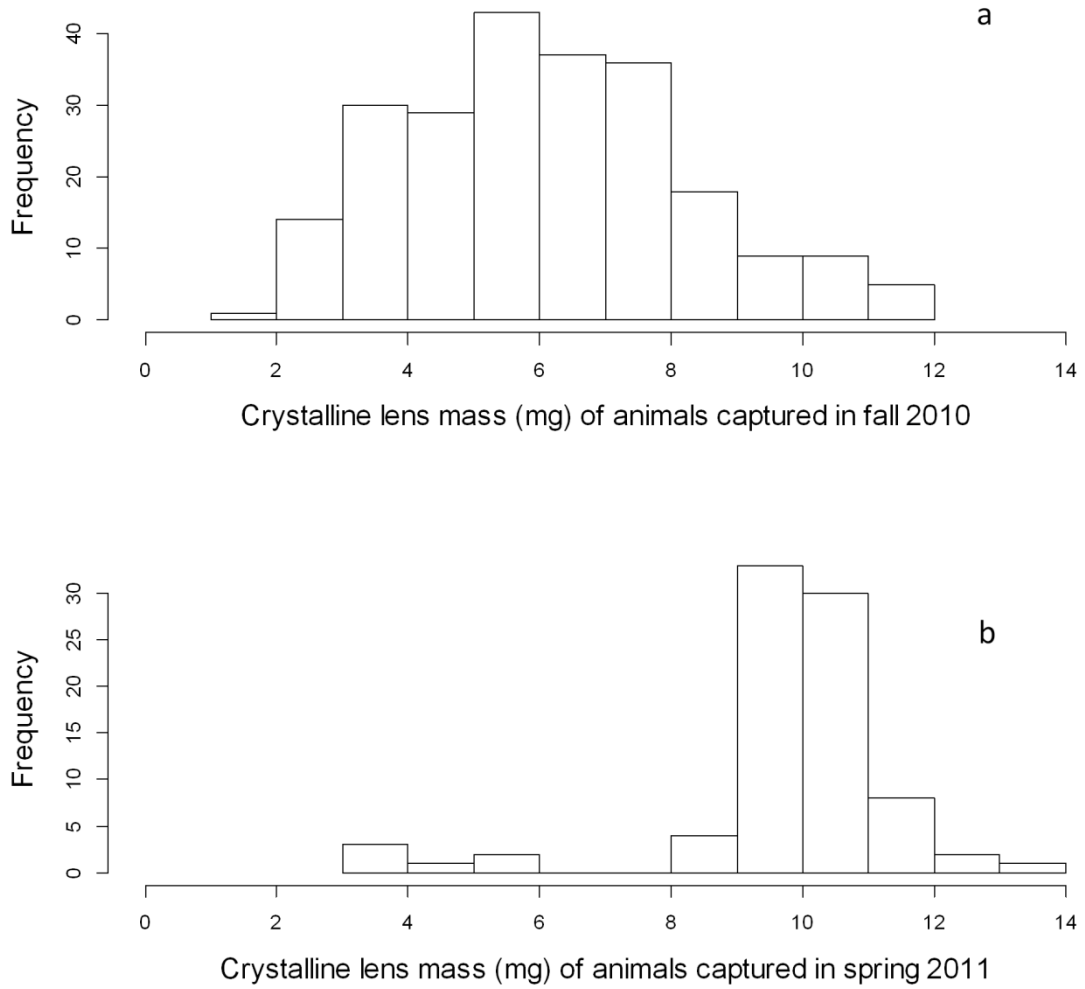


Figure III.S1 Age structure (distribution of crystalline lens mass) of wood mice captured (a) in fall 2010 and (b) in spring 2011.

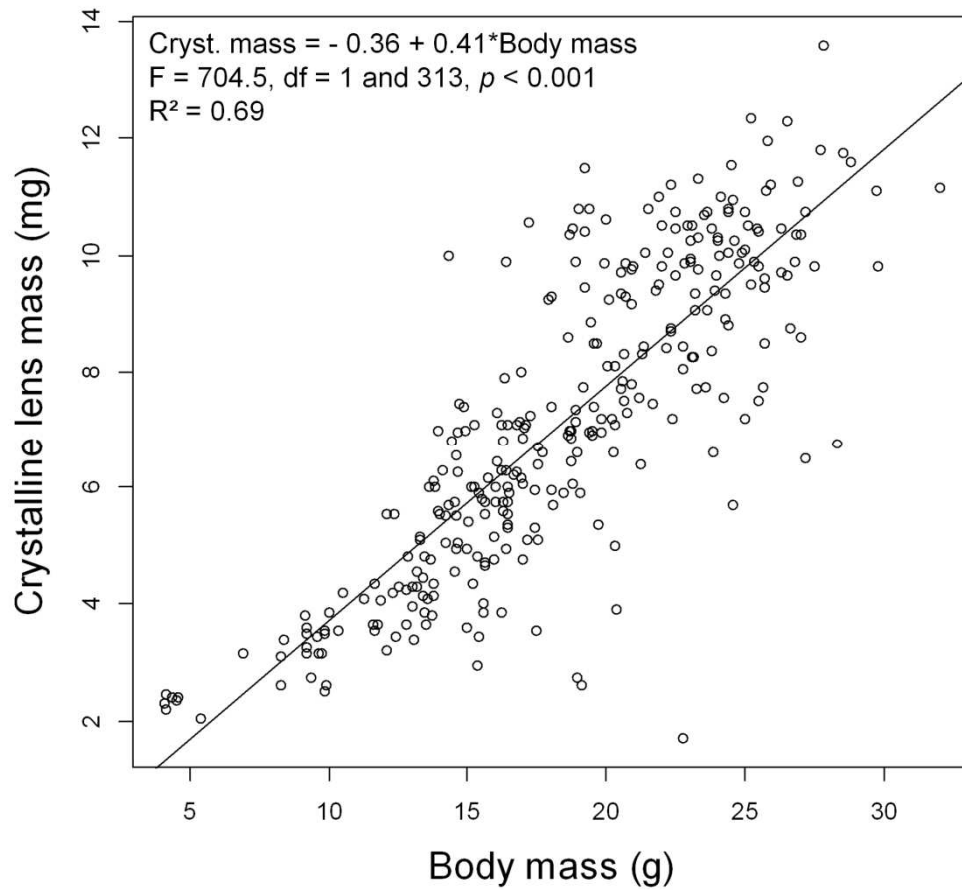


Figure III.S2. Relationship between crystalline lens mass (commonly used as an estimator of relative age) and the entire body mass (including digestive tracks and potential embryos) of wood mouse individuals ( $n = 315$ ) from Metaleurop.





---

# *Chapitre 3: Effets toxiques des ETMs au niveau histologique et hématologique*

---

Ce chapitre est composé de deux parties consacrées à l'évaluation des effets toxiques des ETMs chez les mulots sylvestres à travers l'observation d'altérations histologiques dans les organes cibles (Partie1) et de l'étude de plusieurs paramètres hématologiques (Partie 2).



---

# *Partie 1: Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, *Apodemus sylvaticus*, around a former smelter*

---

Cette partie de chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue Science of the Total Environment

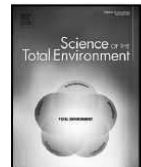
Science of the Total Environment 481 (2014) 167–177



Contents lists available at ScienceDirect

Science of the Total Environment

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/scitotenv](http://www.elsevier.com/locate/scitotenv)



Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, *Apodemus sylvaticus*, around a former smelter



Nicolas Tête <sup>a,\*</sup>, Mercè Durfort <sup>b</sup>, Dominique Rieffel <sup>a</sup>, Renaud Scheifler <sup>a</sup>, Alejandro Sánchez-Chardi <sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire Chrono-Environnement, UMR 6249 University of Franche-Comté/CNRS Usc INRA, 16 route de Gray, F-25030 Besançon Cedex, France

<sup>b</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal-643, E-08028 Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Servei de Microscòpia, Facultat de Ciències, Ed. C, Universitat Autònoma de Barcelona, E-08193, Bellaterra, Barcelona, Spain

<sup>d</sup> Departament de Biologia Animal, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal-643, E-08028 Barcelona, Spain



## **Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, *Apodemus sylvaticus*, around a former smelter**

**Nicolas Tête, Mercè Durfort, Dominique Rieffel, Renaud Scheifler, Alejandro Sánchez-Chardi**

### **Abstract**

The ceasing of industrial activities often reduces the emission of pollutants but also often leaves disturbed areas without remediation and with persistent pollutants that can still be transferred along the food chain. This study examines the potential relationships between non-essential trace metals and histopathology in target tissues of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) collected along a gradient of contamination around the former smelter, Metaleurop Nord (northern France). Cadmium and lead concentrations were measured, and histological alterations attributable to chronic trace metal exposure were assessed in the liver and the kidneys of 78 individuals. Metal concentrations quantified in the present study were among the highest observed for this species. Some histological alterations significantly increased with Cd or Pb concentrations in the soil and in the organs. Sixteen mice from polluted sites were considered at risk for metal-induced stress because their Cd and/or Pb tissue concentrations exceeded the LOAELs for single exposure to these elements. These mice also exhibited a higher severity of histological alterations in their organs than individuals with lower metal burdens. These results indicate that the Metaleurop smelter, despite its closure in 2003, still represents a threat to the local ecosystem because of the high levels and high bioavailability of Cd and Pb in the soil. However, among the mice not considered at risk for metal-induced stress based on the metal levels in their tissues, a large percentage of individuals still exhibited histological alterations. Thus, the present study suggests that the evaluation of toxic effects based only on the LOAELs for single metal exposure may result in the underestimation of the real risks when specimens are exposed to multiple stressors.

### **Highlights**

- Cd and Pb tissue levels and pathologies increase along a gradient of pollution
- Individuals considered at risk for metal-induced stress exhibit severe alterations
- Number of mice with alterations is higher than expected based on toxic thresholds
- Histological alterations constitute a suitable biomarker for metal exposure
- Persistent pollution constitutes a risk for wildlife inhabiting the abandoned site

### **Keywords**

Trace metals; Risk to wildlife; Persistent pollution; Biomarkers; Tissue injury.

Graphical abstract

Severity of alterations in wood mice in function of LOAELs thresholds for Cd- and Pb-induced stress in liver and kidneys

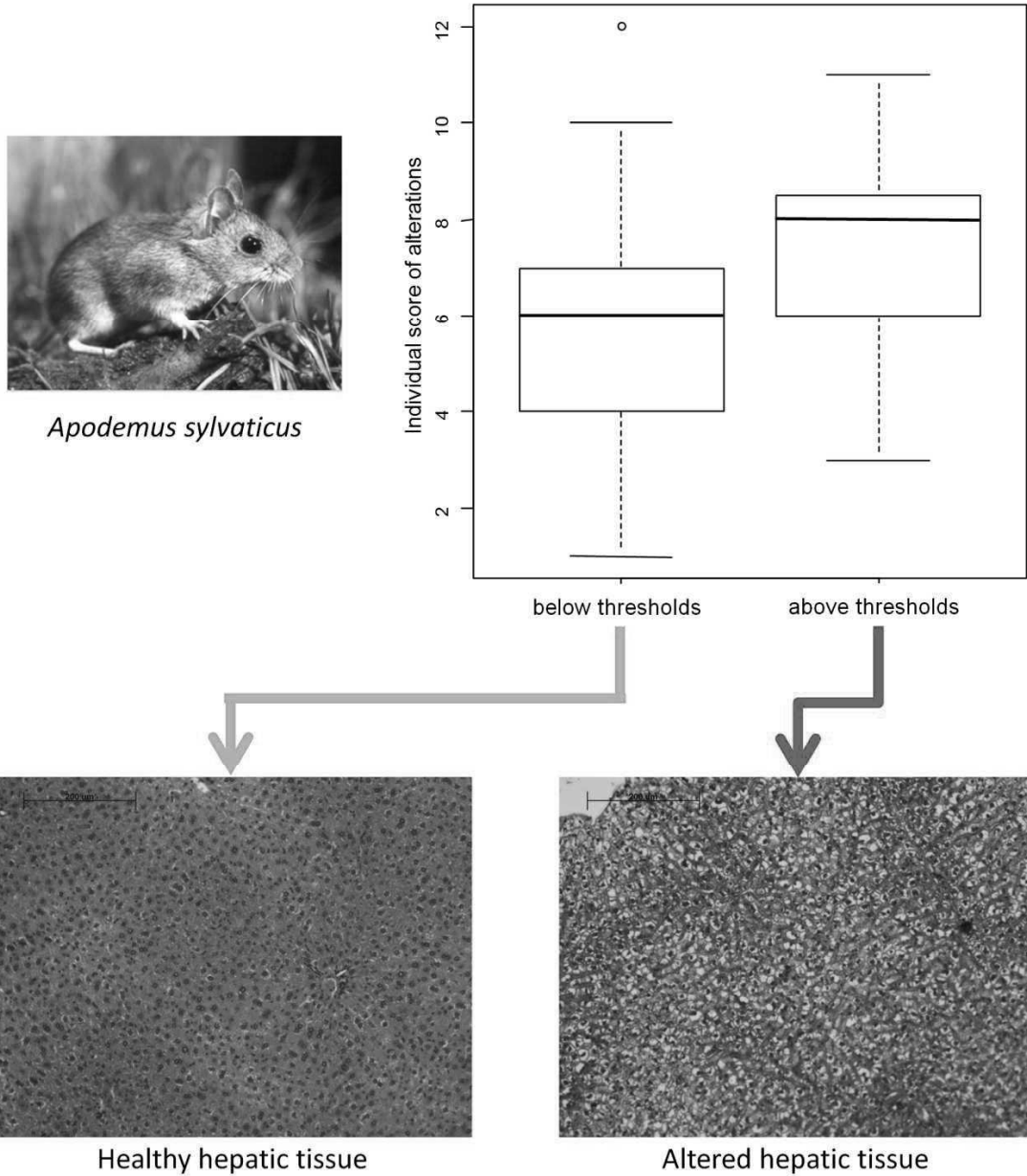


Figure III.0 Graphical abstract

## **1 Introduction**

---

Among the sources of potentially toxic chemicals released by human activities into the atmosphere, water, and soil, abandoned industrial sites represent an important threat to both human and ecosystem health. The ceasing of industrial activities often reduces the emission of pollutants but also often leaves the disturbed areas without remediation or control measures to reduce the environmental impact of persistent pollutants that can be transferred for long periods through the food chain (Chwelatiuk et al., 2005; Swiergosz-Kowalewska et al., 1998, 2001, 2005; Wlostowski et al., 2005). Metaleurop Nord (Noyelles-Godault, Nord-Pas-de-Calais, northern France), a former lead (Pb) and zinc (Zn) smelter, is a clear example of this important environmental concern and constitutes an interesting case-study to understand the long-term transfer and effects of trace metals (TMs) along a gradient of contamination. Previous surveys spanning 40 km<sup>2</sup> around the former smelter defined a wide impacted area and reported potentially toxic concentrations of TMs in biotic and abiotic compartments, even after the ceasing of industrial activity. After more than 100 years of activity (1894-2003), the soil of this area remains dramatically polluted by several trace metals. A previous study analyzed the concentrations of 18 TMs in urban topsoil and reported that the site is mainly polluted by cadmium (Cd), indium (In), Pb, antimony (Sb) and Zn (Douay et al., 2008). For example, TM levels in the soil of the polluted area range from 0.1 to 2,402 mg/kg for Cd, from 16 to 41,960 mg/kg for Pb and from 44 to 38,760 mg/kg for Zn, with concentrations depending on the prevailing SW-NE winds and decreasing with the distance from the Metaleurop smelter (Fritsch et al., 2010a). Ecotoxicological studies with autochthonous species representing different trophic levels of the local food chain reported tissue bioaccumulations of Cd and Pb reaching potentially toxic levels, demonstrating that these two non-essential metals are the main concern for environmental risk assessment. These biological models included earthworms (Bernard et al., 2010; Brulle et al., 2011), snails (Fritsch et al., 2011a, 2011b), rodents (Fritsch et al., 2010b, 2011b; Tête et al., 2013), insectivores (Fritsch et al., 2010a, 2011b) and birds (Coourdassier et al., 2012, Fritsch et al., 2012). Concerning human health, the concentrations of Cd and Pb in vegetables produced in some agricultural areas and kitchen gardens from the polluted area around Metaleurop do not conform with the European foodstuff legislation (Douay et al., 2013). Finally, when applying models for risk assessment of non-essential metal exposure using data from the Nord-Pas-de-Calais region in France, Metaleurop was one of the two largest regional risks with the Lille urban area (Caudeville et al. 2012). All this information highlights the fact that high levels of TMs in the



soil around Metaleurop, primarily Cd and Pb, are transferred through the trophic chain and may induce toxic effects in both the local wildlife and the human population.

Hepatic and renal tissues are the two principal targets for the accumulation and the toxic effects of acute and chronic exposure to Cd and Pb, especially when these persistent TMs are ingested through the diet, the most important exposure route in mammals (Shore and Rattner, 2001). As a general mechanism, when metal concentrations exceed the binding capacity of metallothioneins (Rogival et al., 2007b; Swiergosz-Kowalewska, 2001), free metallic ions may damage cellular structures, for example, inducing oxidative stress (Chwelatiuk et al., 2005; Sanchez-Chardi et al., 2009a). The toxic effects of these TMs in the liver and the kidneys include genotoxic damage that may lead to necrosis and/or apoptosis (Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2003; Jacoby et al., 2002; Liu et al., 2010; Salinska et al., 2012; Sanchez-Chardi et al., 2009a, 2009b; Wlostowski et al., 2000) or chronic inflammation that can increase cancer risk (Chwelatiuk et al., 2005; Salinska et al., 2012). Moreover, in the liver, steatosis may be indicative of important disturbances such as cirrhosis; in the kidneys, glomerular hyperplasia and tubular degeneration indicate a compensatory mechanism following the decrease in renal excretory function (Ceruti et al., 2002; Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2003, 2004; Pereira et al., 2006; Salinska et al., 2012; Sanchez-Chardi et al., 2009a; Wlostowski et al., 2000, 2004, 2010). Histopathological analyses are carried out to easily identify and quantify these important structural alterations, which are considered to be biomarkers that provide interesting ecotoxicological information, especially when combined with internal concentrations of TMs as a biomarker of exposure (Ceruti et al., 2002; Brzóska et al., 2003; Damek-Propawa and Sawicka-Kapuska, 2003, 2004; Pereira et al., 2006; Salinska et al., 2012; Sanchez-Chardi et al., 2008, 2009a, 2009b; Zhang et al., 2011).

For biomonitoring purposes, several species of small mammals have been used in ecotoxicological studies and have been shown to be suitable for the study of environmental pollution (Ceruti et al., 2002; Nawrot et al., 2008; O'Brien et al., 1993; Pereira et al., 2006; Sanchez-Chardi et al., 2009a, 2009b; Shore and Rattner, 2001). Among these terrestrial species, the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) is a particularly suitable bioindicator, as it is widely distributed in Europe, omnivorous, widespread, abundant in nature (Rogers and Gorman, 1995), and reacts to anthropogenic disturbances (*e.g.*, Rogival et al., 2006, Sanchez-Chardi et al., 2007, Scheirs et al., 2006, Tersago et al., 2004). Recently, several ecotoxicological studies carried out in France (Drouhot et al., 2014; Fritsch et al., 2010b; Tête et al., 2013), Spain (Fernández et al., 2012; González et al., 2006, 2008; Sánchez-Chardi et

al., 2007, 2009a; Torres et al., 2004, 2006), Portugal (Lopes et al., 2002; Lourenço et al., 2013), Belgium (Beernaert et al., 2007, 2008; Berckmoes et al., 2005; Rogival et al., 2006, 2007a, 2007b; Scheirs et al., 2006; Tersago et al., 2004), Holland (van den Brink et al., 2010, 2011; Wijnhoven et al., 2007), Bulgaria (Topashka-Ancheva et al., 2003), Slovakia (Martiniaková et al., 2010, 2012), Italy (Marcheselli et al., 2010), United Kingdom (Erry et al., 1999, 2005; Ismail and Roberts, 1992; Milton and Johnson, 1999, 2002; Milton et al., 2002, 2003, 2004; Shore, 1995; Sneddon et al., 2009) and Ireland (Milton et al., 2002, 2003, 2004) evaluated several biomarkers of exposure and effect in natural populations of wood mice inhabiting polluted sites. Overall, the different studies reported that this species is particularly interesting for ecotoxicological studies because it bioaccumulates metals and metalloids in its hard and soft tissues. Moreover, several biomarkers at molecular, biochemical, cellular, physiological and morphological levels have been related to anthropogenic disturbances. Despite these efforts mainly based on biomarkers of exposure, there is still relatively little information on the results of chronic metal exposure on biomarkers of effect. For example, there is an evident lack of information about histological pathologies attributed to pollution in target tissues in *Apodemus sylvaticus*. Structural alterations have only been evaluated once in wood mice, which were impacted by the effluents of a landfill (Sánchez-Chardi et al., 2009a). Specifically, there is no information on the structural alterations caused by chronic exposure to high levels of Cd and Pb along a gradient of pollution.

By sampling wild wood mice along a pollution gradient primarily contaminated by two non-essential TMs (Cd and Pb) and by an essential element (Zn), the aims of this work were (1) to estimate internal concentrations of Cd and Pb in target organs (the liver and the kidneys) as a biomarker of exposure, (2) to qualify histological alterations attributed to pollution and to quantify the severity of the observed pathologies as biomarkers of effect, (3) to correlate histological alterations with Cd and Pb concentrations in organs and in the soil along the gradient of contamination, and (4) to relate the severity of the observed histological alterations with the thresholds for toxic effects (Lowest Observed Adverse Effect Levels (LOAELs) for Cd and Pb in liver and kidneys) and thus discuss the potential risk of chronic exposure to TMs for terrestrial wildlife.

---

## 2 Materials and methods

---

### 2.1 Study site

---

The field work was conducted around the site of the former smelter, Metaleurop Nord (50°25'42 N 3°00'55 E). Cadmium and Pb concentrations in soils and in organs were evaluated in the present study, because they have been demonstrated to be highly toxic (Shore and Rattner, 2001). The impacted area was divided into 160 squares of 500x500 m that constituted our sampling units (Fritsch et al., 2010a). One control site (hereafter named “-”), approximately 10 km north-east of the Metaleurop smelter, was compared with three representative sampling units located around the former smelter that were selected according to their levels of Cd and Pb in soils: one lightly “+”, one moderately “++”, and one highly “+++” polluted square. Cadmium and Pb soil contamination characteristics for each sampling unit are shown in Tableau III.1.

### 2.2 Small mammal collection and sample preparation

---

During spring 2011 (from the 3<sup>rd</sup> to the 15<sup>th</sup> of April), a total of 84 wood mice were trapped along the gradient of contamination: 17 individuals on the “-” site, 18 on the “+” site, 27 on the “++” site and 22 on the “+++” site (Tableau III.2). Wood mice were trapped using non-lethal INRA traps baited with fresh straw, sunflower seeds and apple pieces. In each of the four squares, 100 traps (10 lines of 10 traps, 3 m-spaced) were placed in woody patches (hedgerows, copses, tree plantations and forests) for 3 nights, with a total effort of 1200 trap-nights. Sampling authorization was given by the *Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement* (DREAL) of Nord-Pas-de-Calais. Wood mice were euthanized in the field by cervical dislocation following the American Veterinary Medical Association ethical guidelines (AVMA, 2013). In each specimen, gender was determined during dissection, and crystalline lenses were removed and put in a 3% formaldehyde solution to estimate the relative age by the dry crystalline lens mass (protocol described by Quéré and Vincent, 1989). The liver and the kidneys of the mice were collected and preserved for subsequent chemical and histopathological analyses immediately after cervical dislocation to avoid early post-mortem necrosis.

Tableau III.1 Minimum, median, mean, and maximum Cd and Pb concentrations ( $\mu\text{g DM}$ ) in the soil. Results are presented for each square (pollution level).

	Control (-)			Lightly polluted (+)			Moderately polluted (++)			Highly polluted (+++)					
	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max	Min	Median	Max			
<b>Cd</b>	1.1	1.5	1.4	1.6	5.8	5.2	6.0	3.6	9.1	7.0	13.3	15.3	31.9	44.6	78.6
<b>Pb</b>	96.1	111.7	99.8	237.5	270.2	280.1	333.0	244.6	512.0	407.7	805.6	658.5	1,008.1	2,871.9	7,330.6

### 2.3 Quantification of Cd and Pb in tissues

---

Samples of hepatic and renal tissues from each individual were dried until their weight was constant (one week; 45°C) and digested using nitric acid (HNO<sub>3</sub>, 65%, Carlo-Erba analytical quality) in a dry oven (65°C) for 72 h (Fritsch et al., 2010b, 2011b; Tête et al., 2013). Then, samples were diluted in ultra-pure water (18.2 MΩ/cm<sup>2</sup>) prior to the quantification of Cd and Pb levels using furnace atomic absorption spectrometry (AAS, VARIAN 240Z). All TM levels were expressed as µg/g of dry mass (DM). Blanks (nitric acid + ultra-pure water) and two certified reference materials (CRM: TORT-2, lobster hepatopancreas, and DOLT-3, dogfish liver, from the National Research Council Canada) were also analyzed along with the tissue samples. Duplicates were performed for each sample, and if the RSD was above 5%, the analyses were repeated. Average recoveries of the CRMs were calculated at 94 ± 20% and 97 ± 20% for Cd and 98 ± 12% and 107 ± 11% for Pb for DOLT-3 and TORT-2, respectively. Detection limits in organs were 0.03 µg/g DM and 0.01 µg/g DM for the liver and 0.32 µg/g DM and 0.04 µg/g DM for the kidneys for Pb and Cd, respectively. When a concentration value was under the detection limit, half of the detection limit value was used for statistical analyses.

### 2.4 Histopathological evaluation

---

Small pieces of the liver and left kidney were fixed in 10% neutral-buffered formaldehyde and processed for the histopathological assessment as described in Sanchez-Chardi et al. (2009a). Briefly, after three weeks in the fixative solution, the tissues were washed with distilled water and stored in 70% ethanol solution. Then, the tissues were dehydrated in ethanol, cleared in toluene and embedded in Paraplast Histocomp (Vogel, Gießen, Germany). Sections between 5 and 10 µm thick were stained with hematoxylin and eosin using standard procedures, mounted in DPX and observed with a Leitz DMRB light microscope with a Leica DC 500 camera. Two observers (NT and ASC) established the same criteria for histopathological evaluation and analyzed a minimum of three sections of each sample codified in a “blind” manner to avoid subjective bias. Only the pathologies attributed to pollution exposure were included in the present work (Liu et al., 2010; Salinska et al., 2012, 2013; Wlostowski et al., 2000). Based on the severity and the extent of the lesions, the alterations were measured on a conventional semi-quantitative scale: without alteration (0), lightly altered (1), intermediately altered (2), and strongly altered (3). A score between 0-3 was assigned for each alteration in each sample in order to correlate pathologies with metal

accumulation. Then, a global score between 0-3 was assigned to each organ (hereafter called the “tissular score”) in order to relate the pathologies with the site of capture (protocol described by Sanchez-Chardi et al., 2009a). To evaluate the toxic effects of Cd and Pb and to summarize adverse effects observed in each individual, all alteration scores from both organs (liver and kidneys) were summed to obtain a global alteration score for each individual (hereafter called the “individual score”). Laboratory derived thresholds (LOAELs) described from Shore and Douben (1994a, 1994b) for toxic effects of Cd and Pb in small mammals were used: 15 µg/g DM in the liver and 105 µg/g DM in the kidneys for Cd and to 10 µg/g DM in the liver and 25 µg/g DM in the kidneys for Pb. Individuals exhibiting one or more internal concentrations above these levels were considered “at risk” for metal-induced stress.

## 2.5 Statistical analyses

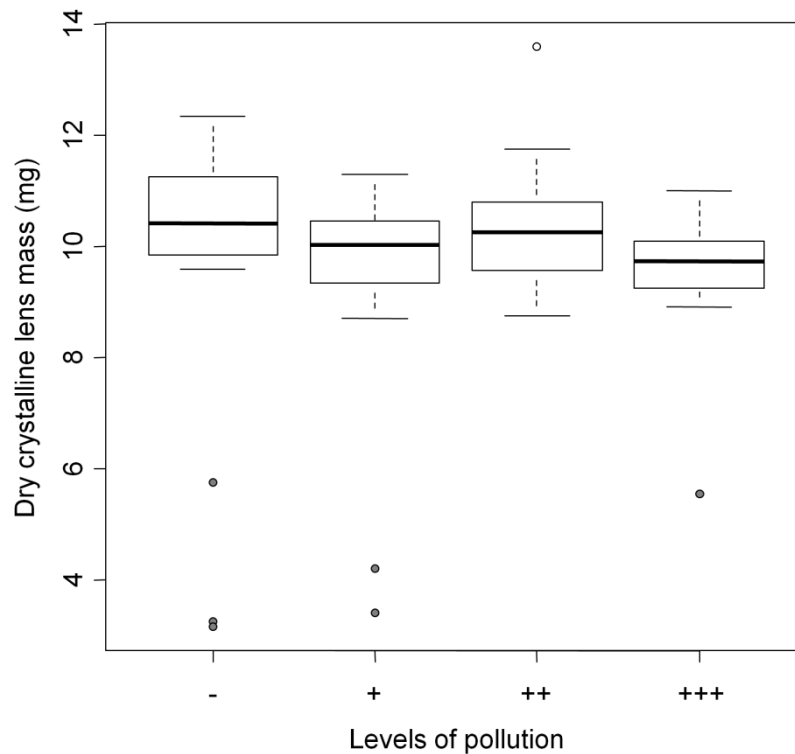
---

The sex ratios and the mean ages of the wood mice collected in each square along the gradient of contamination were compared using  $\chi^2$  and Fisher tests, respectively. Because the distributions of Cd and Pb concentrations in the organs and in the soil were skewed, the variables were normalized for statistical analyses using  $\log_{10}$  transformation. The levels of Cd and Pb accumulation in hepatic and renal tissues along the contamination gradient were compared using Fisher tests, and the pairwise differences were determined using Tukey’s HSD post-hoc multiple comparison test. To test the potential influence of biotic factors, the variations of TM concentrations in mouse tissues in relation with age (crystalline lens mass) or gender were studied using Fisher tests. Potential relationships between TM concentrations in the liver and in the kidneys were also studied using Fisher tests. The normality of residual distributions from linear models was tested using Kolmogorov-Smirnov tests. The relationships between the severity of alterations and the TM concentrations in the organs or in the soil were tested using Spearman rank correlations. To test the influence of biotic factors on the biomarkers evaluated, the differences in alteration severities as a function of age (crystalline lens mass) or of gender were tested using Fisher tests and Fisher's exact tests for contingency tables, respectively. Finally, the potential differences in the mean tissular scores and in the mean individual scores along the contamination gradient or as a function of the threshold limits for metal-induced stress were tested using Kruskal-Wallis tests or Mann-Whitney tests, respectively. All results were considered to be significant when  $p < 0.050$ . All statistical analyses were performed using R 2.15.1 software with the additional library “pgirmess” (R Development Core Team, 2012).

### 3 Results

#### 3.1 Wood mouse sample characteristics

The wood mouse sex ratio was skewed slightly in favor of males (0.55,  $\chi^2 = 10.035$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.018$ , Tableau III.2), mainly because only two females (out of 17 total individuals) were trapped in the control site (Tableau III.2). No mean age differences (estimated by crystalline lens mass) were observed along the gradient of contamination ( $F = 1.083$ ,  $df = 3$  and 80,  $p = 0.361$ ). The population was composed primarily of adults (78 adult mice and only six juveniles, Tableau III.2, Figure III.1). Juveniles were thus considered outliers and were excluded from the dataset for further analyses.

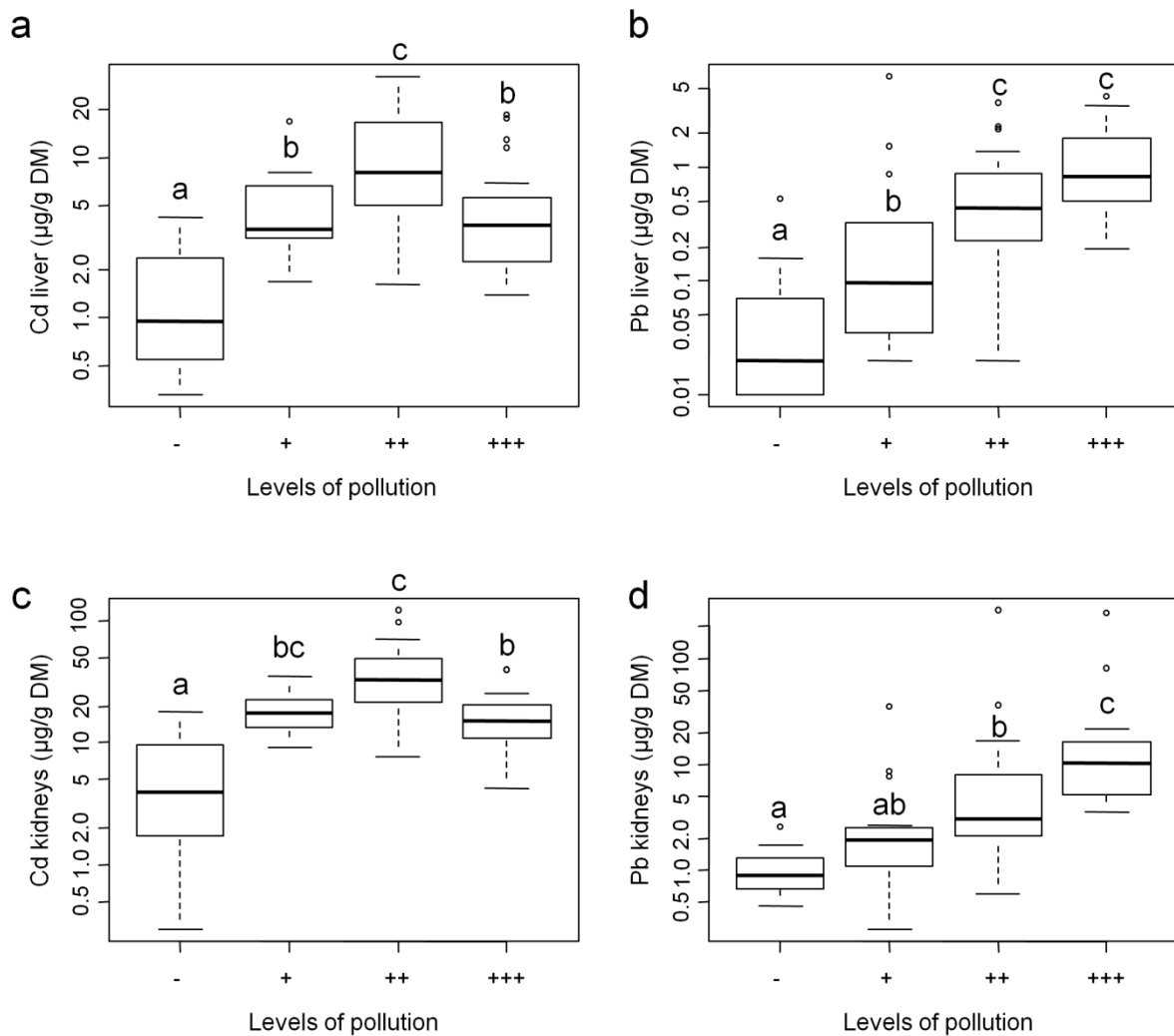


**Figure III.1** The dry crystalline lens mass (mg), as an estimation of wood mouse age, as a function of the gradient of contamination. The six grey circles correspond to the juvenile wood mice considered as outliers and thus excluded from the dataset

#### 3.2 Accumulation of TMs in wood mice

The concentrations of Cd and Pb in mouse tissues showed a high variability along the gradient of contamination, with values ranging from 0.3 (control site) to 120.0  $\mu\text{g/g DM}$  for Cd and from under the limit of detection (control site) to 281.7  $\mu\text{g/g}$  for Pb (Tableau III.3, Figure III.2). The concentrations of Cd in both the liver and the kidneys of mice differed

significantly along the gradient of contamination and showed a bell-shaped curve (in the liver,  $F = 21.679$ ,  $df = 3$  and  $74$ ,  $p < 0.001$ , and in the kidneys,  $F = 27.347$ ,  $df = 3$  and  $74$ ,  $p < 0.001$ , Figure III.2a and c, respectively). Concentrations of Pb in the liver and the kidneys increased significantly along the gradient of contamination from the control “-” site to the highly polluted “+++” site ( $F = 24.665$ ,  $df = 3$  and  $74$ ,  $p < 0.001$  in the liver, and  $F = 16.741$ ,  $df = 3$  and  $74$  and  $p < 0.001$  in the kidneys, Figure III.2b and d). No effect of age or gender could be detected on the concentrations of Cd and Pb in the liver or the kidneys ( $p > 0.050$ ). There was a significant correlation between the concentrations of TMs in the liver and in the kidneys in each individual (linear regressions,  $F = 99.773$ ,  $df = 1$  and  $76$ ,  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.57$  for Cd, and  $F = 125.470$ ,  $df = 1$  and  $76$ ,  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.62$  for Pb).



**Figure III.2**  $\log_{10}$ -transformed concentrations ( $\mu\text{g/g DM}$ ) of Cd in the liver (a), Pb in the liver (b), Cd in the kidneys (c) and Pb in the kidneys (d) as a function of the gradient of contamination. Different letters indicate significant differences among groups (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).



Tableau III.2 Number of individuals captured in each square (pollution level) by age and sex (in brackets: ♂, ♀).

	Control (-)	Lightly Polluted (+)	Moderately Polluted (++)	Highly Polluted (+++)	Total
<b>Juvenile</b>	3 (3, 0)	2 (1, 1)	0	1 (1, 0)	6 (5, 1)
<b>Adult</b>	14 (12, 2)	16 (8, 8)	27 (13, 14)	21 (8, 13)	78 (41, 37)
<b>Total</b>	17 (15, 2)	18 (9, 9)	27 (13, 14)	22 (9, 13)	84 (46, 38)

Tableau III.3 Cd and Pb concentrations in the liver and the kidneys reported for *A. sylvaticus* sampled in polluted (P), reference (R) or multiple (M) sites located across Europe.

UDL = Under detection limits, DW = Dry weight, WW = Wet weight, SD = standard deviation, SEM = Standard error around the mean, NC = Not communicated.

Site	N	Cd				Pb				Reference
		Liver	Kidneys	Liver	Kidneys	Units	Descriptive statistics			
R (-)	17	1.4 [0.3 - 4.3]	5.1 [0.3 - 17.8]	0.09 [UDL - 0.5]	1.0 [UDL - 2.6]	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$	Mean		Current study	
P (+)	18	4.8 [1.7 - 17.0]	17.4 [1.9 - 34.8]	0.6 [UDL - 6.3]	4.2 [UDL - 35.0]		[Range]			
P (++)	27	11.2 [1.6 - 32.1]	38.1 [7.7 - 120.0]	0.8 [UDL - 3.7]	16.0 [0.6 - 281.7]					
P (+++)	22	5.6 [1.4 - 18.6]	16.5 [4.3 - 40.1]	1.3 [0.2 - 4.2]	24.8 [3.5 - 268.3]					
R	11	0.16 ± 0.06	0.7 ± 0.27	0.05 ± 0.02	0.33 ± 0.19	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$	Mean ± SD		Lourenço et al. (2013)	
P	10	0.32 ± 0.17	1.35 ± 0.49	0.04 ± 0.02	0.25 ± 0.15					
P (+)	121 and 122	2.5 [0.14 - 38]	5.4 [0.33 - 68]	0.72 [0.12 - 1.3]	3.4 [0.52 - 26]	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$	Mean		Tête et al. (2013)	
P (++)	178	4.1 [0.01 - 209]	5.5 [0.35 - 154]	0.95 [0.12 - 1.4]	8.1 [0.52 - 151]		[Range]			
P (+++)	261 and 260	3.7 [0.01 - 91]	8.8 [0.53 - 332]	3.4 [0.12 - 50]	43.2 [0.52 - 1282]					
M	4 to 63	0.020 to 0.400	0.050 to 1.51	0.115 to 0.596	0.160 to 4.88	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{WW}$	Range		Fernandez et al. (2012)	
P	27		4.0 ± 3.1 [0.08 - 14.4]			$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$	Mean ± SD [Range]		van den Brink et al. (2011)	
R	23	2.8 [0.5 - 12.6]	12.4 [1.8 - 44.2]	0.2 [UDL - 3.8]	2.7 [0.5 - 72.3]	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{DW}$	Median [Range]		Fritsch et al. (2010b)	

III. Résultats – Chapitre 3 – Partie I

P	25	5.2 [1.5 – 18.8]	30.9 [13.3 – 136.7]	3.9 [0.3 – 14.4]	39.7 [9.9 – 149.5]	Mean estimated from graphs	Marcheselli et al. (2010)
R	6	~ 0.05	~ 0.24	~ 0.2	~ 1.1	µg·g <sup>-1</sup> DW	
P	6	~ 0.16	~ 0.4	~ 0.3	~ 2.0		van den Brink et al. (2010)
P	9		0.18 [0.06 – 1.81]		1.62 [0.06 – 22.0]	Mean [Range]	
P	27		9.85 [0.82 – 86.6]		1.87 [0.51 – 15.4]		
R	23	0.30 ± 0.08	0.92 ± 0.24	0.41 ± 0.05	0.73 ± 0.08	µg·g <sup>-1</sup> DW	Sanchez-Chardi et al. (2009a)
P	27	0.44 ± 0.15	1.44 ± 0.48	0.68 ± 0.11	1.10 ± 0.18		
R	21	1.75 ± 0.21	15.1 ± 2.1	0.17 ± 0.03	0.70 ± 0.14	µg·g <sup>-1</sup> DW	Beermaert et al. (2007)
P	25	31.44 ± 6.99	105.5 ± 17.4	0.61 ± 0.10	3.03 ± 0.39		
R	24	< 2	< 5	< 0.1	< 0.2	µg·g <sup>-1</sup> DW	Regival et al. (2007a)
P	21	20 – 25	50 – 60	1.2 – 1.4	1.2 – 1.4		
R	24	< 2	< 5			µg·g <sup>-1</sup> DW	Regival et al. (2007b)
P	21	15 – 20	40 – 50				
R	21	2.30 ± 0.58	21.0 ± 6.2	0.21 ± 0.06	0.70 ± 0.14	µg·g <sup>-1</sup> DW	Scheirs et al. (2006)
P	25	41.38 ± 11.99	135.7 ± 26.9	0.77 ± 0.19	2.78 ± 0.32		
R	14	95.8 ± 89.5	398.2 ± 297.3	17.6 ± 11.1	104.4 ± 79.5	ng·g <sup>-1</sup> WW	Torres et al. (2006)
P	24	239.6 ± 187.4	959.2 ± 764.8	23.1 ± 13.9	144.8 ± 125.7		
M	8	0.07 ± 0.02 [0.03 – 0.09]	0.25 ± 0.26 [0.15 – 0.97]			µg·g <sup>-1</sup> WW	Kramarova et al. (2005)
R	8	0.30 ± 0.11	1.1 ± 0.45			µg·g <sup>-1</sup> DW	Milton et al. (2004)
P	8	3.0 ± 1.7	13 ± 10				
R	11	1.67 ± 0.26		0.46 ± 0.10		µg·g <sup>-1</sup> DW	Tersago et al. (2004)
P	10	9.74 ± 2.17		6.08 ± 2.19			
M	15	174.6 ± 135.6	644.9 ± 500.1	18.3 ± 10.4	89.5 ± 44.9	ng·g <sup>-1</sup> WW	Torres et al. (2004)
R	8			0.4 ± 0.1	1.2 ± 0.2	µg·g <sup>-1</sup> DW	Milton et al. (2002)
P	4 to 11			1.3 ± 0.5 to 4.7 ± 0.6	3.2 ± 0.7 to 43 ± 7.5		
R	NC	1.4 ± 0.9		2.7 ± 2.2		µg·g <sup>-1</sup> DW	
P	NC	5.9 ± 5.2		4.6 ± 5.3			Dnowski et al. (1995)
M	NC	0.26 – 18.2	1.28 – 41.7	0.5 – 13.0	0.4 – 65.2	µg·g <sup>-1</sup> DW	Shore (1995)
R	22			0.5	0.8	Mean	
				[0.2 – 1.6]	[0.3 – 6.9]	µg·g <sup>-1</sup> DW	Ma (1989)
P	23			2.7	5.9	[Range]	
				[0.9 – 12]	[0.4 – 26.2]		

### 3.3 Observed pathologies and relationships with TM concentrations

#### 3.3.1 Histological alterations

In the 78 wood mice screened for histological alterations, three pathologies attributed to pollution exposure were encountered in the liver (lymphocyte infiltrations, necrosis and cell degeneration and steatosis), and four were encountered in the kidneys (lymphocyte infiltrations, necrosis and cell death in cortical and medullary regions, changes in Henle's loops and cell degeneration of the tubular epithelium, and cell debris and change in glomerular aspect and size). These alterations are presented in Figure III.3 for the liver and in Figure III.4 for the kidneys. For the liver, only a few individuals presented severe steatosis (2 mice) or severe lymphocyte infiltrations (2 mice, Tableau III.4). Looking specifically at lymphocyte infiltration in the liver, the results indicated that light to severe leukocyte infiltrations were present in a higher percentage of individuals (tendency) from the polluted sites (50% from the “+” site, 37% from the “++” site and 38% from the “+++” site) than from the control site (21%). Moreover, considering the liver, 17/23 individuals presenting severe hepatocyte necrosis were collected in the “++” and the “+++” sites (Tableau III.4). Regarding the kidneys, only a few wood mice presented severe lymphocyte infiltrations (2 mice) or disturbed glomerular aspect (4 mice), but more exhibited severe necrosis (8 mice). Fourteen mice presented severe cell degeneration, including 8 mice trapped in the highly polluted “+++” site (Tableau III.4). None of these hepatic or renal alterations were related to the relative age of the wood mice ( $p > 0.050$ ). Concerning gender, severities of renal cell degeneration of the tubular epithelium and of necrosis and cell degeneration were higher in females than in males (Fisher's exact tests,  $p = 0.047$  and  $p = 0.008$ , respectively).

The results indicated that necrosis and cell degeneration in the liver (Figure III.3b) and cell degeneration of the tubular epithelium in the kidneys (Figure III.4g) were significantly related to soil contamination. These alterations increased with both Cd and Pb levels in the soil (for hepatocyte necrosis, Spearman's rank correlations  $r_s = 0.27$ ,  $p = 0.016$  and  $r_s = 0.26$ ,  $p = 0.019$ , and for tubular degeneration,  $r_s = 0.26$ ,  $p = 0.020$  and  $r_s = 0.24$ ,  $p = 0.032$ , for Cd and Pb, respectively). Cell degeneration of the tubular epithelium was also significantly related to the Pb concentration in the kidneys ( $r_s = 0.23$ ,  $p = 0.041$ ). The severity of kidney glomerular hyperplasia (Figure III.4b), though not significantly related to contamination, appears to be related to the severity of other alterations observed in the kidneys: tubular

degeneration ( $r_s = 0.27$ ,  $p = 0.015$ ) and necrosis and cell death in cortical and medullary regions ( $r_s = 0.45$ ,  $p < 0.001$ ).

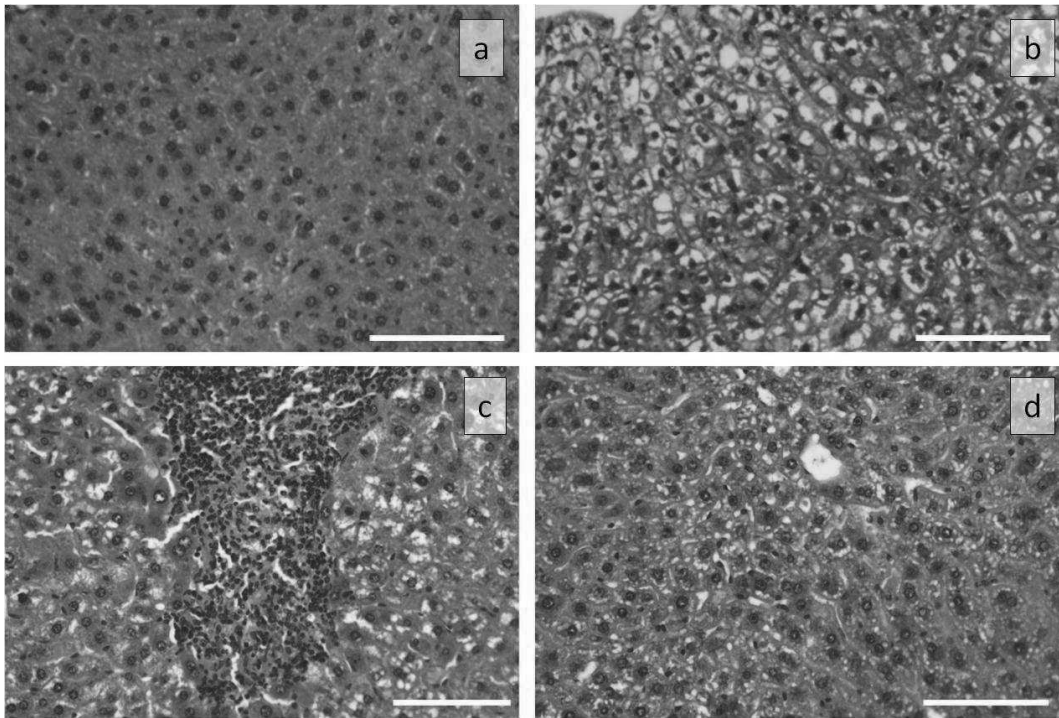


Figure III.3 Representative micrographs of hepatic sections from *A. sylvaticus*: (a) non-altered hepatocytes with normal shape, (b) hepatocyte degeneration and necrosis, (c) inflammation and lymphocyte infiltration, (d) steatosis in hepatocytes (scale bars correspond to 100  $\mu$ m).

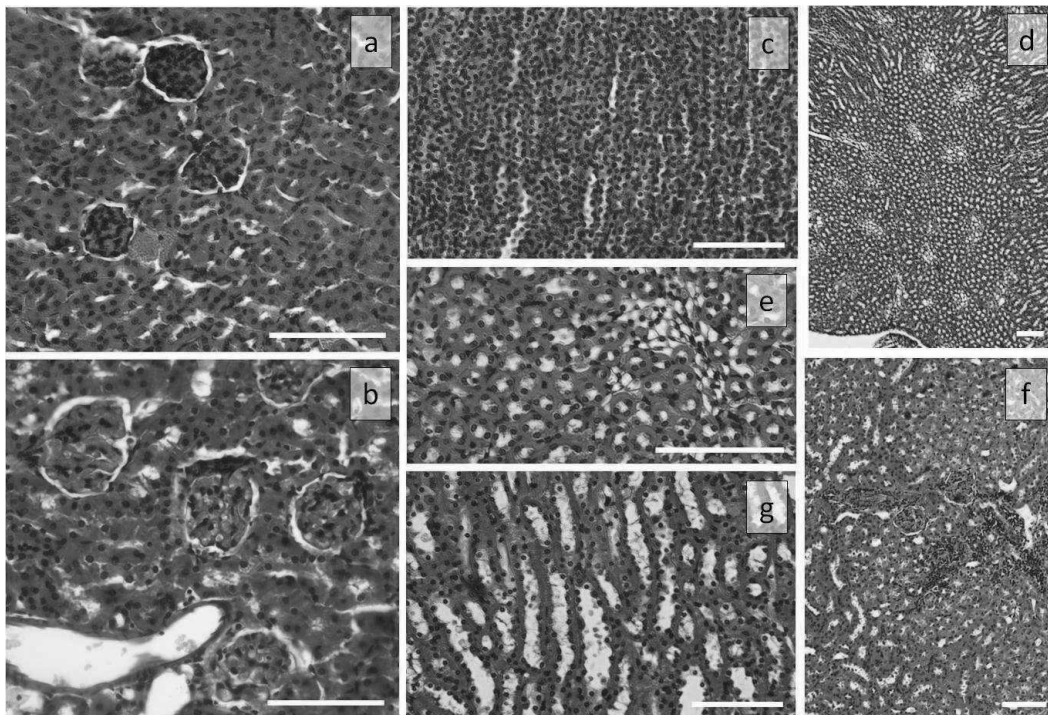


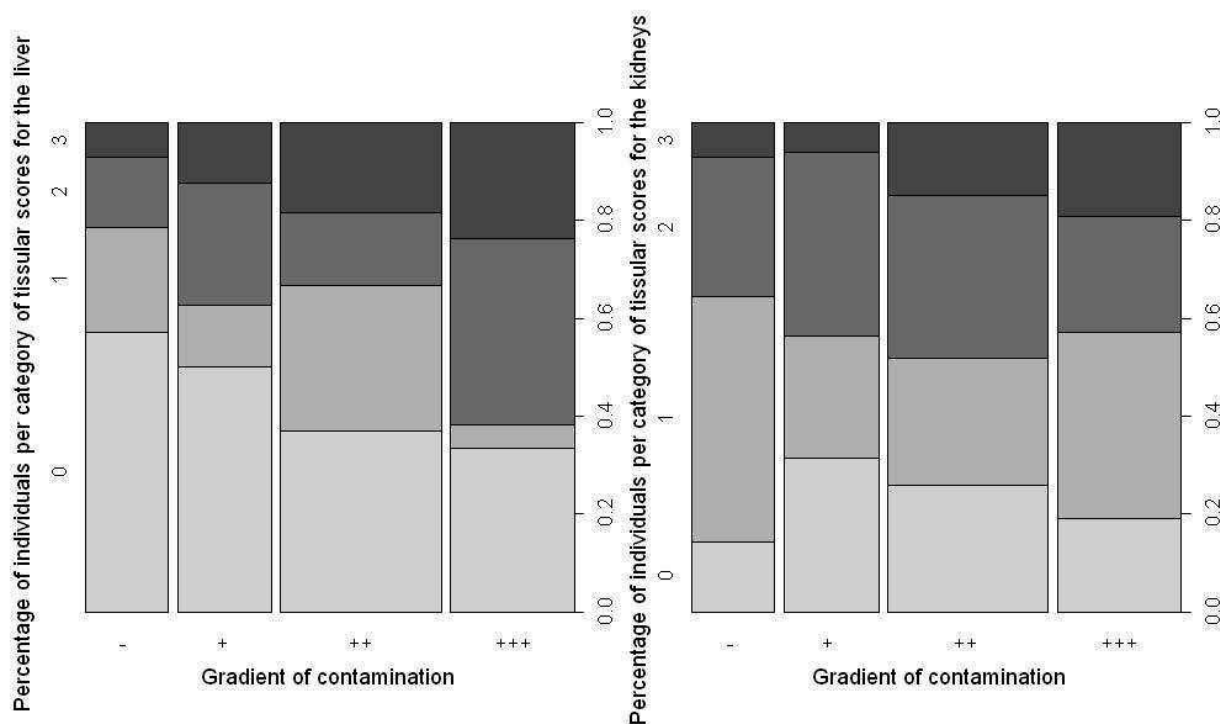
Figure III.4 Representative micrographs of renal sections from *A. sylvaticus*: (a) normal-sized glomeruli, (b) glomerular hyperplasia, (c) normal tubules, (d, e) tubular necrosis and changes in Henle's loops, (f) inflammation and lymphocyte infiltration in the medulla, (g) necrosis and cell degeneration of the tubular epithelium and cell debris (scale bars correspond to 100  $\mu$ m).

Tableau III.4 Number of individuals presenting histopathology per category of severity, from no alteration (0) to strongly altered (3), in the liver or the kidneys and organ scores based on general observations of the tissues for each square sampled and for the whole sample.

Organ	Histological alterations	-	+	++	+++	All sites
Liver	Lymphocyte infiltrations	0 1 2 3 0	1 2 3 0	0 1 2 3 0	0 1 2 3 0	0 1 2 3 3
	Necrosis and cell degeneration	11 3 0 0	8 5 1 2	17 8 2 0	13 8 0 0	49 24 3 2
	Steatosis	7 1 4 2 7	2 3 4 5	5 5 11 6	6 1 3 11	25 9 21 23
	<i>Global liver score</i>	12 0 1 1 15	1 0 0 24	1 2 0 19	0 1 1 70	2 4 2 70
	Lymphocyte infiltrations	8 3 2 1 8	2 4 2 10	8 4 5 7	1 8 5 33	14 18 13 33
Kidneys	Necrosis and cell death in cortical and medullary regions	3 8 3 0 1	11 4 0 6	12 8 1 6	3 9 8 1	13 40 23 2
	Changes in Henle's loops and cell degeneration of the tubular epithelium and cell debris	4 3 5 2 5	4 5 2 7	4 13 3 4	8 8 1 20	19 31 8 20
	Glomerular aspect and size	1 6 7 0 0	11 3 2 0	10 13 4 0	5 8 8 1	32 31 14 1
	<i>Global kidney score</i>	4 5 4 1 2	8 6 0 5	10 10 2 5	8 7 1 16	31 27 4 16

## 3.3.2 Tissular and individual scores

When considering the tissular scores, 13 mice (17% of the individuals analyzed) presented a strongly altered liver, and 10 of those 13 were trapped in the moderately “++” and highly “+++” polluted sites (Tableau III.4). Similarly, 10 mice (13%) presented strongly altered kidneys, including 8 mice collected in the “++” and “+++” sites (Tableau III.4). The tissular scores tended to increase along the gradient of contamination, especially in the liver (Figure III.5), but the results were not significant (Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 4.245$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.236$  for the liver score and Kruskal-Wallis  $\chi^2 = 0.489$ ,  $df = 3$ ,  $p = 0.921$  for the kidney score). Finally, the individual score (the sum of all the alteration scores) was significantly higher in individuals considered at risk for metal-induced stress because their tissular Cd or Pb concentrations exceeded the LOAELs ( $W = 677.5$ ,  $p = 0.0241$ ).



**Figure III.5** Variability in the percentage of individuals per category of tissular scores for the liver (a) and for the kidneys (b) for individuals trapped at different sites along the contamination gradient. Shades of grey correspond to the severity of alterations in the liver or the kidneys, from light grey (0) for no alteration to dark grey (3) for severe alterations. The width of each level of the gradient of contamination corresponds to the relative number of individuals studied.

## **4 Discussion**

---

### 4.1 Accumulation of TMs in wood mice

---

The Metaleurop Nord smelter was considered to be one of the largest plants producing primary Pb in Europe. In 2001, 115 000 tons of Pb and 87 000 tons of Zn were manufactured, resulting in the production of 150 000 tons of slag. In 2002, despite significant technical improvements during the 1970s, 16.9 tons of Pb, 31.6 tons of Zn and 950 kg of Cd were still annually released into the atmosphere around the smelter (Douay et al., 2009; DRIRE, 2003). Despite the ceasing of industrial activity in 2003, the concentrations of Cd and Pb observed in the present study in the liver and the kidneys of wood mice trapped in the region around Metaleurop are among the highest reported in the literature for the wood mouse (Tableau III.3). Previous studies conducted in the same area around the Metaleurop smelter in 2006 (Tête et al., 2013) and in 2007 (Fritsch et al., 2010b) showed similar results (Tableau III.3). Median Cd concentrations are even higher in the present study compared to the results from past years (Tableau III.3). In the present work, though the Pb concentrations in both organs increased along the pollution gradient, this was not the case for Cd, for which the highest concentrations were found in individuals inhabiting the moderately polluted site. This pattern is unusual for this site and remains to be explained, though variations in the wood mouse diet and in the bioavailability of Cd from the soil to the various diet items may provide an explanation. In any case, the present elevated tissue concentrations highlight that the transfer of Cd and Pb from the soil to the biota is still high despite the ceasing of the industrial activity of the Metaleurop smelter. This could be due to modifications of the soil characteristics (acidification, for instance) over time due to land use changes (forests have been planted around Metaleurop to decrease dust emissions), which can heavily influence Cd bioavailability to wood mice (van den Brink et al., 2010).

## 4.2 Histological alterations

---

To evaluate the effects of toxic compounds on the biota, many approaches have been proposed (*e.g.*, Mussali-Gallante et al., 2013). In this study, histology was used to qualify and quantify alterations caused by TM pollution in target organs. The alterations observed in this work are among the most commonly observed in small mammals exposed to TMs, and they have been attributed to chronic exposure to Cd and Pb in prior experimental studies (Liu et al., 2010; Salinska et al., 2012, 2013; Wlostowski et al., 2000). In the liver, commonly observed histopathological damage from Cd and Pb exposure is likely due to the role the liver plays in the transformation, bioaccumulation and excretion of toxics (Sanchez-Chardi et al., 2009a). For instance, the effect of pollutants on hepatocyte death (apoptosis or necrosis) has been highlighted in different species of small mammals (Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2003, 2004; Liu et al., 2010; Salinska et al., 2012; Sanchez-Chardi et al., 2009a, 2009b; Wlostowski et al., 2000). In the present study, liver necrosis and the severity of cell degeneration were significantly linked with Pb and Cd concentrations in the soil but not with Cd or Pb concentrations in the organs. Cell degeneration observed was compatible with glycogenic degeneration given the histopathological assessment reported here and also because of the high amounts of glycogen accumulated in hepatocytes observed in a preliminary survey of ultrastructural changes in hepatocytes evaluated by Transmission Electron Microscopy (data not shown). The lack of relationship between liver necrosis and cell degeneration and internal concentrations are yet to be explained, but increases in these alterations in the highly polluted sites may be linked to a decrease in food resource quality (*e.g.*, amount of vitamins, antioxidants, carotenoids) due to Cd and Pb contamination in the soil. Steatosis (presented as lipid droplets in cytoplasm) in hepatocytes, a sign of metabolic disturbance, was detected only in a few mice (8/78). Because only a few individuals presented this alteration, no direct link between steatosis and pollution could be identified in the present study, which contradicts previous studies that highlighted an increase in steatosis frequency in small mammals exposed to a mixture of metallic and/or organic pollutants (Sanchez-Chardi et al., 2009a; Wlostowski et al., 2008). The present results also indicated that the percentage of mice presenting lymphocyte infiltrations tended to be higher in the polluted sites than in the control site. This increase in infiltrations, considered to be a sign of the inflammatory process, has been observed in previous studies of small mammals exposed to TMs, notably Cd and Pb (Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2004; Salinska et al., 2012; Sanchez-Chardi et al., 2009a), and may represent an increased cancer risk (Chwelatiuk et al., 2005; Salinska et al.,



2012). Observation of a single pathology in the liver in relation to TM concentrations was confirmed by the tissular score for the liver that tended to increase in animals inhabiting highly polluted sites. Together, these results indicate that mice living around the former Metaleurop smelter may exhibit more severe hepatic alterations and may be at risk for metal-induced stress.

When looking at renal alterations, we observed that 74% of the individuals studied presented light to severe kidney necrosis and cell death, 79% presented changes in glomerular aspect and size, notably glomerular hyperplasia, and 83% presented lymphocyte infiltrations. These results do not exhibit a distinct increase in alteration severity along the gradient of pollution. One could argue that because the median Cd and Pb concentrations measured in the control site (-) soil are 3 to 4 times higher compared to the median background concentrations for the North-Pas-de-Calais region (*i.e.*, Tableau III.1,  $[Cd]_{\text{median}} = 0.40 \mu\text{g/g DM}$  and  $[Pb]_{\text{median}} = 29.7 \mu\text{g/g DM}$ , Sterckeman et al., 2007), even wood mice living in the control site could exhibit adverse effects. The type of histological alterations observed in the present study are consistent with those found in literature regarding different species of small mammals exposed to Cd, Pb and other pollutants (Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2003, 2004; Liu et al., 2012; Salinska et al., 2012; Sanchez-Chardi et al., 2009a; Włostowski et al., 2000, 2004, 2010). The observed damages are generally more obvious in the renal cortex than in the medulla, where Cd accumulates preferentially around the proximal tubules (Dorian et al., 1992; Swiergosz-Kowalewska, 2001). In the present results, cell degeneration of the tubular epithelium increased along the pollution gradient and with Pb concentrations in the kidneys, possibly due to a compensatory mechanism following the loss of renal excretory function because of tubular cell death (Sanchez-Chardi et al., 2009a). Moreover, morphological changes in Henle's loops observed in some animals suggest a response to increased filtration that can affect absorption and reabsorption (Reyes et al., 2013), as reported in rats exposed to Cd (Brzóska et al., 2003). In summary, the present results may indicate an impairment of the renal function in mice under high chronic exposure to Cd and Pb. These alterations may indicate renal insufficiency and lead to renal failure for the individuals living in the highly polluted sites and/or exhibiting the highest Pb concentrations in the kidneys.

#### 4.3 Risk to wildlife under chronic exposure to TMs

---

According to the thresholds for metal-induced stress defined by Shore and Douben (1994a, 1994b), 11/78 individuals studied were at risk because of the Cd threshold in the liver, and one was above the threshold for Cd in the kidneys. Of these individuals, one was trapped in the lightly polluted site, eight in the moderately polluted site and two in the highly polluted site. By contrast, none of mice had Pb concentrations in the liver above the threshold described for metal-induced stress, but 5 individuals were above the threshold defined for Pb in the kidneys. Based on these thresholds, a total of 16 individuals could be considered at risk: 0 from the control site, 2 from the lightly polluted site, 10 from the moderately polluted site and 4 from the highly polluted site. Present results showed that animals above the thresholds defined by Shore and Rattner (1994a, 1994b) had higher individual scores of histological alterations than individuals not considered at risk for metal-induced stress. Individuals that accumulate high concentrations of TMs in their tissues have structural alterations in the liver and/or in the kidneys, which may impact life history traits such as survival or reproductive success. Some animals with internal concentrations below the thresholds also exhibited adverse effects in target organs, potentially because of the combined exposure to Cd and Pb. Evaluating the risks to wildlife exposed to a mixture of pollutants using only the thresholds defined for single metals is difficult, and the risks to wildlife could thus be underestimated when studying only bioaccumulation, particularly when considering each metal independently. Although some authors are starting to study interactions between pollutants (Garcia-Sevillano et al., 2012, 2013; Liu et al., 2000), there is still a lack of knowledge regarding these phenomena in terrestrial ecotoxicology.

Aside from the issue of considering thresholds defined for single metals while wildlife is exposed to a mixture of pollutants, comparing *in situ* results with laboratory-derived thresholds is often difficult for several reasons. First, in the present study, the thresholds defined by Shore and Rattner (1994a, 1994b) were used, but many other thresholds exist. For instance, Milton et al. (2003) referenced different thresholds suggested as critical levels for Pb concentrations in the liver and the kidneys. For the kidneys, thresholds varied from 70 µg/g DM (Scheuhammer, 1991; Shore and Rattner, 1994b) to 15-25 µg/g DW (Ma, 1989; 1996) and for the liver, from 15-25 µg/g DW (Scheuhammer, 1991; Shore and Rattner, 1994b) to 5-10 µg/g DW (Ma, 1989; 1996). Depending on the threshold selected, the number of individuals considered at risk will be higher or lower, and interpretations will differ. Second, comparing *in situ* results and laboratory-derived thresholds is complex because many

parameters differ, such as exposure patterns, food availability and quality or environmental stressors (Rogival et al., 2006). These stressors can be both natural (*i.e.*, predation, density, parasitism or food resources) or anthropogenic (*i.e.*, habitat destruction or fragmentation). In this context, the energy budget devoted to TM detoxification may be inferior in wild animals, which may make them more sensitive to toxic compounds than laboratory animals (Damek-Poprawa and Sawicka-Kapusta, 2003, 2004; Salinska et al., 2012; Shore and Rattner, 2001). A recent study showed that in a population of bank voles (*Myodes glareolus*), wild individuals were more sensitive to Cd contamination and exhibited more injuries than laboratory-bred individuals (Salinska et al., 2013).

## 5 Conclusion

---

The former Metaleurop Nord smelter still represents a threat to the local ecosystem because of the high levels and high bioavailability of Cd and Pb in the soil that can be transferred to the biota and induce toxic effects at various levels of biological organization. A combined assessment of tissular concentrations of Cd and Pb as biomarkers of exposure and a complete structural evaluation of the liver and the kidneys of wood mice as biomarkers of effect revealed interesting ecotoxicological information. Some histological alterations were related to TM concentrations not only in the organs but also in the soil, questioning the global quality of the food in polluted sites, an issue yet to be studied. Moreover, animals considered at risk for metal-induced stress exhibited higher individual scores of alteration severity, demonstrating the validity of both biomarkers in the study of TM transfer and toxicity in wild animals. However, a significant number of animals from the polluted sites showed structural alterations despite tissue TM concentrations below laboratory-derived thresholds defined for single metal-induced stress, highlighting the need for a better method of evaluating the risks to wildlife exposed to multiple contaminants in ecotoxicological studies.

## 6 Acknowledgements

---

The authors gratefully thank Eve Afonso, Jordi Correas, Nadia Crini, Séverine Drouhot, Patrick Giraudoux, Cécile Grand, María José López-Fuster, Anne-Sophie Prudent, Francis Raoul, and Carolina Rodríguez-Cariño for their help with the diverse technical and analytical work that greatly improved the study. We would also like to thank the Conseil Régional de Franche-Comté, the ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) and the Generalitat de Catalunya (Project 2009SGR403) for financially supporting the present work. Nicolas Tête's stay in Barcelona for the histological analysis was made possible thanks to the grants offered by the Chair of the University of Franche-Comté and by the *École Doctorale Environnement-Santé* (ES) of the University of Franche-Comté.

## 7 References

---

AVMA. American Veterinary Medical Association - Guidelines for the Euthanasia of Animals; 2013. Available at: [https://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](https://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf)

Beernaert J, Scheirs J, Leirs H, Blust R, Verhagen R. Non-destructive pollution exposure assessment by means of wood mice hair. *Environ Pollut* 2007;145:443-451.

Beernaert J, Scheirs J, van den Brande G, Leirs H, Blust R, de Meulenaer B, et al. Do wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) use food selection as a means to reduce heavy metal intake? *Environ Pollut* 2008;151:599-607.

Berckmoes V, Scheirs J, Jordaens K, Blust R, Backeljau T, Verhagen R. Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. *Environ Toxicol Chem* 2005;24:2898-2907.

Bernard F, Brulle F, Douay F, Lemiere S, Demuynck S, Vandenbulcke F. Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an “exposure/depuration” experimental scheme with field soils. *Ecotoxicol Environ Saf* 2010;73:1034-1045.

Brulle F, Lemiere S, Waterlot C, Douay F, Vandenbulcke F. Gene expression analysis of 4 biomarker candidates in *Eisenia fetida* exposed to an environmental metallic trace elements gradient: A microcosm study. *Sci Total Environ* 2011;409:5470-5482.

Brzóška MM, Moniuszko-Jakoniuk J, Piłat-Marcinkiewicz B, Sawicki B. Liver and kidney function and histology in rats exposed to cadmium and ethanol. *Alcohol Alcohol* 2003;38:2-10.

Bunn T, Parsons PJ, Kao E, Dietert RR. Gender-based profiles of developmental immunotoxicity to lead in the rat: Assessment in juveniles and adults. *J Toxicol Environ Health A* 2001;64:223-240.

Caudeville J, Bonnard R, Boudet C, Denys S, Govaert G, Cicolella A. Development of a spatial stochastic multimedia exposure model to assess population exposure at a regional scale. *Sci Total Environ* 2012;432:297-308.

Ceruti R, Ghisleni G, Ferretti E, Cammarata S, Sonzogni O, Scanziani E. Wild rats as monitors of environmental lead contamination in the urban area of Milan, Italy. *Environ Pollut* 2002;117:255-259.

Chwelatiuk E, Wlostowski T, Krasowska A, Bonda E. Melatonin increases tissue accumulation and toxicity of cadmium in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *BioMetals* 2005;18:283-291.

Coeurdassier M, Fritsch C, Faivre B, Crini N, Scheifler R. Partitioning of Cd and Pb in the blood of European blackbirds (*Turdus merula*) from a smelter contaminated site and use for biomonitoring. *Chemosphere* 2012;87:1368-1373.

Damek-Poprawa M, Sawicka-Kapusta K. Damage to the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland. *Toxicol* 2003;186:1-10.

Damek-Poprawa M, Sawicka-Kapusta K. Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland. *Environ Res J* 2004;96:72-78.

Dmowski K, Kozakiewicz M, Kozakiewicz A. Ecological effect of heavy metal pollution (Pb, Cd, Zn) on small mammal populations and communities. *Bull Acad Pol Sci Biol* 1995;43:1-10.

Dorian C, Gattone VH, Klaassen CD. Renal cadmium deposition and injury as a result of accumulation of cadmium-metallothionein (CdMT) by the proximal convoluted tubules: a light microscopic autoradiography study with <sup>109</sup>CdMT. *Toxicol Appl Pharmacol* 1992;114:173-181.

Douay F, Pruvot C, Roussel H, Ciesielski H, Fourrier H, Proix N, et al. Contamination of urban soils in an area of northern France polluted by dust emissions of two smelters. *Water Air Soil Pollut* 2008;188:247-260.

Douay F, Pruvot C, Waterlot C, Fritsch C, Fourrier H, Loriette A, et al. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. *Sci Total Environ* 2009;407:5564-5577.

Douay F, Pelfrene A, Planque J, Fourrier H, Richard A, Roussel H, et al. Assessment of potential health risk for inhabitants living near a former lead smelter. Part 1: metal concentrations in soils, agricultural crops, and homegrown vegetables. *Environ Monit Assess* 2013;185:3665-3680.

DRIRE. L'Industrie au Regard de l'Environnement en 2002. Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement Nord-Pas de Calais, Douai, France; 2003. pp. 308.

Drouhot S, Raoul F, Crini N, Tougard C, Prudent A-S, Druart C, et al. Responses of wild small mammals to arsenic pollution at a partially remediated mining site in Southern France. *Sci Total Environ* 2014;470-471:1012–1022.

Erry BV, Macnair MR, Meharg AA, Shore RF. Seasonal variation in dietary and body organ arsenic concentrations in wood mice *Apodemus sylvaticus* and bank voles *Clethrionomys glareolus*. *Bull Environ Contam Toxicol* 1999;63:567-574.

Erry BV, Macnair MR, Meharg AA, Shore RF. The distribution of arsenic in the body tissues of wood mice and bank voles. *Arch Environ Contam Toxicol* 2005;49:569-576.

Fernández A, Aboal JR, González XI, Carballeira A. Transfer and bioaccumulation variability of Cd, Co, Cr, Hg, Ni and Pb in trophic compartments of terrestrial ecosystems in northern Spain. *Fresenius Environ Bull* 2012;21:3527-3532.



Fritsch C, Giraudoux P, Coeurdassier M, Douay F, Raoul F, Pruvot C, et al. Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere* 2010a;81:141-155.

Fritsch C, Cosson RP, Coeurdassier M, Raoul F, Giraudoux P, Crini N, et al. Responses of wild small mammals to a pollution gradient: Host factors influence metal and metallothionein levels. *Environ Pollut* 2010b;158:827-840.

Fritsch C, Coeurdassier M, Gimbert F, Crini N, Scheifler R, de Vaufleury A. Investigations of responses to metal pollution in land snail populations (*Cantareus aspersus* and *Cepaea nemoralis*) from a smelter-impacted area. *Ecotoxicology* 2011a;20:739-759.

Fritsch C, Coeurdassier M, Giraudoux P, Raoul F, Douay F, Rieffel D, et al. Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: influence of soil contamination and landscape. *PLoS ONE* 2011b;6:e20682.

Fritsch C, Coeurdassier M, Faivre B, Baurand P-E, Giraudoux P, van den Brink NW. Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: A case study of trace metal transfer to European blackbirds *Turdus merula*. *Sci Total Environ* 2012;432:275-287.

García-Sevillano MA, González-Fernández M, Jara-Biedma R, García-Barrera T, López-Barea J, Pueyo C, et al. Biological response of free-living mouse *Mus spretus* from Doñana National Park under environmental stress based on assessment of metal-binding biomolecules by SEC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 2012;404:1967-1981.

García-Sevillano MA, Jara-Biedma R, González-Fernández M, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Metal interactions in mice under environmental stress. *BioMetals* 2013;26:651-666.

González XI, Aboal JR, Fernández JA, Carballeira A. Considerations on the sample size of wood mice used to biomonitor metals. *Sci Total Environ* 2006;366:910-914.

González XI, Aboal JR, Fernández JA, Carballeira A. Evaluation of some sources of variability in using small mammals as pollution biomonitors. *Chemosphere* 2008;71:2060-2067.

Ismail A, Roberts RD. Arsenic in small mammals. *Environ Technol* 1992;13:1091-1095.

Jacoby RO, Fox JG, Davisson M. Biology and diseases of mice. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW. *Laboratory Animal Medicine*, 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Elsevier; 2002. p. 35-120.

Kakela R, Jokinen I, Kakela A, Hyvarinen H. Effects of gender, diet, exogenous melatonin and subchronic PCB exposure on plasma immunoglobulin G in mink. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002;132:67-74.

Kohn DF, Clifford CB. Biology and diseases of rats. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW. *Laboratory Animal Medicine*, 2<sup>nd</sup> ed. San Diego: Elsevier; 2002. p. 121-165. Kramárová M, Massanyi P, Jancova A, Toman R, Slamecka J, Tataruch F, et al. Concentration of cadmium in the liver and kidneys of some wild and farm animals. *Bull Vet Inst Pulawy* 2005;49:465-469.

Liu J, Liu Y, Habeebu SM, Waalkes MP, Klaassen CD. Chronic combined exposure to cadmium and arsenic exacerbates nephrotoxicity, particularly in metallothionein-I/II null mice. *Toxicol* 2000;147:157-166.

Liu CM, Zheng YL, Lu J, Zhang ZF, Fan SH, Wu DM, et al. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010;29:158-166.

Liu CM, Ma JQ, Sun YZ. Puerarin protects rat kidney from lead-induced apoptosis by modulating the PI3K/Akt/eNOS pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012;258:330-342.

Lopes PA, Viegas-Crespo AM, Nunes AC, Pinheiro T, Marques C, Santos MC, et al. Influence of age, sex, and sexual activity on trace element levels and antioxidant enzyme

activities in field mice (*Apodemus sylvaticus* and *Mus spretus*). Biol Trace Elem Res 2002;85:227-239.

Lourenço J, Pereira R, Gonçalves F, Mendo S. Metal bioaccumulation, genotoxicity and gene expression in the European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) inhabiting an abandoned uranium mining area. Sci Total Environ 2013;443:673-680.

Ma W. Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. Arch Environ Contam Toxicol 1989;18:617-622.

Ma W. Lead in small mammals. In: Beyer WN, Heinz G, Redmond-Norwood A. Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations. Boca Raton: Society of Environmental Toxicology and Chemistry Special Publication; 1996. p. 281-296.

Marcheselli M, Sala L, Mauri M. Bioaccumulation of PGEs and other traffic-related metals in populations of the small mammal *Apodemus sylvaticus*. Chemosphere 2010;80:1247-1254.

Martiniaková M, Omelka R, Jancová A, Stawarz R, Formicki G. Heavy metal content in the femora of yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) from different types of polluted environment in Slovakia. Environ Monit Assess 2010;171:651-660.

Martiniaková M, Omelka R, Stawarz R, Formicki G. Accumulation of lead, cadmium, nickel, iron, copper, and zinc in bones of small mammals from polluted areas in Slovakia. Polish Journal of Environmental Studies 2012;21:153-158.

Milton A, Johnson MS. Biomonitoring of contaminated mine tailings through age accumulation of trace metals in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). J Environ Monit 1999;1:219-225.

Milton A, Johnson MS. Food chain transfer of zinc within the ecosystems of old and modern metalliferous mine wastes. Environ Technol 2002;23:525-536.

Milton A, Johnson MS, Cooke JA. Lead within ecosystems on metalliferous mine tailings in Wales and Ireland. *Sci Total Environ* 2002;299:177-190.

Milton A, Cooke JA, Johnson MS. Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Arch Environ Contam Toxicol* 2003;44:405-411.

Milton A, Cooke JA, Johnson MS. A comparison of cadmium in ecosystems on metalliferous mine tailings in Wales and Ireland. *Water Air Soil Pollut* 2004;153:157-172.

Mussali-Galante P, del Castillo ER, Tovar-Sanchez E, Valverde M. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 2013;29:117-140.

Nawrot TS, van Hecke E, Thijs L, Richart T, Kuznetsova T, Jin Y, et al. Cadmium-related mortality and long-term secular trends in the cadmium body burden of an environmentally exposed population. *Environ Health Perspect* 2008;116:1620-1628.

O'Brien DJ, Kaneene JB, Poppenga RH. The use of mammals as sentinels for human exposure to toxic contaminants in the environment. *Environ Health Perspect* 1993;99:351-368.

Pereira R, Pereira M, Ribeiro R, Gonçalves F. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal). *Environ Pollut* 2006;139:561-575.

Pillet S, Lesage V, Hammill M, Cyr DG, Bouquegneau JM, Fournier M. In vitro exposure of seal peripheral blood leukocytes to different metals reveal a sex-dependent effect of zinc on phagocytic activity. *Mar Pollut Bull* 2000;40:921-927.

Quéré JP, Vincent JP. Détermination de l'âge chez le Mulot gris par la pesée des cristallins. *Mammalia* 1989;53:287-293.

R Development Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria; 2012. Available: <http://www.R-project.org>.

Rautio A, Kunnasranta M, Valtonen A, Ikonen M, Hyvärinen H, Holopainen IJ, et al. Sex, age, and tissue specific accumulation of eight metals, arsenic, and selenium in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*). Arch Environ Contam Toxicol 2010;59:642-651.

Reyes JL, Molina-Jijón E, Rodríguez-Muñoz R, Bautista-García P, Debray-García Y, del Carmen Namorado M. Tight junction proteins and oxidative stress in heavy metals-induced nephrotoxicity. BioMed Res Int 2013;730789. DOI: 10.1155/2013/730789

Rogers LM, Gorman ML. The diet of the wood mouse *Apodemus sylvaticus* on set-aside land. J Zool 1995;235:77-83.

Rogival D, Scheirs J, de Coen W, Verhagen R, Blust R. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. Environ Toxicol Chem 2006;25:149-157.

Rogival D, Scheirs J, Blust R. Transfer and accumulation of metals in a soil–diet–wood mouse food chain along a metal pollution gradient. Environ Pollut 2007a;145:516-528.

Rogival D, van Campenhout K, Infante HG, Hearn R, Scheirs J, Blust R. Induction and metal speciation of metallothionein in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a metal pollution gradient. Environ Toxicol Chem 2007b;26:506-514.

Salińska A, Włostowski T, Zambrzycka E. Effect of dietary cadmium and/or lead on histopathological changes in the kidneys and liver of bank voles *Myodes glareolus* kept in different group densities. Ecotoxicol 2012;21:2235-2243.

Salińska A, Włostowski T, Oleńska E. Differential susceptibility to cadmium-induced liver and kidney injury in wild and laboratory-bred bank voles *Myodes glareolus*. Arch Environ Contam Toxicol 2013;65:324-331.

Sánchez-Chardi A, Peñarroja-Matutano C, Ribeiro CAO, Nadal J. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* 2007;70:101-109.

Sánchez-Chardi A, Marques CC, Gabriel SI, Capela-Silva F, Cabrita AS, López-Fuster MJ, et al. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. *Environ Pollut* 2008;156:1332-1339.

Sánchez-Chardi A, Peñarroja-Matutano C, Borrás M, Nadal J. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals Part III: Structural alterations. *Environ Res* 2009a;109:960-967.

Sánchez-Chardi A, Oliveira Ribeiro CA, Nadal J. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere* 2009b;76:387-394.

Scheirs J, de Coen A, Covaci A, Beernaert J, Mubiana Kayawe V, Caturla M, et al. Genotoxicity in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a pollution gradient: exposure-, age-, and gender-related effects. *Environ Toxicol Chem* 2006;25:2154-2162.

Scheuhammer AM. Effects of acidification on the availability of toxic metals and calcium to wild birds and mammals. *Environ Pollut* 1991;71:329-375.

Shore RF, Douben PET. The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. *Ecotoxicol Environ Saf* 1994a;29:101-112.

Shore RF, Douben PET. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Rev Environ Contam Toxicol* 1994b;134:49-89.

Shore RF. Predicting cadmium, lead and fluoride levels in small mammals from soil residues and by species-species extrapolation. *Environ Pollut* 1995;88:333-340.

Shore RF, Rattner BA. *Ecotoxicology of Wild Mammals*. London, UK: John Wiley & Sons; 2001.

Sneddon J, Clemente R, Riby P, Lepp NW. Source-pathway-receptor investigation of the fate of trace elements derived from shotgun pellets discharged in terrestrial ecosystems managed for game shooting. *Environ Pollut* 2009;157:2663-2669.

Sterckeman T, Douay F, Baize D, Fourrier H, Proix N, Schwartz C. Référentiel Pédogéochimique du Nord-Pas de Calais - Méthode et principaux résultats. *Etude et Gestion des Sols* 2007;14:153-168.

Swiergosz R, Zakrzewska M, Sawicka-Kapusta K, Bacia K, Janowska I. Accumulation of cadmium in and its effect on bank vole tissues after chronic exposure. *Ecotoxicol Environ Saf* 1998;41:130-136.

Swiergosz-Kowalewska R. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents. *Microsc Res Tech* 2001;55:208-222.

Swiergosz-Kowalewska R, Gramatyka M, Reczyński W. Metals distribution and interactions in tissues of shrews (*Sorex* spp.) from copper- and zinc-contaminated areas in Poland. *J Environ Qual* 2005;34:1519-1529.

Tersago K, de Coen W, Scheirs J, Vermeulen K, Blust R, van Bockstaele D, et al. Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient. *Environ Pollut* 2004;132:385-394.

Tête N, Fritsch C, Afonso E, Coeurdassier M, Lambert J-C, Giraudoux P, et al. Can body condition and somatic indices be used to evaluate metal-induced stress in wild small mammals? *PLoS ONE* 2013;8:e66399. DOI:10.1371/journal.pone.0066399

Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Teodorova S. A comparative analysis of the heavy metals loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: Chromosomal aberrations and blood pathology. *Ecotoxicol Environ Saf* 2003;54:188-193.

Torres J, de Lapuente J, Eira C, Nadal J. Cadmium and lead concentrations in *Gallegoide sarfaai* (Cestoda: Anoplocephalidae) and *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) from Spain. J Parasitol Res 2004;94:468-470.

Torres J, Peig J, Eira C, Borrás M. Cadmium and lead concentrations in *Skryabinotaenia lobata* (Cestoda: Catenotaeniidae) and in its host, *Apodemus sylvaticus* (Rodentia: Muridae) in the urban dumping site of Garraf (Spain). Environ Pollut 2006;143:4-8.

van den Brink NW, Lammertsma D, Dimmers W, Boerwinkel M-C, van der Hout A. Effects of soil properties on food web accumulation of heavy metals to the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). Environ Pollut 2010;158:245-251.

van den Brink NW, Lammertsma DR, Dimmers WJ, Boerwinkel MC. Cadmium accumulation in small mammals: species traits, soil properties, and spatial habitat use. Environ Sci Technol 2011;45:7497-7502.

Wijnhoven S, Leuven RSEW, van der Velde G, Jungheim G, Koelemij EI, de Vries FT, et al. Heavy-metal concentrations in small mammals from a diffusely polluted floodplain: importance of species- and location-specific characteristics. Arch Environ Contam Toxicol 2007;52:603-613.

Włostowski T, Krasowska A, Łaszkiwicz-Tiszczenko B. Dietary cadmium induces histopathological changes despite a sufficient metallothionein level in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). Comp Biochem Physiol C 2000;126:21-28.

Włostowski T, Bonda E, Krasowska A. Photoperiod affects hepatic and renal cadmium accumulation, metallothionein induction, and cadmium toxicity in the wild bank vole (*Clethrionomys glareolus*). Ecotoxicol Environ Saf 2004;58:29-36.

Włostowski T, Chwelatiuk E, Bonda E, Krasowska A, Zukowski J. Hepatic and renal cadmium accumulation is associated with mass-specific daily metabolic rate in the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). Comp Biochem Physiol C 2005;141:15-19.



Włostowski T, Krasowska A, Bonda E. Joint effects of dietary cadmium and polychlorinated biphenyls on metallothionein induction, lipid peroxidation and histopathology in the kidneys and liver of bank voles. *Ecotoxicol Environ Saf* 2008;69:403-410.

Włostowski T, Dmowski K, Bonda-Ostaszewska E. Cadmium accumulation, metallothionein and glutathione levels, and histopathological changes in the kidneys and liver of magpie (*Pica pica*) from a zinc smelter area. *Ecotoxicol* 2010;19:1066-1073.

Zhang Z, Qin W, Cheng S, Xu L, Wang T, Zhang XX, et al. Assessing the toxicity of ingested Taihu Lake water on mice via hepatic histopathology and matrix metalloproteinase expression. *Ecotoxicol* 2011;20:1047-1056.



---

*Partie 2: Blood parameters as  
biomarkers of trace metal exposure  
and effect in wild wood mice  
(Apodemus sylvaticus) living along  
a gradient of pollution*

---

Cette partie de chapitre fait l'objet d'une publication actuellement soumise à Chemosphere.



# **Blood parameters as biomarkers of trace metal exposure and effect in wild wood mice (*Apodemus sylvaticus*) living along a gradient of pollution**

**Nicolas Tête, Eve Afonso, Ghada Bouguerra, Renaud Scheifler**

## **Abstract**

Small mammal populations living on contaminated sites are exposed to various chemicals. Lead (Pb) and cadmium (Cd), two well known non essential trace metals, accumulate in kidneys and liver and have been pointed out for causing multiple adverse effects. To develop non lethal markers in ecotoxicology, the present work aimed to study the relationships between blood parameters (hematocrit, leukocytes and granulated erythrocytes levels) and Cd and Pb concentrations in soils, liver and kidneys of wood mice (*Apodemus sylvaticus*). Individuals were trapped along a gradient of pollution highly contaminated by Cd, Pb and zinc (Zn). Results indicated that haematological parameters were independent from individual characteristics (age and gender). Blood parameters varied along the gradient of pollution, following a similar pattern as the accumulation of Cd in wood mice organs. Hematocrit and leukocytes number decreased with Cd concentrations in kidneys and/or in the liver. Finally, hematocrit was lower in animals above thresholds (LOAELs) for Cd concentrations in liver. These responses were interpreted as a warning for potential negative effects of Cd exposure on the oxygen transport capacity of blood (*e.g.* anemia). Present results suggest that blood parameters, notably hematocrit, may constitute a lowly invasive biomarker for the evaluation of Cd exposure in further ecotoxicological studies.

### **Capsule**

Haematological parameters allow a relatively noninvasive evaluation of cadmium exposure in wild wood mice (*Apodemus sylvaticus*).

### **Highlights**

- Blood parameters as biomarkers of exposure to metals were studied in wood mice
- Hematocrit decreased with Cd concentrations in the liver and in kidneys
- Hematocrit was lower in animals considered at risk due to Cd burdens in the liver
- Wood mice living on highly polluted sites exhibited signs of anemia
- Blood parameters may constitute lowly invasive biomarkers of exposure to Cd

### **Keywords**

Non-lethal approach; Haematology; Trace metal; Risk to wildlife; Persistent pollution

## 1 Introduction

---

Animals living on sites polluted by trace metals (TMs) may accumulate these elements in their tissues. When the levels of toxic chemicals overcome the various mechanisms of defense of the organism, specific physiological parameters can be modified. Numerous studies dealing with small mammals have highlighted various adverse effects due to TMs, such as genetic damages (Sanchez-Chardi et al., 2008; Scheirs et al., 2006), effects on the immune system (Propst et al., 1999; Tersago et al., 2004) or histological alterations (Ceruti et al., 2002; Sanchez-Chardi et al., 2009). However, most of those approaches induce the sacrifice of individuals. Such lethal approaches may be undesirable when the dynamic of populations should not be disturbed and/or when capture-mark-recapture experiments are envisaged. In this framework, biomarkers that can be studied with a relatively noninvasive method like blood sampling may be favored. Haematology is considered as a sensitive early warning of TM toxic effects (Rogival et al., 2006). Several studies have already reported haematological changes in laboratory rodents (Bersenyi et al., 2003; Friberg et al., 1986; Hiratsuka et al., 1996) but studies dealing with wild small rodents remained scarce (Gorriz et al., 1996; Nunes et al., 2001). Even though responses can differ because of many biotic factors, such as age, gender or genetic background (Biser et al., 2004; Miller, 1996), blood cell counts give a general evaluation of the health condition of an individual (Tersago et al., 2004). More precisely, erythrocyte count, hematocrit and hemoglobin concentrations are considered as measures of oxygen transport capacity of blood (Tersago et al., 2004) and leukocyte count change can be interpreted as a nonspecific disease resistance (Rogival et al., 2006).

In a previous study, we analyzed histological alterations in the liver and in kidneys of a population of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) trapped along a gradient of pollution surrounding an ancient lead (Pb) and zinc (Zn) smelter named Metaleurop Nord, northern France (Tête et al., 2014). The area is highly polluted, mainly by cadmium (Cd) and Pb (Tête et al., 2014), and results highlighted that individuals from the most contaminated sites exhibited more alterations with acute severity than individuals from the control site. Moreover, individuals that were above Cd and Pb LOAELs (Lowest Observed Adverse Effect Levels, toxic thresholds based on Cd and Pb concentrations in the liver and in kidneys, Shore and Rattner, 1994a; 1994b) had their individual scores of alteration (sum of all observed alterations) significantly higher than individuals below thresholds (Tête et al., 2014). Taken together, those results showed that wood mice inhabiting the surroundings of Metaleurop

Nord were at risk for metal induced effects and exhibited acute pathologies. In this previous work, histological analyses presented a clear advantage to easily identify and quantify alterations caused by TMs in target organs. However, histology constitutes a lethal method and obviously cannot be used in routine for population survey or capture-recapture procedures.

By evaluating some haematological parameters (hematocrit, percentage of leukocytes and of granulated erythrocytes) in the wood mice population previously studied for histological analyses, the aim of the present work was to observe the responses of blood parameters (1) along the gradient of pollution, and (2) with the concentrations of Cd and Pb in the liver and in kidneys of wood mice.



---

## 2 Materials and methods

---

### 2.1 Study site, small mammals collection and preparation

---

Fieldwork was conducted around the former Pb and Zn smelter called Metaleurop Nord (northern France, 50°25'42 N 3°00'55 E). For more than 100 years, its activity has caused dramatic pollution of the area by three main TMs: Cd, Pb, and Zn. The metal concentrations in soils range from 0.1 to 2,402 mg/kg for Cd, from 16 to 41,960 mg/kg for Pb and from 44 to 38,760 mg/kg for Zn. Concentrations decrease with the distance to the smelter and are related to prevailing SW-NE winds (Fritsch et al., 2010) even if anthropogenic activities have disturbed this global pattern (Douay et al., 2009). The study area spanning 40 km<sup>2</sup> around the former smelter was divided into 160 squares of 500 x 500 m that constituted our sampling units. One control site (hereafter named “-”), 10 km North away from Metaleurop Nord was compared with three representative sampling units around the former smelter selected according to their levels of metal pollution: one lightly “+”, one moderately “++”, and one highly “+++” polluted square. Cadmium and Pb soil contamination characteristics for each sampling unit are given in Table III.1. The same group of individuals was used in the present study and in Tête et al. (2014) for histological analyses. Briefly, during spring 2011 (from the 3<sup>rd</sup> to the 15<sup>th</sup> of April), a total of 84 wood mice were trapped, using non-lethal INRA traps, along the gradient of pollution: 17 individuals on the site “-”, 18 on the site “+”, 27 on the site “++” and 22 on the site “+++”. Six individuals (3 from the “-” site, 2 from the “+” site and 1 from the “+++” site) were considered as juveniles and were excluded from the dataset for further analyses (78 adult mice were thus analyzed in the present study). Sampling authorization was given by the *Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement* (DREAL) of Nord-Pas-de-Calais. Wood mice were euthanized by cervical dislocation following the American Veterinary Medical Association ethical guidelines (A.V.M.A., 2013). In each specimen, gender was determined during dissection and crystalline lenses were taken to estimate the relative age of wood mice (protocol issued from Quéré and Vincent, 1989).

**Tableau III.1 Minimum, median, mean, and maximum Cd and Pb concentrations ( $\mu\text{g/g DM}$ ) in soils, in the liver and in kidneys of wood mice collected around the former Metaleurop Nord smelter. Results are presented for each sampling unit (square) corresponding to each pollution level. UDL = Under Limit of Detection.**

Matrix	TM	Control (-)			Lightly polluted (+)			Moderately polluted (++)			Highly polluted (++++)					
		Min	Median	Mean	Max	Min	Median	Mean	Max	Min	Median	Mean	Max			
Soil	Cd	1.1	1.5	1.4	1.6	5.8	5.2	6.0	3.6	9.1	7.0	13.3	15.3	31.9	44.6	78.6
	Pb	96.1	111.7	99.8	116.1	270.2	280.1	333.0	244.6	512.0	407.7	805.6	658.5	1008.1	2871.9	7330.6
Liver	Cd	0.3	0.9	1.4	4.3	3.4	4.8	17.0	1.6	8.1	11.2	32.1	1.4	3.8	5.6	18.6
	Pb	UDL	UDL	0.09	0.5	0.1	0.6	6.3	UDL	0.4	0.8	3.7	0.2	0.8	1.3	4.2
Kidneys	Cd	0.3	3.7	5.1	17.8	16.6	17.4	34.8	7.7	32.9	38.1	120.0	4.3	14.9	16.5	40.1
	Pb	UDL	0.9	1.0	2.6	2.0	4.2	35.0	0.6	3.1	16.0	281.7	3.5	10.0	24.8	268.3

## 2.2 Blood parameters evaluation

---

After euthanasia, heads of wood mice were immediately cut off and blood samples were collected from the neck flow. Hematocrit (expressed in volume percentage of erythrocyte in the blood) was measured on 10 $\mu$ L of fresh blood using a field analyzer (Analyseur Mikro 2H Hemoglobine/Hematocrite, KITVIA). One drop of the freshly collected blood was used to perform blood smears (2 replicates per individual). Once dried, blood smears were fixated in a 10 mn bath of pure methanol (Carlo Erba). In order to differentiate cellular types, blood smears were tainted using the May-Grünwald Giemsa method (MGG method, RAL-diagnostics). Leukocyte cells, adult erythrocytes, and granulated erythrocytes (pathological erythrocytes) were counted on homogeneous locations on blood smears (only one layer of cells) by observation in light microscopy. Observations were realized on two replicates of blood smears on 30 fields of observations for each smear and samples were codified in a “blind” manner to avoid subjective bias. Cell types are expressed hereafter in levels: number of leukocytes or granulated erythrocytes / number of adult erythrocytes x 10000.

## 2.3 Quantification of Cd and Pb in tissues

---

Samples of hepatic and renal tissues of each individual were dried until constant weight (one week; 45°C) and digested using nitric acid (HNO<sub>3</sub>, 65%, Carlo-Erba analytical quality) in a dry oven (65°C) during 72h. Therefore, samples were diluted in ultra-pure water (18.2 M $\Omega$ /cm<sup>2</sup>) prior the quantification of Cd and Pb in a furnace atomic absorption spectrometry (AAS, VARIAN 240Z). All TM concentrations were expressed as  $\mu$ g/g dry mass (DM). A total of 12 blanks (nitric acid + ultra-pure water) and two certified reference materials (CRM: TORT-2, lobster hepatopancreas, and DOLT-3, dogfish liver, from the National Research Council Canada) were also analyzed with tissue samples. Duplicates were performed for each sample and if RSD was above 5%, they were repeated. Average recoveries of CRM were calculated at 94  $\pm$  20% and 97  $\pm$  20% for Cd and 98  $\pm$  12% and 107  $\pm$  11% for Pb, for DOLT-3 and TORT-2 respectively. Detection limits in organs were 0.03  $\mu$ g/g DM and 0.01  $\mu$ g/g DM for liver, and 0.32  $\mu$ g/g DM and 0.04  $\mu$ g/g DM for kidneys, for Pb and Cd, respectively. When a concentration value was under the detection limit, half of the detection limit value was used for statistical analyses.

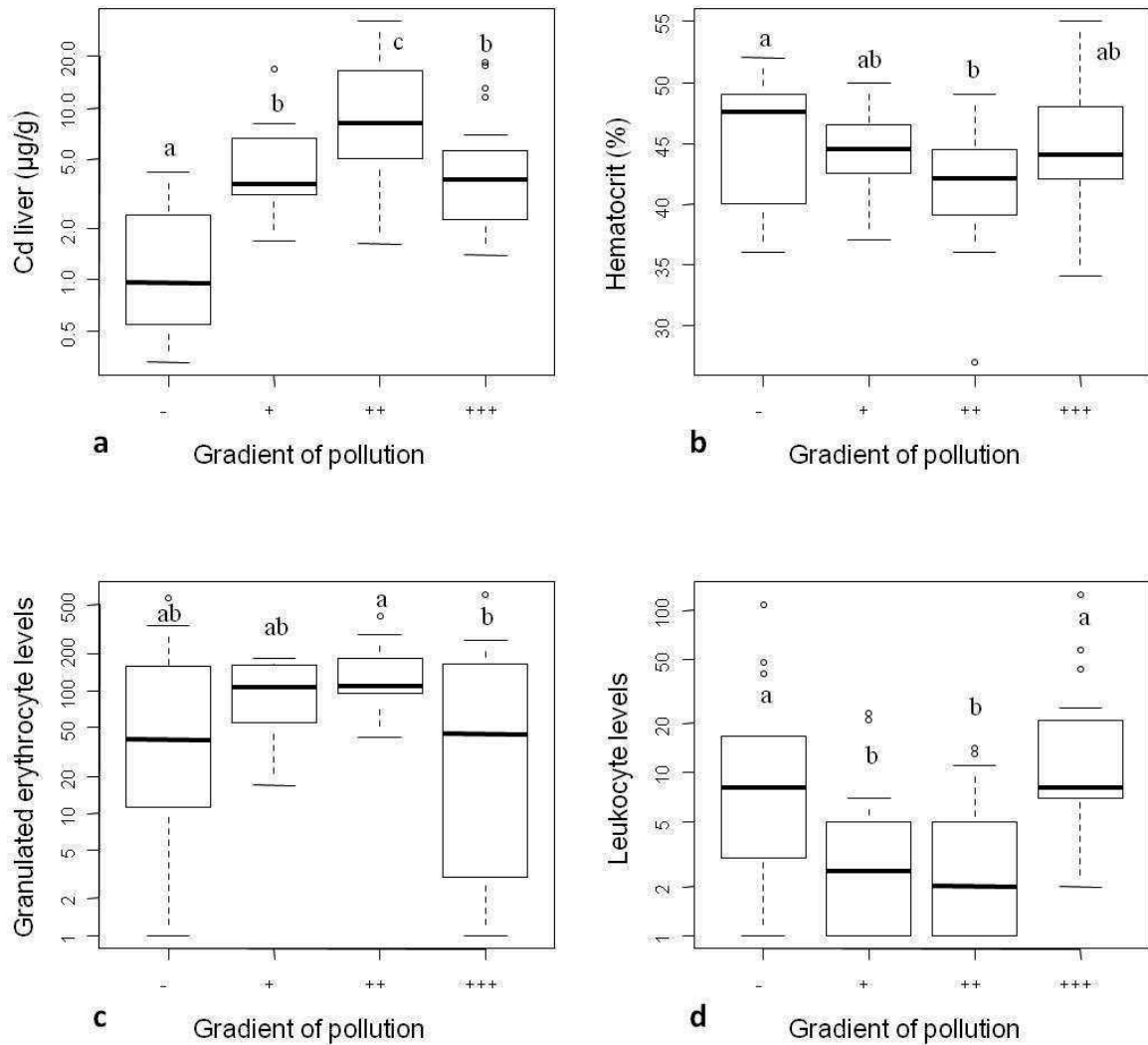
## 2.4 Statistical analysis

---

Because the distributions of leukocyte cells, granulated erythrocytes, Cd and Pb concentrations in the organs and in the soil were skewed, variables were log-transformed (base 10). The levels of Cd and Pb accumulation in hepatic and renal tissues along the gradient of pollution were compared using Fisher tests, and the pairwise differences were determined using Tukey's HSD post-hoc multiple comparison test. Relationships between blood parameters and individual characteristics, age and gender, were tested using Fisher tests. The relationships between blood parameters and Cd and Pb concentrations in the liver and in kidneys of wood mice were tested using Fisher tests or Spearman rank correlations if the distribution of residuals from linear models, tested using Kolmogorov-Smirnov tests, was skewed. Responses of blood parameters along the gradient of pollution were tested using Fisher tests and pairwise comparisons were performed using post hoc Tukey's HSD tests. Finally, potential mean differences of blood parameters levels in function of LOAELs threshold (individuals below or above the threshold) for Cd in the liver were tested using Mann-Whitney tests because number of individuals was not evenly distributed between groups. All statistical analyses were performed using R 2.15.1 software with the additional library "pgirmess" (R Development Core Team, 2012).

### 3 Results and Discussion

Cadmium and Pb concentrations in both the liver and kidneys increased along the gradient of pollution (Table III.1, Figure III.1a). Concentrations of Pb in the liver and the kidneys increased significantly along the gradient of pollution from the control “-” site to the highly polluted “+++” site ( $F = 24.67$ ,  $df = 3$  and  $74$ ,  $p < 0.001$  in the liver, and  $F = 16.74$ ,  $df = 3$  and  $74$  and  $p < 0.001$  in the kidneys, Table III.1). The concentrations of Cd in both the liver and the kidneys of mice also differed significantly along the gradient of pollution (in the liver,  $F = 21.68$ ,  $df = 3$  and  $74$ ,  $p < 0.001$ , and in the kidneys,  $F = 27.35$ ,  $df = 3$  and  $74$ ,  $p < 0.001$ ) but, contrary to Pb, highest internal concentrations of Cd were found on the moderately polluted site “++” instead of the highly polluted site “+++”, showing a bell-shaped curve (Tukey’s HSD test,  $p_{++/+++} = 0.003$  for the kidneys and  $p_{++/+++} = 0.011$  for the liver, Table III.1, Figure III.1a). These results indicate that transfer of Cd might be higher on the moderately polluted site. As land use and spatial heterogeneity can influence environmental TM availability (Fritsch et al., 2011; van den Brink et al., 2011), we hypothesised that the present pattern was due to the presence of recent tree plantations on the moderately polluted site that reduced the interception and the retention of TMs in soils. In fact, the land use from the moderately polluted site is mainly composed of tree plantations whereas other sites are dominated by natural forest (-), agricultural fields (+) and shrublands (+++) that may induce differences in soil characteristics between sampling sites. The effect of spatial heterogeneity and landscape on bioaccumulation in different species of vertebrates has previously been observed around the former Metaleurop Nord smelter (Fritsch et al., 2011, 2012). Moreover, we also hypothesized that potential variations in the wood mouse diet and in the bioavailability of Cd from the soil to the various diet items between sampling sites may provide an explanation for this unusual pattern of Cd accumulation.



**Figure III.1** Cadmium concentrations in the liver (a), hematocrit (b), granulated erythrocyte (c) and leukocyte levels (d) in function of the gradient of pollution. Different letters correspond to significantly different means (Tukey's HSD,  $p < 0.05$ ).

In the present work, none of the studied blood parameters was related to either the relative age (estimated by the crystalline lens mass) (F-tests,  $0.393 < p < 0.692$ ) or the gender of individuals (F-tests,  $0.117 < p < 0.836$ ). Hematocrit was negatively correlated with Cd concentrations in both the liver and kidneys (F = 13.05, df = 1 and 76,  $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.15$  and F = 5.80, df = 1 and 76,  $p = 0.018$ ,  $R^2 = 0.07$ , respectively, Figure III.2a and b). Moreover, hematocrit was also significantly related with the level of pollution (F = 2.74, df = 3 and 74 and  $p = 0.049$ , Figure III.1b). Hematocrit decreased from control site “-” until moderately polluted site “++” ( $p_{0/++} = 0.044$ , Figure III.1b). This pattern is comparable to the one previously described for Cd accumulation in both the liver and kidneys along the levels of pollution (Table III.1, Figure III.1a). Present results are in accordance with previous studies. Gorriz (Gorriz et al., 1996) for instance found that *Mus musculus* individuals, placed in cages

on a site polluted by SO<sub>2</sub>, NO<sub>x</sub> and particles from a coal-fired power plant, presented significant hematocrit decrease compared to individuals from non polluted site. Similarly, Rogival (Rogival et al., 2006) studied the impact of TM rejected by a nonferrous plant on hematological characteristics of wood mouse living along a gradient of pollution. Authors also found that hematocrit decreased along the gradient of pollution and decreased with blood levels of Cd and Pb in wood mice (Rogival et al., 2006). Under laboratory exposure, to our knowledge, two studies evaluated the effect of Cd intake on hematocrit levels (Hiratsuka et al., 1996; Włostowski et al. 2000). In one study, authors injected in different groups of Sprague-Dawley rats (Charles river, Japan) saline solutions (control), 0.05 and 0.5 mg/kg of CdCl<sub>2</sub> in the tail veins, 5 days a week up to 50 weeks (Hiratsuka et al., 1996). In the other study, authors used laboratory bred Bank voles, *Clethrionomys glareolus*, and exposed them to wheat grains spiked with 0, 40 or 80 µg of Cd per gram (dry weight) for 6 weeks (Włostowski et al. 2000). In both studies, authors found significant decreases of hematocrit levels in individuals exposed to high concentrations of Cd compared to controls (Hiratsuka et al., 1996; Włostowski et al. 2000). The decrease of hematocrit in animals presenting high hepatic and renal concentrations of Cd and in animals living on highly contaminated sites was interpreted as an early warning for potential negative effects of TM exposure on the oxygen transport capacity of blood, potentially leading to anemia (Rogival et al., 2006; Tersago et al., 2004). Present results suggest that hematocrit levels could constitute a useful non-lethal biomarker for Cd adverse effects.

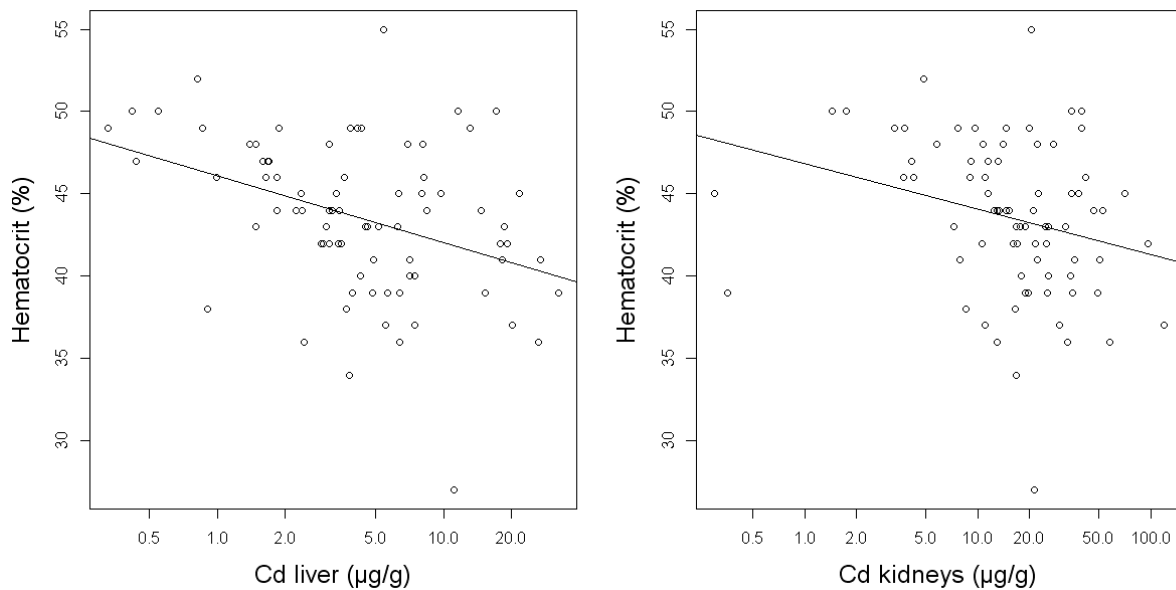


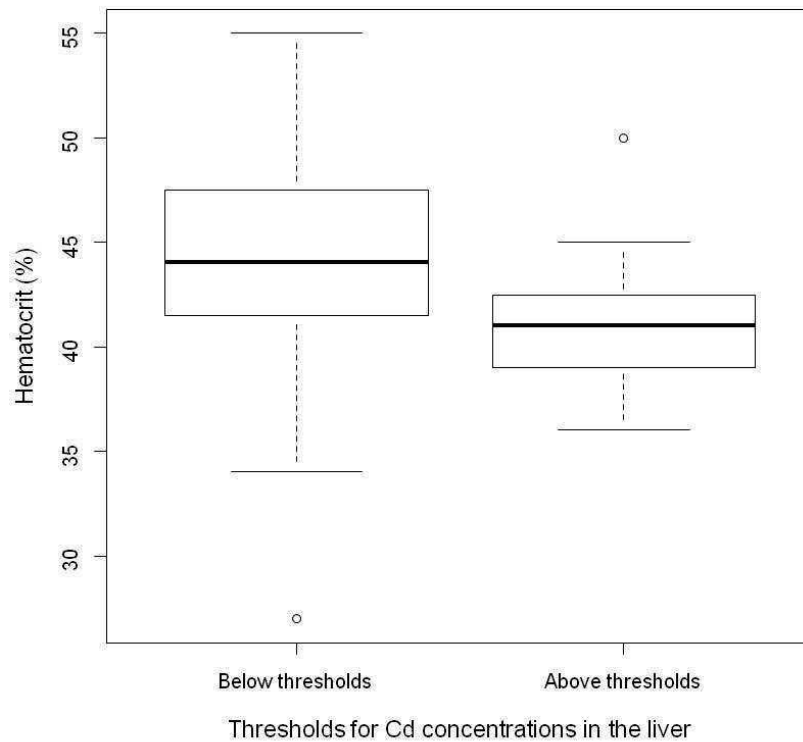
Figure III.2 Hematocrit (%) in function of Cd concentrations in the liver (a) and in kidneys (b).

Levels of granulated erythrocytes (pathological erythrocytes) also differed along the gradient of pollution ( $F = 4.25$ ,  $df = 3$  and  $74$ ,  $p = 0.008$ , Figure III.1c). Pairwise comparisons indicated that levels of granulated erythrocytes were higher on the “++” site compared to the “+++” site (Tukey’s HSD tests,  $p_{++/+} = 0.012$ ). This result followed a similar pattern as the accumulation of Cd in organs (Table III.1, Figure III.1a and c). Those basophilic granulations, clues of erythrocyte pathology, can be interpreted as an effect of Cd accumulation (Topashka-Ancheva et al., 2003). Topashka-Ancheva et al. (2003) concluded from their study that tests performed on red blood cells and quantitative morphological alterations in erythrocytes were evidence of TM toxic effects. Moreover, among the eight species analyzed in their study, *A. sylvaticus* had the highest percentage of basophilic granulations (Topashka-Ancheva et al., 2003). Because erythrocytes cannot fulfill their function of oxygen-transportation, differences in blood cell morphology, and notably basophilic granulated erythrocytes, were also pointed out as potentially inducing anemia, one of the major effects of Cd (Cooke and Johnson, 1996). Hematocrit was negatively correlated with the levels of granulated erythrocytes in blood (Spearman rank correlation test,  $r_s = -0.36$ ,  $p = 0.001$ ), potentially indicating acute adverse effects for individuals with important Cd concentrations.

Levels of leukocytes decreased with Cd concentrations in kidneys (Spearman rank correlation test,  $r_s = -0.29$ ,  $p = 0.011$ ). Moreover, levels of leukocytes in the blood significantly differed along the gradient of pollution (Figure III.1d,  $F = 10.34$ ,  $df = 3$  and  $74$ ,  $p < 0.001$ ). Pairwise comparisons showed that leukocyte levels were significantly higher on the “-” and the “+++” sites than in “+” and “++” sites (Tukey’s HSD tests,  $p_{-/ +} = 0.036$ ,  $p_{-/ ++} = 0.008$ ,  $p_{+++ / +} = 0.001$ ,  $p_{+++ / ++} < 0.001$ ), that did not differ. High levels of leukocytes found in individuals inhabiting the control site “-” were unexpected. We hypothesized that this increase may be due to site-specific features, such as the presence of parasites or the lack of food resources that may play an important role on the immune system. However, the results from the 3 polluted sites around Metaleurop smelter are in accordance with studies that found an increase of leukocytes number with internal TM concentrations in different species of small mammals (Adham et al. 2011; Gorriz et al., 1996; Guilhermino et al., 1998; Kanter et al., 2005; Tersago et al., 2004; Topashka-Ancheva et al., 2003). Leukocyte increase on the highly polluted site may indicate a response to an inflammatory process or to infection. In a pollution context, this increment can be linked to an increased sensibility of individuals to inflammatory, irritative diseases or infection to pathogens (Adham et al., 2011; Gorriz et al., 1996; Guilhermino et al., 1998).



Shore and Douben (1994a) defined LOAELs for toxic effects of Cd for small mammals; 15  $\mu\text{g/g}$  DM in liver and 105  $\mu\text{g/g}$  DM in kidneys. Among the 78 individuals studied, eleven individuals had their liver concentrations above thresholds and these mice exhibited a significantly lower hematocrit levels (Figure III.3;  $U = 226$ ,  $p = 0.041$ ). This result indicated a clear correlation between potential toxicity represented by the thresholds and the toxic effects revealed by the blood parameters, notably the anemia.



**Figure III.3 Hematocrit (%) in function of LOAELs threshold defined by Shore and Douben (1994a) for toxic effects due to Cd concentrations in the liver.**

#### 4 Conclusion

---

Present study highlighted that blood parameters appear to be an appropriate biomarker of TM exposure and effects on wood mice. Results suggested that mice exhibiting the highest TM concentrations, notably Cd, in their organs may be at risk for metal induced pathologies (anemia for instance). Moreover, in a context in which, for practical and ethical reasons, less intrusive and non lethal markers need to be developed, haematological parameters and notably hematocrit may constitute a tool for Cd adverse effects evaluation. Further studied should seek to promote those parameters as lowly invasive ecotoxicological biomarkers. More investigations are also needed on white blood cells strain levels or on blood biochemistry parameters to develop more TM-specific blood markers.

#### 5 Acknowledgements

---

The authors gratefully thank Anne-Pauline Bellanger, Nadia Crini, Séverine Drouhot, Patrick Giraudoux, Cécile Grand, Anne-Sophie Prudent and Francis Raoul for their technical and analytical help and for many scientific discussions. The *Conseil Régional de Franche-Comté* and the ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) financially supported the present work.

## 6 Bibliography

---

Adham, K.G., Al-Eisa, N.A., Farhood, M.H., 2011. Impact of heavy metal pollution on the hemogram and serum biochemistry of the libyan jird, *Meriones libycus*. Chemosphere. 84, 1408-1415.

A.V.M.A., 2013. American Veterinary Medical Association - Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 ed. Available at: [https://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](https://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf)

Bersenyi, A., Fekete, S.G., Szocs, Z., Berta, E., 2003. Effect of ingested heavy metals (Cd, Pb, and Hg) on hematology and serum biochemistry in rabbits. Acta. Vet. Hung. 53, 297-304.

Biser, J., Vogel, L., Berger, J., Hjelle, B., Loew, S.S., 2004. Effects of heavy metals on immunocompetence of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). J. Wildl. Dis. 40, 173-184.

Ceruti, R., Ghisleni, G., Ferretti, E., Cammarata, S., Sonzogni, O., Scanziani, E., 2002. Wild rats as monitors of environmental lead contamination in the urban area of Milan, Italy. Environ. Pollut. 117, 255-259.

Cook, J.A., Johnson, M.S., 1996. Cadmium in small mammals. In Beyer, W.N., Heinz, G.H., Redmon-Norwood, A.W. (eds.), Environmental contaminants in wildlife. Interpreting tissue concentrations. SETAC Special Publications Series. Lewis, Boca Raton, FL, USA. pp. 281-296.

Douay, F., Pruvot, C., Waterlot, C., Fritsch, C., Fourrier, H., Loriette, A., Bidar, G., Grand, C., de Vaufléury, A., Scheiffler, R., 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. Sci. Total Environ. 407, 5564-5577.

Friberg, L., Nordberg, G.F., Vouk, V., 1986. Handbook on the toxicology of metals. New York: Elsevier North Holland Biomedical Press.

Fritsch, C., Giraudoux, P., Coeurdassier, M., Douay, F., Raoul, F., Pruvot, C., Waterlot, C., de Vaufleury, A., Scheifler, R., 2010. Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere*. 81, 141-155.

Fritsch, C., Coeurdassier, M., Giraudoux, P., Raoul, F., Douay, F., Rieffel, D., de Vaufleury, A., Scheifler, R., 2011. Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: Influence of soil contamination and landscape. *PLoS ONE*. 6(5), e20682.

Fritsch, C., Coeurdassier, M., Faivre, B., Baurand, P.-E., Giraudoux, P., van den Brink, N.W., Scheifler, R., 2012. Influence of landscape composition and diversity on contaminant flux in terrestrial food webs: A case study of trace metal transfer to European blackbirds *Turdus merula*. *Sci. Total Environ*. 432, 275-287.

Gorritz, A., Llacuna, S., Riera, M., Nadal, J., 1996. Effects of air pollution on hematological and plasma parameters in *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 31, 153-158.

Guilhermino, L., Soares, A.M.V.M., Carvalho, A.P., Lopes, M.C., 1998. Effects of cadmium and parathion exposure on hematology and blood biochemistry of adult male rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*. 38, 969-974.

Hiratsuka, H., Katsuta, O., Toyota, N., Tsuchitani, M., Umemura, T., Marumo, F., 1996. Chronic cadmium exposure-induced renal anemia in ovariectomized rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 137, 228-236.

Kanter, M., Coskun, O., Gurel, A., 2005. Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on cadmium-induced oxidative stress in the blood of rats. *Biol. Trace Elem. Res*. 107, 277-288.

Miller, R.A., 1996. The aging immune system: primer and prospectus. *Sci*. 273, 70-74.

Nunes, A., Mathias, M., Crespo, A., 2001. Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals. *Environ. Pollut*. 113, 87-93.

Propst, T.L., Lochmiller, R.L., Qualls, Jr. C.W., McBee, K., 1999. *In situ* (mesocosm) assessment of immunotoxicity risks to small mammals inhabiting petrochemical waste sites. *Chemosphere*. 38, 1049-1067.

Quéré, J.P., Vincent, J.P., 1989. Détermination de l'âge chez le Mulot gris par la pesée des cristallins. *Mammalia*. 53, 287-293.

R Development Core Team, 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available: <http://www.R-project.org>

Rogival, D., Scheirs, J., de Coen, W., Verhagen, R., Blust, R., 2006. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 149-157.

Sanchez-Chardi, A., Marques, C.C., Gabriel, S.I., Capela-Silva, F., Cabrita, A.S., Lopez-Fuster, M.J., Nadal, J., Mathias, M.L., 2008. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. *Environ. Pollut.* 156, 1332-1339.

Sanchez-Chardi, A., Penarroja-Matutano, C., Borrás, M., Nadal, J., 2009. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals Part III: Structural alterations. *Environ. Res.* 109, 960-967.

Scheirs, J., de Coen, A., Covaci, A., Beernaert, J., Mubiana Kayawe, V., Caturla, M., de Wolf, H., Baert, P., van Oostveldt, P., Verhagen, R., Blust, R., de Coen, W., 2006. Genotoxicity in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a pollution gradient: exposure-, age-, and gender-related effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2154-2162.

Shore, R.F., Douben, P.E.T., 1994a. The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 29, 101-112.

Shore, R.F., Douben, P.E.T., 1994b. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 134, 49-89.

Tersago, K., de Coen, W., Scheirs, J., Vermeulen, K., Blust, R., van Bockstaele, D., Verhagen, R., 2004. Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient. *Environ. Pollut.* 132, 385-394.

Tête, N., Durfort, M., Rieffel, D., Scheifler, R., Sánchez-Chardi, A., 2014. Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, *Apodemus sylvaticus*, around a former smelter. *Sci. Total Environ.* 481, 167-177.

Topashka-Ancheva, M., Metcheva, R., Teodorova, S., 2003. A comparative analysis of the heavy metal loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: chromosomal aberrations and blood pathology. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 54, 188-193.

van den Brink, N.W., Lammertsma, D.R., Dimers, W.J., Boerwinkel, M.C., 2011. Cadmium accumulation in small mammals: species traits, soil properties, and spatial habitat use. *Environ. Sci. Technol.* 45, 7497-7502.

Włostowski, T., Krasowska, A., Łaskiewicz-Tiszczenko, B., 2000. Dietary cadmium induces histopathological changes despite a sufficient metallothionein level in the liver and kidneys of the bank vole (*Clathronomys glareolus*). *Comp. Biochem. Physiol. C.* 126, 21-28.

---

*Chapitre 4: Metal pollution and  
landscape features are associated to  
an increase of parasitism in wild  
wood mice (*Apodemus sylvaticus*)*

---

Cet objectif fait l'objet d'une publication actuellement en cours de préparation pour Environmental Health Perspectives.





## **Metal pollution and landscape features are associated to an increase of parasitism in wild wood mice (*Apodemus sylvaticus*)**

**Nicolas Tête, Eve Afonso, Clémentine Fritsch, Lucile Mougin, Anne-Claude Gabiot-Goydadin, Renaud Scheifler**

### **Abstract**

Rodent species constitute reservoir hosts for the transmission of various zoonoses to humans. Anthropogenic disturbances such as pollution by trace metals and landscape alterations potentially impact on parasite community. Thus, the goal of the present study was to investigate the potential association between parasite community, landscape features and trace metals concentrations in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) free living in the surroundings of a former smelter. Parasites (bacteria and coccidian prevalence and richness, internal (liver and kidneys) and environmental (soil) Cd and Pb concentrations were measured and landscape features were described. Over the 11 parasites screened, six (three coccidia and three bacteria) were found in wood mice. Individuals living on the most polluted sites exhibited greater Cd and Pb levels in their tissues and the prevalence of some parasites increased. Global parasite richness, mostly governed by coccidia presence, also increased with soil metal levels and with landscape diversity. Because the area is densely populated by humans and because some of the parasites studied are the causative agent of zoonoses, the risk of parasite transmission for the local human population (55 000 persons) may be higher in the most polluted areas. Further studies associating ecotoxicology and parasitology field of expertise should be performed to better apprehend the potential implications of pollution and landscape features on parasitism risk of transmission over the multiple polluted and urbanized sites distributed worldwide.

### **Keywords:**

anthropization, zoonosis, protozoan, human risk, terrestrial wildlife

**Acknowledgments:**

The authors gratefully thank Nadia Crini, Séverine Drouhot, Patrick Giraudoux, Cécile Grand, Anne-Sophie Prudent and Francis Raoul for their help in diverse field, technical and analytical works. We would also like to thank the Conseil Régional de Franche-Comté and the ADEME (*Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie*) for financially supporting the present work.

**Competing financial interest declaration:**

All authors declare they have no actual or potential competing financial interest of any sort.

## 1 Introduction

---

Infectious diseases are the second cause of human death worldwide. About two-thirds of them are zoonoses, diseases transmitted to humans by animals (WHO 2013). In France, zoonoses are responsible for 5% of human deaths each year (InVS 2012). Beside mortality cases in human, zoonoses can cause elevated costs for public health care system due to their prevention or treatment (Epstein et Price 2009). Widely spread in animal populations, zoonotic diseases can also have a significant impact on farming and wildlife conservation (Cleaveland et al. 2002; Daszak et al. 2001; Kruse et al. 2004).

Environmental features, known to act on parasitic diseases incidence in wildlife, notably involve anthropogenic changes in land use such as deforestation, agricultural practices, urbanization, or modification of inland water circulation (Bradley and Altizer 2007; Cutler et al. 2010; Daszak et al. 2001; Patz et al. 2000, 2004). These environmental factors can act on the composition and population dynamics of host animal communities and thus influence the transmission of infectious agents (Daszak et al. 2001). For instance, the dynamics of mammal populations vary with the size and spatial array of their optimal habitat patches within a landscape (Giraudoux et al. 2003). In consequences, several studies have highlighted a positive link between the surfaces of habitats suitable to hosts and the transmission of parasitic and infectious diseases such as alveolar echinococcosis (Giraudoux et al. 2003) or Hantavirus zoonosis (Weigler 1995).

In addition to landscape composition and structure, environmental pollution has been recently increasingly cited as a potential risk for infectious diseases. Interaction between pollution and parasitism was for instance pointed out as largely responsible for amphibian decline worldwide (Gendron et al. 2003; Rohr et al. 2008). To our knowledge, the vast majority of studies dealing with pollutants and parasites interactions focused mainly on aquatic fauna, and results remain difficult to generalize to terrestrial ecosystems. Even though rodents appear as key-hosts for the study of circulation of zoonotic diseases causative agents (InVS 2012; Meerburg et al. 2009), only few works studied pollutant/parasite interactions in those species. Tersago et al. (2004) found a positive relationship between the nematodes burden in the small intestine of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) and the Cd concentrations in liver. Similarly, Halbrook et al. (1993) showed that the prevalence of *Taenia Taeniaeformis* in muskrats was higher in animals inhabiting a site contaminated by a mixture of pollutants than in animals from a non-contaminated site. On the other side, Faulkner and Lochmiller (2000) observed a lower abundance and a decreased richness of helminth community in

cotton rats (*Sigmodon hispidus*) inhabiting a site contaminated by petrochemicals compared to those from the reference site. Although the underlying mechanisms linking pollution to parasite infection in hosts are not well understood, several hypotheses have been proposed to explain how pollution can influence parasitism (Lafferty 1997), and two opposite scenarios have been described. In one hand, exposure to several pollutants known as having immunotoxic effects, such as trace metals like cadmium (Cd) and lead (Pb) (Krzystyniak et al. 1995), may reduce immunocompetence and increase parasites prevalence and/or richness in hosts (Sures 2004, 2007). In another hand, some studies showed a reduction of parasite diversity in polluted ecosystems (King et al. 2010; Lafferty 1997).

There is an evident need to understand how pollution and landscape features can impact on parasitism and what can be the consequences for disease transmission. In this context, the aim of the present study is to evaluate the influence of anthropogenic disturbances, notably pollution by Cd and Pb and landscape characteristics, on the prevalence and richness of several parasites (bacteria and coccidia) in wild wood mice inhabiting variously urbanized and polluted sites surrounding a former smelter. Since the studied area is densely populated and because some of the parasites studied are the causative agent of zoonoses, the risk of parasite transmission to human is discussed.

## 2 Materials and methods

---

### 2.1 Study site

---

Fieldwork was conducted around the former Pb and zinc (Zn) Metaleurop Nord smelter (Noyelles-Godault, Nord-Pas-de-Calais, 50°25'42 N 3°00'55 E). Smelting activity lasted more than 100 years and caused dramatic pollution in this area by three main trace metals (TMs): Cd, Pb, and Zn (Fritsch et al. 2010). Soil metal levels ranged from 0.1 to 2,402 µg/g of dry matter (DM) for Cd and from 16 to 41,960 µg/g DM for Pb (Fritsch et al. 2010). The study area spanning 40 km<sup>2</sup> around the former smelter was divided into 160 squares of 500x500m that constituted the sampling units. To evaluate the concentration of TMs in the soil (0–25 cm depth), a composite soil sample (15 points) was collected in five to ten woody patches (hedgerows, copses, groves and forests) in each square during the autumn of 2006.

### 2.2 Small mammals sampling and processing

---

During fall 2010, 245 wood mice were trapped (101 females and 144 males) over 7 squares from the grid with the purpose of obtaining 3 squares along a pollution gradient (103, 117 and 097) and 3 squares at the same level of pollution exhibiting different landscapes (043, 113 and 171) (Table III.1). A control site (TE2), 10 km northeast of the smelter, exhibiting lower soil concentrations, was also sampled. Sampling of wood mice was performed in woody patches because they are suitable habitats for small mammals (Fritsch et al. 2010). Wood mice were captured using lines of baited snap traps. This technique matches the recommendations for rodent euthanasia in field situation advised by the American Veterinary Medical Association in its ethical guidelines (AVMA 2013). On each square, 10 lines of 10 traps 3m-spaced were placed in patches where soils were sampled. In further analyses, Cd and Pb soil concentrations measured in the patch corresponding to the trapline were associated to the animals trapped on this line. The individuals were frozen following the capture and stored at -20°C until dissection. Then, individuals were identified to the specific level, weighed, measured, dissected, and sexed. The relative age of rodents was estimated using dry crystalline lens weight (protocol issued from Quéré and Vincent 1989). The brain, heart and muscles of the left foreleg were sampled for the detection of bacteria and protozoan parasites of the locomotory system or the circulatory system, and intestinal content from stomach to *rectum* was scraped from the intestinal wall for the detection of protozoan parasites of the digestive system. The liver and kidneys were sampled for the measurement of TM concentrations.

Tableau III.1 Characteristics of sampling squares (percentage of land use and median TM concentrations in soils), sampling effort, number of individuals trapped, TM concentrations (median and min-max in squared brackets) in the liver and kidneys of wood mice, prevalence and mean richness of parasites and 95% confidence intervals in squared brackets in the sample of wood mice from Metaleurop Nord site ( $n = 160$ ). UDL = Under Detection Limit

Sampling Square		TE2	103	117	097	043	113	171	Total
Land use (%)	Urbanized	0,2	1,5	0,0	21,6	0,0	73,0	6,2	
	Agricultural	21,1	36,6	12,3	0,9	27,8	3,0	0,6	
	Natural forest	62,0	31,1	3,7	0,0	0,0	0,0	65,5	
	Tree plantation	0,0	0,0	61,3	0,0	37,5	0,0	3,3	
	Shrubland	11,9	17,4	21,2	36,2	21,2	12,0	18,3	
	Hedgerow/copse	4,6	13,4	1,6	29,0	13,5	12,0	5,5	
	Water course/ponds	0,2	0,0	0,0	12,3	0,0	0,0	0,5	
Soil Contamination ( $\mu\text{g/g DM}$ )	Cd	1.5	4.3	9.1	48.0	15.2	11.5	7.5	
	Pb	105	267	512	1295	323	679	584	
Trapping	$n$ trapnights	296	300	299	300	295	480	268	2238
	$n$ wood mice trapped	42	16	22	41	85	15	24	245
	Capture success (%)	14	5	8	14	29	3	9	9
Wood mouse contamination ( $\mu\text{g/g DM}$ )	Liver	Cd	1.51 [ 0.21 - 16.39]	2.73 [0.46 - 11.53]	6.80 [0.64 - 196.27]	3.06 [0.26 - 22.83]	1.95 [0.33 - 14.69]	0.99 [UDL - 9.51]	1.52 [0.34 - 10.43]
		Pb	UDL [UDL - 5.44]	0.43 [UDL - 1.56]	0.88 [0.26 - 5.91]	3.40 [0.34 - 33.65]	0.89 [0.40 - 17.84]	0.62 [UDL - 4.17]	0.21 [UDL - 0.94]
	Kidney	Cd	2.66 [UDL - 40.32]	6.13 [1.21 - 22.79]	11.50 [1.28 - 31.65]	12.55 [1.53 - 76.16]	3.44 [UDL - 54.10]	2.54 [UDL - 49.07]	6.67 [0.57 - 38.44]
		Pb	UDL [UDL - 1.99]	2.38 [0.81 - 6.24]	12.57 [1.23 - 161.62]	21.74 [3.43 - 157.84]	7.67 [2.53 - 68.59]	4.54 [0.62 - 28.88]	1.32 [UDL - 6.46]

III. Résultats – Chapitre 4

	42	16	22	21	20	15	24	160
<b><i>n</i> wood mice analyzed</b>								
<i>C. burnetii</i>	1	0	0	0	0	0	0	1 0.63% [0.03 – 3.45]
<i>A. phagocytophilum</i>	4	0	0	7	0	2	0	13 8.13% [4.81 – 13.40]
<i>Bartonella</i> spp.	19	10	10	9	11	9	17	85 53.13% [45.41 – 60.69]
<i>Eimeria</i> spp.	3	0	5	4	2	2	1	17 10.63% [8.75 – 19.23]
<i>Cryptosporidium</i> spp.	8	1	1	3	3	1	4	21 13.13% [6.74 – 16.36]
<i>Giardia</i> spp.	0	0	3	6	7	1	8	25 15.63% [10.81 – 22.05]
Mean parasite richness	0.81 [0.59 – 1.08]	0.69 [0.39 – 0.99]	0.86 [0.53 – 1.19]	1.38 [0.82 – 1.94]	1.15 [0.73 – 1.57]	1.00 [0.66 – 1.34]	1.25 [0.95 – 1.55]	1.01 [0.88 – 1.15]

---

### 2.3 Parasite detection

---

Initially, an amount of 20, 21 and 20 animals from the TE2, 097 and 043 squares, out of 42, 41 and 85 respectively, were randomly selected for parasites analysis (Table III.1). However, all the animals from the control site ( $n = 42$ ) were finally analyzed in order to confirm that low prevalence on this site were not due to sub-sampling. The final number of individuals analyzed for both parasite and TM detection was thus 160 mice distributed over the 7 square selected (Table III.1).

Eleven parasites were screened. In the mix of brain, heart and muscles, we searched for six bacteria (*Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella* spp., *Borrelia* spp., *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, and *Leptospira* spp.) and two coccidia (*Babesia* spp. and *Toxoplasma gondii*). In the samples of intestinal content, we screened 3 coccidia (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp. and *Giardia* spp.). DNA was extracted using QIAamp DNA mini kit (QIAGEN, France) following the manufacturers' instructions, in a robotic workstation for automated purification of DNA (QIAcube, QIAGEN). Simplex PCR were performed for each parasite. PCR were performed in a total of 12  $\mu$ L reaction mix containing 1  $\mu$ L of DNA extract, 1  $\times$  HotStarTaq PCR Master Mix (QIAGEN), 0.2  $\mu$ M of each primer, and PCR-Grade Water. Primers and annealing temperatures used for each parasite are specified in Table III.2. A negative control was included for every 10 samples. The PCR products were separated and visualized using the QIAxcel device (an automated capillary electrophoresis system commercialized by QIAGEN), using a QIAxcel DNA high-resolution kit (QIAGEN). Parasite species were confirmed by sequencing. PCR products of 2 positive samples per parasite were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN). Sequencing was realized using an Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer and primer pairs used for amplification reactions (IFR 133-IBCT, Besançon, France). A homology search of the sequences generated in this study was then performed by conducting an online NCBI Basic Local Alignment Search Tool for nucleotides (BLASTN) search of the GenBank database (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



Tableau III.2 Description of oligonucleotide sequences of primers used in PCR, target genes, and annealing temperature for the detection of the 11 parasites screened on the wood mice sample from Metaleurop Nord.

Target species	Target gene	Primer name	Primer sequence (5' to 3')	Annealing temperature (°C)	Reference
<b>Bacteria</b>					
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	msp2	Msp2 – 3F Msp2 – 3R	CCA GCG TTT AGC AAG ATA AGA G GCC CAG TAA CAA CAT CAT AAG C	65	Zeidner et al., 2000
<i>Bartonella</i> spp.	16S rRNA	P24E P12B	GGA ATT CCC TCC AGT TAG GCT GG CGG GAT CCC GAG ATG GCT TTT GGA GAT TA	58	Relman et al., 1990
<i>Borrelia</i> spp.	16S rRNA	BORF 16S	CGC TGG CAG TGC GTC TTA A GCG GCT GCT GGC ACG TAA TTA GC	50	Gil et al., 2005
<i>Coxiella burnetii</i>	htpAB	Trans 1 Trans 2	TAT GTA TCC ACC GTA GCC AGT C CCC AAC AAC ACC TCC TTA TTC	65	Willems et al., 1994
<i>Francisella tularensis</i>	16S rRNA	P1 P2	TGG CGA GTG ATA CTG CTT G TAG GAT CCC ATT AGC TGT CCA CTT ACC	60	Junhui et al., 1996
<i>Leptospira</i> spp.	secY	G1 G2	CTG AAT CGC TGT ATA AAA GT GGA AAA CAA ATG GTC GGA AG	55	Gravekamp et al., 1993
<i>Rickettsia</i> spp.	ompA	Rr190.70p Rr190.602n	ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA AGT GCA GCA TTC GCT CCC CCT	48	Regnery et al., 1991
<b>Coccidia</b>					
<i>Babesia</i> spp.	ss-rDNA	Bab1 Bab4	CTT AGT ATA AGC TTT TAT ACA GC ATA GGT CAG AAA CTT GAA TGA TAC A	56	Persing et al., 1992
<i>Cryptosporidium</i> spp.	18S rRNA	CPB-DIAGF CPB-DIAGR	AAG CTC GTA GTT GGA TTT CTG TAA GGT GCT GAA GGA GTA AGG	55	Johnson et al., 1995
<i>Eimeria</i> spp.	18S rRNA	FIE R2B	TAC CCA ATG AAA ACA GTT T CAG GAG AAG CCA AGG TAG G	55	Orlandi et al., 2003
<i>Giardia</i> spp.	16S rRNA	RH11 RH4	CAT CCG GTC GAT CCT GCC AGT CGA ACC CTG ATT CTC CGC CAG G	58	Hopkins et al., 1997
<i>Toxoplasma gondii</i>	AF487550.1	HO1f HO2r	AGA GAC ACC GGA ATG CGA TCT CCC TCT TCT CCA CTC TTC AAT TCT	58	Reischl et al., 2003

#### 2.4 Measure of TM concentrations in tissues

---

Concentrations of Cd and Pb were measured by furnace atomic absorption spectrometry (AAS, VARIAN 240Z) and expressed as  $\mu\text{g/g}$  dry mass (DM). Briefly, dried samples were digested with nitric acid and then diluted by adding ultra-pure water (Elga, 18.2 MV/cm<sup>2</sup>) prior to AAS analyses. Analysis accuracy was checked using certified reference materials (TORT-2 and DOLT3, National Research Council Canada). Repeatability (within-run precision) and reproducibility of the measurements were surveyed (checking of RSD values and use of internal standards), and quality control (control solutions and blanks to check for the absence of drift) was conducted during measurements. For concentrations under detection limits, half of the detection limit value was used for statistical analyses. More details about the protocol, analytical quality control and detection limits are given in Supplementary Material.

#### 2.5 Landscape diversity, composition and structure

---

Land use was mapped (resolution: 1 pixel = 4m) based on CORINE Land Cover database and digitalization (Fritsch et al. 2011a), considering seven land use classes: urban areas, agricultural areas, natural forests, tree plantations, shrublands, hedgerows/copses, and water courses and ponds. The size of wood mice home-range was reported to be close to 2500m<sup>2</sup> in the literature (Wijnhoven et al. 2005), which represents, assuming a circular home-range, a 56 meters diameter circle. In this study, the circle diameter was arbitrarily doubled as covering a larger zone in order to ensure that the area actually exploited by the mice was included in the circular buffer and to limit edge effects. Landscape features were assessed in the buffers around each trapline. Landscape composition was evaluated computing the number of pixels for the seven land use types. Landscape diversity was assessed by computing a Shannon index. Landscape structure was described using the following landscape metrics: number of patches, total area, total edge, aggregation index, landscape division index and the patch cohesion index, for each of the seven categories of land use.

#### 2.6 Statistical analysis

---

As the distributions of TM concentrations were skewed, liver, kidneys, and soil TM concentrations were log<sub>10</sub>-transformed. Due to skewed distribution, and heterogeneous dispersion of parasite prevalence and richness among the sample squares, non-parametric statistic tests were used to study the relationships between parasitism (prevalence and richness), pollution and landscape characteristics.

To analyze potential relationship between pollution and “parasite status”, mean TM concentrations in soil or in organs were compared between positive (for at least one parasite) and negative (presenting no parasite) individuals using Mann-Whitney tests. Similarly, relationships between bacteria, protozoa or overall parasite richness and TM concentrations in soils (around the trapline) or in organs were tested using Spearman rank correlations.

Relationships between prevalence for each parasite or parasite richness and variables characterizing landscape (landscape composition, landscape diversity, landscape structure metrics) were tested using Spearman rank correlations. Spatial autocorrelation of parasites richness was studied by computing omnidirectional empirical variogram with variographic envelopes obtained by permutation (99 simulations, Monte-Carlo method) (Bivand et al. 2008).

Statistical analyses were performed using R 2.15.1 software with the additional libraries “ade4”, “geoR”, “gstat”, “lattice”, “maptools”, “pgirmess”, “sp”, “splancs”, and also with “rgdal”, “SDMTools” and “vegan” for landscape metrics calculation (R Development Core Team 2012).

### 3 Results

---

#### 3.1 Sample characteristics

---

Among the 160 wood mice tested for parasites, differences in mean relative age were observed between sampling squares ( $F = 5.39$ ,  $df = 6$  and  $149$ ,  $p < 0.001$ ). More precisely, individuals from the control (TE2) and the lightly polluted (103) sites were in average younger than individuals sampled on the polluted (43 and 113) sites (Tukey's HSD test,  $p_{TE2/43} < 0.001$ ,  $p_{103/43} = 0.024$ ,  $p_{TE2/113} = 0.008$ ). Wood mice sex-ratio was slightly skewed in favor of males (0.58) but no difference in sex-ratios was found between the sampling squares ( $\chi^2 = 2.978$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0.812$ ).

#### 3.2 Accumulation of TMs

---

TM concentrations in soils were highly correlated (Cd/Pb  $r_s = 0.92$ ). Concentrations of Cd in both the liver and kidneys significantly increased with Cd concentrations in soils ( $F = 4.47$ ,  $df = 1$  and  $158$ ,  $p = 0.031$  and  $F = 16.37$ ,  $df = 1$  and  $158$ ,  $p < 0.001$ , respectively). Highest internal concentrations of Cd were found in the moderately polluted site "117" and in the highly polluted site "97" (Table III.1). Concentrations of Pb in the liver and kidneys also significantly increased with Pb concentrations in soils ( $F = 70.34$ ,  $df = 1$  and  $158$ ,  $p < 0.001$  and  $F = 100.5$ ,  $df = 1$  and  $158$ ,  $p < 0.001$ , respectively) and highest internal concentrations were found on the most contaminated site (97) (Table III.1).

#### 3.3 Parasite prevalence and richness

---

Out of 11 parasites screened, six were present in the sample of wood mice studied and included three bacteria (*C. burnetii*, *A. phagocytophilum* and *Bartonella* spp.) and three coccidia (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp. and *Giardia* spp.). Only one mouse, trapped on the control site (TE2), was positive for *C. burnetii* (Table III.1). Prevalence for *A. phagocytophilum* and *Bartonella* spp. were of 8.13% and 53.13%, respectively (Table III.1). Regarding coccidia, prevalence were of 13.13%, 10.63% and 15.63% for *Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp. and *Giardia* spp., respectively (Table III.1). The prevalence for all parasites was systematically, but not statistically significantly, higher in males than in females. Mean relative age of individuals did not differ between positive and negative mice for none of the parasite encountered (Kruskal-Wallis  $\chi^2$ ,  $0.080 < p < 0.886$ ).

Mean parasite richness for the whole wood mouse sample was 1.01 [0.88 – 1.15]. Over the 160 wood mice analyzed, 71% carried at least one parasite. More precisely, 47

individuals presented none of the parasites tested (29.4%), 73 presented 1 parasite (45.6%), 33 presented 2 parasites (20.6%), 6 presented 3 parasites (3.8%) and one individual presented 5 parasites (0.6%). Neither gender- nor age-related differences were detected in parasitic richness (F tests,  $p = 0.209$  and  $p = 0.382$ , respectively).

### 3.4 Parasitism: spatial dependence and relationships with landscape features

---

No significant spatial auto-correlation in parasite richness was detected. Among the three bacteria studied, only *A. phagocytophilum* was related to landscape composition. The prevalence was indeed positively related to the proportion of urbanized areas ( $r_s = 0.26$ ,  $p = 0.007$ ), shrublands ( $r_s = 0.19$ ,  $p = 0.018$ ), hedgerows/copses ( $r_s = 0.28$ ,  $p < 0.001$ ) and water courses and ponds ( $r_s = 0.33$ ,  $p < 0.001$ ), while negatively related to the proportion of natural forests ( $r_s = - 0.22$ ,  $p = 0.006$ ) and tree plantations ( $r_s = - 0.19$ ,  $p = 0.017$ ) in buffers. Regarding coccidia, *Giardia* spp. prevalence was positively related to the surface occupied by water courses and ponds ( $r_s = 0.19$ ,  $p = 0.014$ ). Richness of coccidia increased with the surface occupied by natural forests around traplines ( $r_s = 0.27$ ,  $p < 0.001$ ), whether as it decreased with the surface of urban areas ( $r_s = - 0.20$ ,  $p = 0.012$ ). Finally, the global parasite richness increased when the surface occupied by hedgerows and copses increased ( $r_s = 0.17$ ,  $p = 0.029$ ).

*A. phagocytophilum* and *Giardia* spp. prevalence were positively related to landscape diversity ( $r_s = 0.18$ ,  $p = 0.023$  and  $r_s = 0.21$ ,  $p = 0.009$  respectively). As a consequence, the global parasite richness also increased with landscape diversity ( $r_s = 0.17$ ,  $p = 0.029$ ).

We failed to detect any significant relationships between landscape structure metrics (number of patches, total area, total edge, aggregation index, landscape division index and the patch cohesion index) and bacteria richness, coccidia richness or the overall parasite richness ( $p > 0.050$ ).

### 3.5 Relationships between parasitism and pollution

---

*Giardia* spp. prevalence increased with Cd and Pb concentrations in soils (Mann-Whitney,  $U = 769$ ,  $p < 0.001$  and  $U = 726$ ,  $p < 0.001$ , Figure III.1a and b). Regarding internal concentrations, *Giardia* spp. and *Eimeria* spp. prevalence also significantly increased with renal Pb concentrations (Mann-Whitney,  $U = 823$ ,  $p = 0.029$  and  $U = 1204$ ,  $p = 0.023$ , Figure III.1c and d).

Parasite richness was positively related to Cd and Pb soil concentrations (for Cd,  $r_s = 0.20$ ,  $p = 0.012$ , for Pb,  $r_s = 0.21$ ,  $p = 0.009$ , Figure III.2a and b). When analyzed separately,

bacteria richness was not related to soil concentrations (for Cd,  $p = 0.427$ , for Pb,  $p = 0.280$ , Figure III.2c and d) whereas coccidian richness appeared to be positively related to soil concentrations (for Cd,  $r_s = 0.20$ ,  $p = 0.011$ , for Pb,  $r_s = 0.20$ ,  $p = 0.013$ , Figure III.2e and f). Finally, no relationship was found between parasite richness and Cd or Pb hepatic and renal concentrations.

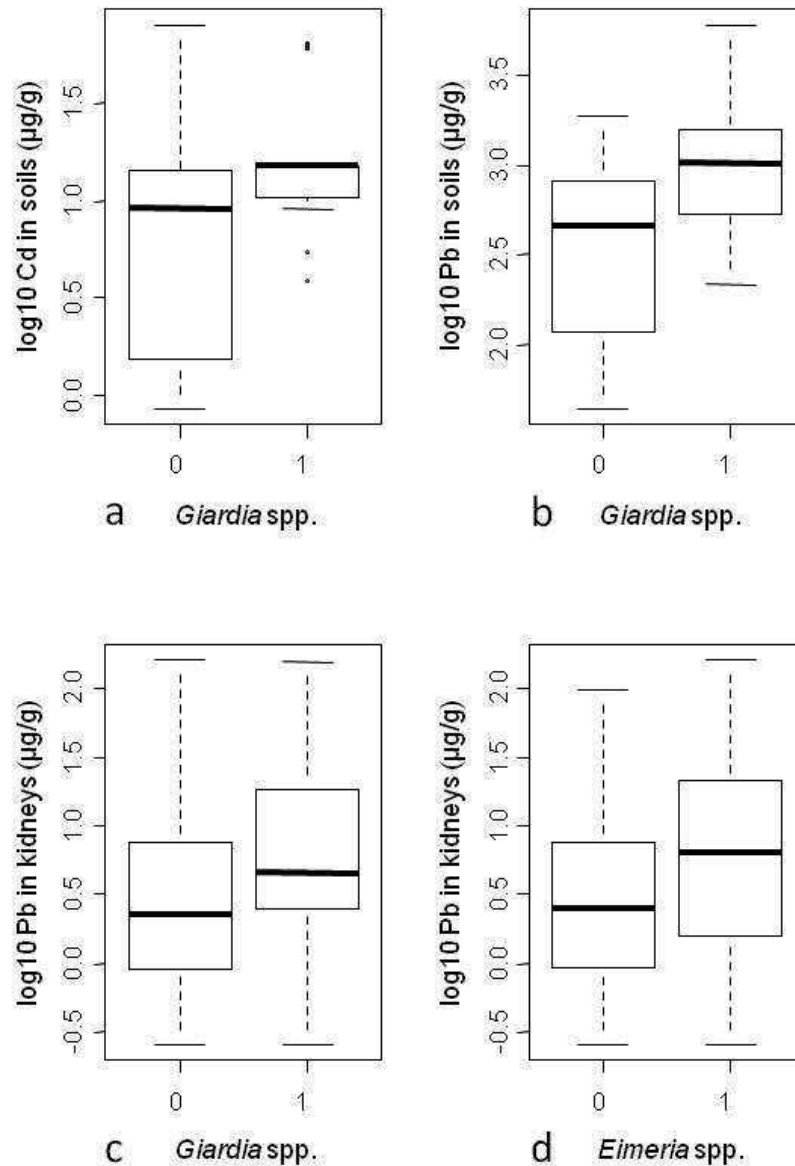
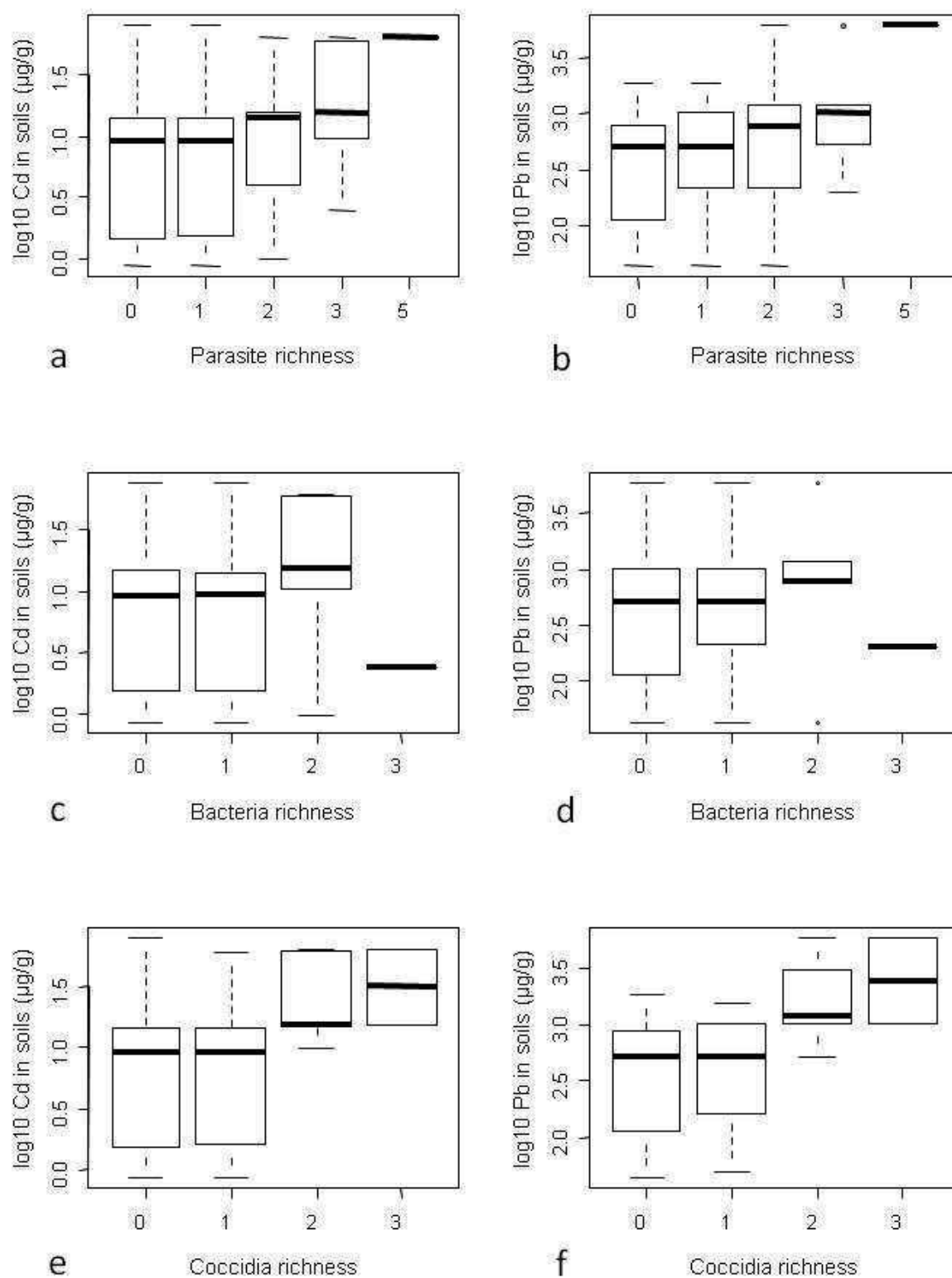


Figure III.1 Coccidian occurrence in wood mice in relation to Cd and Pb concentrations in soils (a, b) or in kidneys (c, d).



**Figure III.2** Richness of parasites (a, b), bacteria (c, d) and coccidia (e, f) in relation to Cd and Pb concentrations in soils associated to the trapline.

## 4 Discussion

Over the 11 widely distributed parasites analyzed, the present study shows that only 6 types of parasites were encountered in the wood mice sampled, indicating that the overall parasite diversity around Metaleurop Nord former smelter can be considered to be weak. The bacteria encountered (*A. phagocytophilum*, *Bartonella* spp., *C. burnetii*), which are tick-borne parasites, are responsible for zoonotic diseases: the Anaplasmosis, the Bartonellosis and the Q-fever, respectively. Previous studies have already highlighted that wood mice constitute a host for those bacteria in different European countries. To our knowledge, prevalence in the wood mouse species varied from 0 to 5.9% for *A. phagocytophilum* (Barandika et al. 2007; Bown et al. 2003; Güner et al. 2005; Marumoto et al. 2007), from 3 to 80.6% for *Bartonella* spp. (Buffet et al. 2013; Harrison et al. 2012; Holmberg et al. 2003; Knap et al. 2007; Telfer et al. 2007) and from 0 to 0.6% for *C. burnetii* (Barandika et al. 2007; Vleck, 1991). These prevalence are lower than those encountered in the present study for *A. phagocytophilum* (8.13%) but within the range of those encountered for *Bartonella* spp. and *C. burnetii* (53.13% and 0.63%, respectively). The intestinal parasites encountered in mouse guts (*Cryptosporidium* spp., *Eimeria* spp. and *Giardia* spp.) are transmitted directly from the environment (soils, water) to the host, can cause multiple digestive complications, and some species of *Cryptosporidium* and *Giardia* can also infest humans (e.g. *C. muris*, *C. parvum* or *C. canis* and *G. intestinalis* or *G. duodenalis*). Only few studies are available for these parasites in the wood mouse species. They showed that prevalence varied from 5 to 27% for *Cryptosporidium* depending on the species considered (Bajer et al. 1997; Chalmers et al. 1997; Torres et al. 2000). Regarding *Eimeria* spp. and *Giardia* spp., literature reported for wood mice prevalence of 73% (Higgs et Nowell 2000) and 47.7% (Karanis et al. 1996), respectively. In the present study, prevalence for *Cryptosporidium* spp. were within the same range compared to those from the literature but prevalence for *Eimeria* spp. and *Giardia* spp. were lower than those observed in previous works. The prevalence of each parasite studied in this work reported in the literature for the wood mouse species are listed in Table III.B (Supplementary Material).

Some of the anthropogenic disturbances studied in the present work significantly influenced the prevalence and the richness of the parasite in the wood mice sampled. For instance, parasite richness increased with landscape diversity and with the surface occupied by hedgerows and copses. This is in line with the facts that land use modifications and landscape fragmentation related to anthropogenic activities can impact disease transmission



(Allan et al. 2003; Deter 2007), and that landscape features are involved in the balance between host-vectors-parasite interactions (Glass et al. 1995; Meerburg et al. 2009; Patz et al. 2000). Looking more closely, it appears that the presence of water ponds, notably in the most polluted site (Table III.1), increases the prevalence of *A. phagocytophilum* and *Giardia* spp. Those water reservoirs are usually associated with a shift in vector populations (Patz et al. 2000). Moreover, during flows, water from reservoirs may disseminate parasite free-living stages in soils. Changes in landscape features due to human activities can also impact on disease transmission because it modifies the resources available for the local *fauna*. Under that hypothesis, the response of wild mammals to parasites, usually mediated by physical condition and immune defenses, may be enhanced due to insufficient resources (Beldomenico et al. 2008; Borgsteede 1996; Bradley and Altizer 2007; Pedersen and Greives 2008). Reduced biodiversity in polluted sites and in anthropogenic environments, such as agricultural fields or urban areas can also modify host communities by suppressing the lowest competent species. For instance, a switch in small mammal assemblages was observed on Metaleurop Nord site, where the evenness in small mammal community decreases with pollution, the wood mouse becoming largely predominant (Fritsch et al. 2011b). According to the “dilution effect hypothesis” that states that host biodiversity is negatively correlated with disease risk (Keesing et al. 2010; Telfer et al. 2007), the decrease in biodiversity on Metaleurop Nord, especially on the highly contaminated sites may affect the transmission of infectious diseases and explain the increased parasite richness observed in the present work.

In the present study, parasite richness and some parasite prevalence were also related to Cd and Pb concentrations in both the environment (soils) and in mice (notably Pb in kidneys). The prevalence of two encountered coccidia (*Eimeria* spp. and *Giardia* spp.) increased with internal Pb concentrations in the kidneys. Trace metals have already been proposed to be detrimental for vertebrate immune system that may thus decrease resistance to infection (Bernier et al. 1995; Institoris et al. 2001a, 2001b; Krzystyniak et al. 1995; Mc Murry et al. 1996; Tersago et al. 2004). As anti-parasitic defense is related to the immune system efficiency, we argue that additional stressors such as high levels of TMs in kidneys may increase host-susceptibility of being infected (Beldomenico et al. 2008; Borgsteede 1996). Those results suggest that wood mice living in trace metal polluted areas, under stressing conditions, may exhibit increased susceptibility to infection or co-infection (Lafferty and Kuris 1999). Despite no relationship between *A. phagocytophilum* and TM concentrations were found in mice, the prevalence observed in the present study are higher than those observed in the literature for the wood mouse species. Moreover, the highest

prevalence of *A. phagocytophimum* (33%) was found on the most contaminated site, potentially indicating a positive effect of TM concentrations in environment on *A. phagocytophimum* prevalence. Present results also highlighted that, contrarily to bacteria richness, coccidian richness and *Giardia* spp. prevalence increase with Cd and Pb concentrations in soils.

The lack of correlation between certain parasite prevalence and TM concentrations in soils or in organs may be due to the fact that environmental conditions are not degraded enough to allow parasite to significantly over-disseminate. A previous study dealing with body condition, as a proxy of health status, of wood mice inhabiting the surroundings of Metaleurop Nord site highlighted that only highly disturbed conditions impacted on animal health (Tête et al. 2013). To observe a decrease in body condition, wood mice both had to inhabit highly polluted sites and to present elevated internal TM concentrations (Tête et al. 2013). In the present study no relationship was found between body condition (calculated by following the same procedure as in Tête et al. 2013) of wood mice and TM contamination or parasitism (data not shown). Present results upon parasite diagnosis give an indication of wood mice status at a given moment whereas concentrations of TMs represent long-term accumulation in organs. Lack of correlation between some parasite prevalence and TM concentrations may also result from those differences in time of exposure and integration. Moreover, literature point out many difficulties in predicting effects of associations between parasitism and degraded environmental conditions (Lafferty 1997), and depending on the kind of relationship concerned (additive, synergistic, antagonist or no observable interaction), multiple stressors can lead to opposite effects on host health. Many parameters have been shown to govern those associations, notably the type of disturbances considered (*e.g.* TM pollution, acid precipitation, sewage, thermal effluent, eutrophication) or the type of parasite studied (*e.g.* *Digenea*, *Acanthocephala*, *Cestoda*...) (Lafferty 1997). Given that the cycle of transmission of numerous parasites is complex, involving several vectors and hosts, the sensitivity of each species involved in the parasite transmission has to be known to predict the effect of pollution on parasite prevalence. As an example, on one hand, it has been demonstrated that TM contamination acts on soil microbial community, with a reduction of bacterial and protozoan populations (Müller et al. 2001). On the other hand, a positive effect of TM contamination, notably Cd, has been observed on the risk of tick-borne infection by increasing their vectorial capacity (Alekseev et al. 2006). In fact, under elevated levels of Cd, *Ixodes* ticks (involved in the transmission of many zoonotic diseases) presented morphological modifications that increased their quests and their locomotory activity

(hunting) (Alekseev et al. 2006). Depending on how pollution affects each species involved in the transmission cycle: parasites, vectors and/or hosts, prevalence will differ. Because of an evident lack of information upon vector and host sensitivities involved in most parasite transmission, further studies are needed to better understand interactions between parasites and environmental disturbances, especially in pollution contexts. Moreover, laboratory experiments should be performed to better understand functional mechanisms (*e.g.* immune response) involved in the impacts of both parasitism and pollution of those different species.

From a human health perspective, local population around Metaleurop Nord former smelter is estimated at 55 000 persons distributed over a 120 km<sup>2</sup> area (SAFIR 2013). Mean local density equals 458 persons per km<sup>2</sup>, corresponding to one of the highest densities in metropolitan France, the region “Nord” being the most populated French county (mean of 449 persons per km<sup>2</sup>, INSEE 2012). As the wood mouse is an ubiquitous and abundant species, which plays an important role in the transmission of a large number of zoonoses, a relatively high risk of exposure to zoonotic parasites of the local population can be expected (Boulouis et al. 2005). Moreover, since some parasite prevalence and richness were related to environmental disturbances, the probability of exposure to those parasites may be swollen in the human population inhabiting the surroundings of the former smelter. More precisely, we argue that the risk for humans of contracting some species of *Giardia* spp., known for causing important gastroenteritis and of contracting *A. phagocytophilum*, that causes anemia, diarrhea, anorexia among other clinical signs in humans, may be enhanced on highly contaminated sites around the former smelter. Further study should be performed to investigate the paths of transmission (direct or through vectors) and to estimate the density of arthropods, and the community structure of hosts which largely influence the probability of parasite transmission to humans.

## 5 Conclusion

---

The present study highlighted that, under stressing conditions, such as pollution and anthropogenic land use, parasite richness in wood mice was higher than in undisturbed environments. It was not possible to clearly disentangle the respective roles of landscape features and soil pollution in determining the community of parasites in wood mice, but both factors significantly influenced the presence of parasites. From the present results, we advise, when studying the risk of parasite transmission to humans, to integrate landscape features and environmental pollution in areas of concern in order to improve risk assessment predictions. For instance, distance of potentially polluted areas (*e.g.* industrial sites, agricultural fields using pesticides) from patient housing should be added in epidemiological surveys. Similarly, in case of important episodes of mammal's massive death due to suspected zoonoses, the measure of TM (or other pollutants) internal burdens in target organs should be performed in addition to parasite screening.

Further studies associating ecotoxicology and parasitology fields should thus be performed to integrate multiple stress approaches, and parasitologists and ecotoxicologists should combine their approaches and expertise to develop multidisciplinary studies allowing improving knowledge on wildlife responses to contaminants within the field of “*stress ecology*” (van Straalen 2003).

## 6 Bibliography

---

Alekseev AN, Dubinina HV, Chirov PA. 2006. Tick morphology, tick microbiocenosis, and the ability to accumulate tick-borne pathogens as a result of anthropogenic pressure? *International Journal of Medical Microbiology* 296: 169-171.

Allan BF, Keesing F, Ostfeld RS. 2003. Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conservation Biology* 17: 267-272.

AVMA - American Veterinary Medical Association - Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Ed. Available: [https://www.avma.org/issues/animal\\_welfare/euthanasia.pdf](https://www.avma.org/issues/animal_welfare/euthanasia.pdf) [accessed 13 November 2013].

Bajer A, Bednarska M, Sinski E. 1997. Wildlife rodents from different habitats as a reservoir for *Cryptosporidium parvum*. *Acta parasitologica* 42: 192-194.

Barandika JF, Hurtado A, Garcia-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, Jado I, Juste RA, Anda P, Garcia-Perez AL 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Applied Environmental Microbiology* 73: 6166-6171.

Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2008. Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275: 1753-1759.

Bernier J, Brousseau P, Krzystyniak K, Tryphonas H, Fournier M. 1995. Immunotoxicity of heavy metals in relation to Great Lakes. *Environmental Health Perspectives* 103: 23-34.

Bivand RS, Pebesma EJ, Gomez-Rubio V. 2008. Applied spatial data analysis with R. Use R! series, Springer Business Media, LLC, New York, USA. 374 pp.

Borgsteede FHM. 1996. The effect of parasites on wildlife. *Veterinary Quarterly* 18: 138-140.

Boulouis H-J, Chang C-C, Henn JB, Kasten RW, Chomel BB. 2005. Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. *Veterinary Research* 36: 383-410.

Bown KJ, Begon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Ogden NH. 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 9: 63-70.

Bradley CA, Altizer S. 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 95-102.

Buffet J-P, Pisanu B, Brisse S, Roussel S, Félix B, Halos L, Chapuis J-L, Vayssier-Taussat M. 2013. Deciphering *Bartonella* diversity, recombination, and host specificity in a rodent community. *PLoS ONE* 8: e68956. doi:10.1371/journal.pone.0068956

Chalmers RM, Sturdee AP, Bull SA, Miller A, Wright SE. 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C-muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. *Parasitology Research* 83: 478-482.

Cleaveland S, Hess GR, Dobson AP, Laurenson MK, MacCallum HI, Roberts MG, Woodroffe R. 2002. The role of pathogens in biological conservation. In: Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, Heesterbeek H, Dobson AP (Eds.): *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford.

Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WHM. 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerging Infectious Diseases* 16: 1-7.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Tropica* 78: 103-116.

Deter J. 2007. *Ecologie de la transmission de parasites (virus, nematodes) au sein d'une communauté de rongeurs à populations cycliques. Conséquences sur la santé humaine*. PhD Thesis. Montpellier: University of Montpellier II.

Epstein JH, Price JT. 2009. The significant but understudied impact of pathogen transmission from humans to animals. *Mount Sinai Journal of Medicine* 76: 448-455.

Faulkner BC, Lochmiller RL. 2000. Ecotoxicity revealed in parasite communities of *Sigmodon hispidus* in terrestrial environments contaminated with petrochemicals. *Environ Pollut* 110 : 135-145.

Fritsch C, Giraudoux P, Coeurdassier M, Douay F, Raoul F, Pruyot C, Waterlot C, de Vaufleury A, Scheifler R. 2010. Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere* 81: 141-155.

Fritsch C, Coeurdassier M, Giraudoux P, Raoul F, Douay F, Rieffel D. de Vaufleury A, Scheifler R. 2011a. Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: Influence of soil contamination and landscape. *PLoS ONE* 6, e20682.

Fritsch C, Raoul F, Vaniscotte A, Coeurdassier M, Giraudoux P, de Vaufleury A, Scheifler R. 2011b. Metallic pollution affects small mammal assemblages: evidence from a large smelter-impacted area. SETAC Europe 21st Annual Meeting, Milan, Italy.

Gendron AD, Marcogliese DJ, Barbeau S, Christin MS, Brousseau P, Ruby S, Cyr D, Fournier M. 2003. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 135: 469-476.

Gil H, Barral M, Escudero R, Garcia-Perez AL, Anda P. 2005. Identification of a new *Borrelia* species among small mammals in areas of northern Spain where Lyme disease is endemic. *Applied Environmental Microbiology* 71: 1336-1345.

Giraudoux P, Craig PS, Delattre P, Bao G, Bartholomot B, Harraga S, Quéré JP, Raoul F, Wang Y, Shi D, Vuitton DA. 2003. Interactions between landscape changes and host communities can regulate *Echinococcus multilocularis* transmission. *Parasitology* 127: S121-S131.

Glass GE, Schwartz BS, Morgan III JM, Johnson DT, Noy PM, Israel E. 1995. Environmental risk factors for Lyme disease identified with geographic information systems. *American Journal of Public Health* 85: 944-948.

Gravekamp H, Van de Kemp H, Franzen M, Carrington D, Schoone GJ, Van Eys GJJM, Everard COR, Hartskeerl RA, Terpstra WJ. 1993. Detection of seven species of pathogenic leptospire by PCR using two sets of primers. *Journal of General Microbiology* 139: 1691-1700.

Güner ES, Watanabe M, Kadosaka T, Polat E, Gargili A, Gulanber A, Ohashi N, Kaneda K, Imai Y, Masuzawa T. 2005. Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in northern Turkey. *Epidemiology and Infection* 133: 331-336.

Halbrook R, Kirkpatrick R, Scanlon P, Vaughan MR, Veit HP. 1993. Muskrat populations in Virginia's Elizabeth river - physiological condition and accumulation of environmental contaminants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 25: 438-445.

Harrison A, Bown KJ, Montgomery WI, Birtles RJ. 2012. *Ixodes ricinus* is not an epidemiologically relevant vector of *Bartonella* species in the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). *Vector borne and zoonotic diseases* 12: 366-371.

Higgs S, Nowell F. 2000. Population biology of *Eimeria* (Protozoa : Apicomplexa) in *Apodemus sylvaticus*: a capture/recapture study. *Parasitology* 120: 355-363.

Holmberg M, Mills JN, McGill S, Benjamin G, Ellis BA. 2003. *Bartonella* infection in sylvatic small mammals of central Sweden. *Epidemiology and Infection* 130: 149-157.

Hopkins RM, Meloni BP, Groth DM, Wetherall JD, Reynoldson JA, Thompson RCA. 1997. Ribosomal RNA sequencing reveals differences between the genotypes of *Giardia* isolates recovered from humans and dogs living in the same locality. *The Journal of Parasitology* 83: 44-51.



Institoris L, Siroki O, Ündeger Ü, Basaran N, Desi I. 2001a. Immunotoxicological investigation of subacute combined exposure by permethrin and the heavy metals arsenic (III) and mercury (II) in rats. *International immunopharmacology* 1: 925-933.

Institoris L, Siroki O, Ündeger Ü, Basaran N, Banerjee BD, Desi I. 2001b. Detection of the effects of repeated dose combined propoxur and heavy metal exposure by measurement of certain toxicological, haematological and immune function parameters in rats. *Toxicology* 163: 185-193.

INSEE. 2012. Chiffres clés - Évolution et structure de la population Française. Available at: <http://www.insee.fr> [accessed 13 November 2013].

InVS (National Institute for Public Health Surveillance). 2012. Programme de travail 2013. Saint-Maurice : Institut de Veille Sanitaire. Available at: <http://www.invs.sante.fr> [accessed 13 November 2013].

Johnson DW, Pieniazek NJ, Griffin DW, Misener L, Rose JB. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Cryptosporidium* oocysts in water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3849-3855.

Junhui Z, Ruifu Y, Jianchun L, Songle Z, Meiling C, Fengxiang C. 1996. Detection of *Francisella tularensis* by the polymerase chain reaction. *Journal of Medical Microbiology* 45: 477-482.

Karanis P, Opiela K, AlArousi M, Seitz HM. 1996. A comparison of phase contrast microscopy and an immunofluorescence test for the detection of *Giardia spp.* in faecal specimens from cattle and wild rodents. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 90: 250-251.

Knap N, Duh D, Birtles R, Trilar T, Petrovec M, Avšič-Županc T. 2007. Molecular detection of *Bartonella* species infecting rodents in Slovenia. *Immunology and Medical Microbiology* 50: 45–50.

Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE, Myers SS, Bogich T, Ostfeld RS. 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468: 647-652.

King KC, McLaughlin JD, Boily M, Marcogliese DJ. 2010. Effects of agricultural landscape and pesticides on parasitism in native bullfrogs. *Biological Conservation* 143: 302-310.

Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K. 2004. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerging Infectious Diseases* 10: 2067-2072.

Krzystyniak K, Tryphonas H, Fournier M. 1995. Approaches to the evaluation of chemical-induced immunotoxicity. *Environmental Health Perspectives* 103: 17-22.

Lafferty KD. 1997. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment? *Parasitology Today* 13: 251-255.

Lafferty KD, Kuris AM. 1999. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnology and Oceanography* 44: 925-931.

Marumoto K, Joncour G, Lamanda P, Inokuma H, Brouqui P. 2007. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia sp.* HF strains in *Ixodes ricinus* ticks in Brittany, France. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* 13: 316-346.

McMurry ST, Lochmiller RL, Boggs JF, Leslie Jr DM, Engle DM. 1996. Demography and condition of populations of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in late and early successional habitats. *Journal of Mammalogy* 77: 335-345.

Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology* 35: 221-270.

Müller AK, Westergaard K, Christensen S, Sørensen SJ. 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiology Ecology* 36: 11-19.

Orlandi PA, Carter L, Brinker AM, da Silva AJ, Chu DM, Lampel KA, Monday SR. 2003. Targeting single-nucleotide polymorphisms in the 18S rRNA gene to differentiate *Cyclospora* species from *Eimeria* species by multiplex PCR. *Applied Environmental Microbiology* 69: 4806-4813.

Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *International journal for parasitology* 30: 1395-1405.

Patz JA, Daszak P, Tabor GM, Aguirre AA, Pearl M, Epstein J, Wolfe ND, Kilpatrick AM, Foufopoulos J, Molyneux D, Bradley DJ, Members of the Working Group on Land Use Change and Disease Emergence. 2004. Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspectives* 112: 1092-1098.

Pedersen AB, Greives TJ. 2008. The interaction of parasites and resources cause crashes in a wild mouse population. *Journal of Animal Ecology* 77: 370-377.

Persing DH, Mathiesen D, Marshall WF, Telford SR, Spielman A, Thomford JW, Conrad PA. 1992. Detection of *Babesia microti* by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30: 2097-2103.

Quére JP, Vincent JP. 1989. Détermination de l'âge chez le Mulot gris par la pesée des cristallins. *Mammalia* 53: 287-293.

R Development Core Team. 2012. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. Available at: <http://www.R-project.org> [accessed 13 November 2013].

Regnery R-L, Spruill CL, Plikaytis BD. 1991. Genomic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology* 173: 1576-1589.

Reischl U, Bretagne S, Kruger D, Ernault P, Costa JM. 2003. Comparison of two DNA targets for the diagnosis of toxoplasmosis by real-time PCR using fluorescence resonance energy transfer hybridization probes. *BMC Infectious Diseases* 3: 7.

Relman DA, Loutit JS, Schmidt TM, Falkow S, Tompkins LS. 1990. The agent of bacillary angiomatosis. An approach to the identification of uncultured pathogens. *The New England journal of medicine* 323: 1573-1580.

Rohr JR, Schotthoefer AM, Raffel TR, Carrick HJ, Halstead N, Hoverman JT, Johnson CM, Johnson LB, Lieske C, Piwoni MD, Schoff PK, Beasley VR. 2008. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature* 455: 1235-1239.

SAFIR. 2013. Rapport sites ateliers - Gestions des sols. Rapport Site Bassin Minier - Metaleurop. Available at: [http://www.safir-network.com/site\\_metaleurop.html](http://www.safir-network.com/site_metaleurop.html) [accessed 13 November 2013].

Sures B. 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends in Parasitology* 20: 170-177.

Sures B. 2007. Host-parasite interactions from an ecotoxicological perspective. *Parassitologia* 49: 41-42.

Telfer S, Clough HE, Birtles LR, Bennett M, Carslake D, Helyar S, Begon M. 2007. Ecological differences and coexistence in a guild of microparasites: *Bartonella* in wild rodents. *Ecology* 88: 1841-1849.

Tersago K, De Coen W, Scheirs J, Vermeulen K, Blust R, Van Bockstaele D, Verhagen R. 2004. Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient. *Environmental Pollution* 132: 385-394.

Tête N, Fritsch C, Afonso E, Coeurdassier M, Lambert J-C, Giraudoux P, Scheifler R. 2013. Can body condition and somatic indices be used to evaluate metal-induced stress in wild small mammals? *PLoS ONE* 8: e66399. doi:10.1371/journal.pone.0066399

Torres J, Gracenea M, Gomez MS, Arrizabalaga A, Gonzalez-Moreno O. 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C-muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Veterinary Parasitology* 92: 253-260.

van Straalen NM. 2003. Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environmental Science & Technology* 37: 324-330.

Vleck M. 1991. Drobni savci na sklaskach komuniInich odpadu jako rezervoary patogenu a parazitu. *Veterinary Medicine* 36: 569-575.

Weigler BJ. 1995. Zoonotic hantaviruses: New concerns for the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 206: 979-986.

WHO. 2013. The world health report 2013 – Research for Universal Health Coverage. Geneva: World Health Organization.

Wijnhoven S, Van der Velde G, Leuven RSEW, Smits AJM. 2005. Flooding ecology of voles, mice and shrews: The importance of geomorphological and vegetational heterogeneity in river floodplains. *Acta Theriologica* 50:453-473.

Willems H, Thiele D, Frölich-Ritter R, Krauss H. 1994. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Veterinary Medicine Series B* 41: 580-587.

Zeidner NS, Burkot TR, Massung R, Nicholson WL, Dolan MC, Rutherford JS, Biggerstaff BJ, Maupin GO. 2000. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in northern Colorado. *Journal of Infectious Diseases* 182: 616-619.

## 7 Supplementary Material

---

### 7.1 Detailed protocol for the measure of TM concentrations in tissues and metrology associated

---

Samples were digested with nitric acid (5 mL HNO<sub>3</sub>, 65%, Carlo-Erba analytical quality) in a drying oven (65°C) during 72h. After digestion, samples were diluted by adding 20 mL ultra-pure water (Elga, 18.2 MΩ/cm<sup>2</sup>). Blanks (nitric acid + ultra-pure water) and certified reference materials (CRM: TORT-2, lobster hepatopancreas, and DOLT3 dogfish liver, from the National Research Council Canada) were prepared and analyzed with the samples. Duplicates were performed for each analysis and repeated if the RSD was above 5%. When a concentration value was under the detection limit, half of the detection limit value was used for statistical analysis. Average CRM recoveries were calculated at 108 ± 14% and 111 ± 16% for Cd and 92 ± 18% and 114 ± 19% for Pb, for DOLT3 and TORT2 respectively. Lead and Cd detection limits in organs were 0.12 µg/g DM and 0.11 µg/g DM for liver, 0.52 µg/g DM and 0.45 µg/g DM for kidneys, respectively. When a concentration value was under the detection limit, half of the detection limit value was used for statistical analyses.

7.2 Relationships between internal concentrations and land use

Linear models were used to study the relationships between land use (number of pixels) and Cd or Pb concentrations in the liver and kidneys of wood mice for a given concentration in soils. In order to do so, residuals of linear models relating Cd or Pb concentrations in organs to Cd or Pb concentrations in soils were related to the category of land ( $[TM_{organ}]/[TM_{soil}]_{residuals} \sim \text{category of land use}$ ). Significance of the relationships was tested using Fisher-tests and residuals of the models were graphically checked for normality and variance homoscedasticity.

**Tableau III.A Relationships between Cd and Pb concentrations in the liver and kidneys of wood mice collected around Metaleurop former smelter ( $n = 160$ ) and the proportion occupied by each category of land use (at fixed Cd or Pb concentrations in soils). For each category of land use table presents the  $p$ -value from the Fisher-tests and the type of relationships with Cd or Pb concentrations in organs (increase or decrease).**

	Cd liver	Cd kidneys	Pb liver	Pb kidneys
Urban areas	$p = 0.002 (\searrow)$	$p = 0.149$	$p = 0.020 (\nearrow)$	$p = 0.079$
Agricultural areas	$p = 0.233$	$p = 0.893$	$p = 0.222$	$p = 0.201$
Natural forests	$p = 0.094$	$p = 0.473$	$p < 0.001 (\searrow)$	$p < 0.001 (\searrow)$
Tree plantations	$p < 0.001 (\nearrow)$	$p = 0.324$	$p = 0.059$	$p = 0.003 (\nearrow)$
Shrublands	$p = 0.370$	$p = 0.101$	$p = 0.001 (\nearrow)$	$p < 0.001 (\nearrow)$
Hedgerows/copses	$p = 0.924$	$p = 0.182$	$p < 0.001 (\nearrow)$	$p = 0.001 (\nearrow)$
Water courses and ponds	$p = 0.985$	$p = 0.531$	$p < 0.001 (\nearrow)$	$p = 0.003 (\nearrow)$
Landscape diversity	$p = 0.162$	$p = 0.714$	$p < 0.001 (\nearrow)$	$p < 0.001 (\nearrow)$

Results indicate that Cd concentrations in organs were only weakly related to the categories of land use and were not related to landscape diversity. It appears that Cd concentrations in liver were negatively related to the proportion of pixels occupied by urban areas and were positively related to the proportion occupied by the tree plantations. We hypothesized that decrease of Cd liver concentrations in urban areas was due to a lower bioavailability of Cd in this type of land use whereas bioavailability in tree plantation may be higher. Regarding Pb concentrations in organs, it appears that most of land use categories either significantly or tended to increase Pb concentrations in both organs except for the land use corresponding to natural forests. In fact, in both organs, Pb concentrations decrease with the proportion of pixels occupied by natural forest, potentially indicating a decreased bioavailability of Pb in this type of land use.

7.3 Synthèse bibliographiques des prévalences des parasites étudiés chez le mulot sylvestre

Dans la présente thèse, onze parasites ont été sélectionnés et étudiés chez le Mulot sylvestre, dont six bactéries transmises par morsures d'arthropodes (*Anaplasma phagocytophilum*, *Bartonella spp.*, *Borrelia spp.*, *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, et *Leptospira spp.*), deux coccidies sanguines (*Babesia spp.* et *Toxoplasma gondii*) et trois coccidies intestinales (*Cryptosporidium spp.*, *Eimeria spp.* et *Giardia spp.*). L'ensemble des prévalences observées pour ces parasites chez le mulot sylvestre sont présentées dans le Tableau III.B.

**III.B Synthèse bibliographique des prévalences minimales et maximales chez le Mulot sylvestre pour chacun des parasites étudiés dans la présente thèse.**

Pathogène	Prévalences (%)		Référence
	Min	Max	
<i>A. phagocytophilum</i>	0	5,9	Barandika et al, 2007; Bown et al, 2003; Güner et al, 2005; Marumoto et al, 2007
<i>Bartonella spp.</i>	3	80,6	Buffet et al, 2013; Harrison et al, 2012; Holmberg et al, 2003; Knap et al, 2007; Telfer et al, 2007
<i>C. burnetii</i>	0	0,6	Barandika et al, 2007; Vleck, 1991
<i>Borrelia spp.</i>	0	12,5	Gassner et al, 2013; Güner et al, 2005; Marsot et al, 2013; Paulauskas et al, 2008; Vourc'h et al, 2007
<i>F. tularensis</i>	0	3,9	Gurycova et al, 2001; Kozuch et al, 1995
<i>Leptospira spp.</i>	3,4	18	Milas et al, 2013; Treml et Nesnalova, 1993
<i>Babesia spp.</i>	0	0,2	Sebek et al, 1977
<i>T. gondii</i>	0,8	41	Hejilicek et Literak, 1998; Kijlstra et al, 2008; Thomasson et al, 2011
<i>Cryptosporidium spp.</i>	5	27	Bajer et al, 1997; Chalmers et al, 1997; Torres et al, 2000
<i>Eimeria spp.</i>		73	Higgs et Nowell, 2000
<i>Giardia spp.</i>		47,7	Karanis et al, 1996



#### 7.4 Bibliographie du Supplementary Material

---

Bajer A, Bednarska M, Sinski E. 1997. Wildlife rodents from different habitats as a reservoir for *Cryptosporidium parvum*. Acta parasitol 42 : 192-194.

Barandika JF, Hurtado A, Garcia-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, Jado I, Juste RA, Anda P, Garcia-Perez AL 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. Appl Environ Microbiol 73 : 6166–6171.

Bown KJ, Begon M, Bennett M, Woldehiwet Z, Ogden NH. 2003. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. Emerg Infect Dis 9 : 63-70.

Buffet J-P, Pisanu B, Brisse S, Roussel S, Félix B, Halos L, Chapuis J-L, Vayssier-Taussat M. 2013. Deciphering *Bartonella* diversity, recombination, and host specificity in a rodent community. PLoS ONE 8 : e68956. doi:10.1371/journal.pone.0068956

Chalmers RM, Sturdee AP, Bull SA, Miller A, Wright SE. 1997. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* and *C-muris* in *Mus domesticus*, *Apodemus sylvaticus* and *Clethrionomys glareolus* in an agricultural system. Parasitol Res 83 : 478-482.

Gassner F, Takken W, Lombaers-van der Plas C, Kastelein P, Hoetmer AJ, Holdinga M, van Overbeek LS. 2013. Rodent species as natural reservoirs of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in different habitats of *Ixodes ricinus* in The Netherlands. Ticks and Tick-borne Dis 4 : 452-458.

Güner ES, Watanabe M, Kadosaka T, Polat E, Gargili A, Gulanber A, Ohashi N, Kaneda K, Imai Y, Masuzawa T. 2005. Seroepidemiology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in wild mice captured in northern Turkey. Epidemiol Infect 133 : 331-336.

Gurycova D, Vyrostekova V, Khanakah G, Kocianova E, Stanek G. 2001. Importance of surveillance of tularemia natural foci in the known endemic area of Central Europe, 1991-1997. Wiener Klinische Wochenschrift 113 : 433-438.

Harrison A, Bown KJ, Montgomery WI, Birtles RJ. 2012. *Ixodes ricinus* is not an epidemiologically relevant vector of *Bartonella* species in the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). Vector Borne Zoonotic Dis 12 : 366-371.

Hejlícek K, Literak I. 1998. Long-term study of *Toxoplasma gondii* prevalence in small mammals (*Insectivora* and *Rodentia*). Folia Zool 47 : 93-101.

Higgs S, Nowell F. 2000. Population biology of *Eimeria* (Protozoa : Apicomplexa) in *Apodemus sylvaticus*: a capture/recapture study. Parasitol 120 : 355-363.

Holmberg M, Mills JN, McGill S, Benjamin G, Ellis BA. 2003. *Bartonella* infection in sylvatic small mammals of central Sweden. Epidemiol Infect 130 : 149-157.

Karanis P, Opiela K, AlArousi M, Seitz HM. 1996. A comparison of phase contrast microscopy and an immunofluorescence test for the detection of *Giardia spp.* in faecal specimens from cattle and wild rodents. Trans R Soc Trop Med Hyg 90 : 250-251.

Kijlstra A, Meerburg B, Cornelissen J, de Craeye S, Vereijken P, Jongert E. 2008. The role of rodents and shrews in the transmission of *Toxoplasma gondii* to pigs. Vet Parasitol 156 : 183-190.

Knap N, Duh D, Birtles R, Trilar T, Petrovec M, Avšič-Županc T. 2007. Molecular detection of *Bartonella* species infecting rodents in Slovenia. Immunol Med Microbiol 50 : 45-50.

Kozuch O, Gurycova D, Lysy J, Labuda M. 1995. Mixed natural focus of tick-borne encephalitis, tularemia and hemorrhagic-fever with renal syndrome in west Slovakia. Acta Virol 39 : 95-98.

Marsot M, Chapuis J-L, Gasqui P, Dozières A, Masségli S, Pisanu B, Ferquel E, Vourc'h G. 2013. Introduced siberian chipmunks (*Tamias sibiricus barberi*) contribute more to Lyme borreliosis risk than native reservoir rodents. PLoS ONE 8 : e55377. doi:10.1371/journal.pone.0055377

Marumoto K, Joncour G, Lamanda P, Inokuma H, Brouqui P. 2007. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia sp.* HF strains in *Ixodes ricinus* ticks in Brittany, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13 : 316-346.

Milas Z, Majetic ZS, Habus J, Perko VM, Staresina V, Barbic L, Stevanovic V, Perharic M, Ljubic B, Turk N. 2013. The occurrence and maintenance of *Leptospira serovars Australis* and *Bratislava* in domestic and wild animals in Croatia. *Vet Arh* 83 : 357-369.

Paulauskas A, Ambrasiene D, Radzijeuskaja J, Rosef O, Turcinaviciene J. 2008. Diversity in prevalence and genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in Lithuania and Norway. *Int J Med Microbiol* 298 : 180-187.

Sebek Z, Rosicky B, Sixl W. 1977. The occurrence of *babesiosis* affecting small terrestrial mammals and the importance of this zoonosis in Europe. *Folia parasitol* 24 : 221-228.

Telfer S, Clough HE, Birtles LR, Bennett M, Carslake D, Helyar S, Begon M. 2007. Ecological differences and coexistence in a guild of microparasites: *Bartonella* in wild rodents. *Ecology* 88 : 1841-1849.

Thomasson D, Wright EA, Hughes JM, Dodd NS, Cox AP, Boyce K, Gerwash O, Abushahma M, Lun ZR, Murphy RG, Rogan MT, Hide G. 2011. Prevalence and co-infection of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in *Apodemus sylvaticus* in an area relatively free of cats. *Parasitol* 138 : 1117-1123.

Torres J, Gracenea M, Gomez MS, Arrizabalaga A, Gonzalez-Moreno O. 2000. The occurrence of *Cryptosporidium parvum* and *C-muris* in wild rodents and insectivores in Spain. *Vet Parasitol* 92 : 253-260.

Treml F, Nesnalova E. 1993. Serological screening of the occurrence of antibodies to leptospires in free-living small mammals. *Vet Med* 38 : 559-568.

Vleck M. 1991: Drobni savci na skladkach komunalnih odpadu jako rezervoary patogenu a parazitu. *Veter Med* 36 : 569-575.

Vourc'h G, Marmet J, Chassagne M, Bord S, Chapuis J-L. 2007. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in siberian chipmunks (*Tamias sibiricus*) introduced in suburban forests in France. Vector Borne Zoonotic Dis 7 : 637-641.

---

## *IV. Discussion*

---



Dans cette partie de la thèse, nous proposons de discuter plus amplement les résultats observés dans les analyses précédentes et de mettre en lien les différentes études réalisées. Cette partie est subdivisée en six sous-parties qui permettront de discuter respectivement de l'accumulation des ETMs, des seuils toxiques de référence permettant d'évaluer le risque encouru par les animaux, des interactions et des effets des ETMs et du parasitisme sur la santé des animaux, de l'apport de la thèse dans le cadre du développement de méthodes non létales, des limites de la présente étude et enfin des perspectives de recherches envisagées.

## **1 Accumulation des ETMs**

---

Au cours des différentes sessions d'échantillonnage, les mesures de concentrations effectuées dans le foie et les reins des mulots en Cd et Pb ont montré que les animaux accumulaient ces ETMs le long du gradient de contamination et que les individus provenant des sites contaminés présentaient des concentrations en Cd et Pb parfois supérieures aux seuils de toxicité (Shore et Douben, 1994a, b). Certaines concentrations atteignent même des niveaux jamais décrits à notre connaissance dans la littérature (cf. Tableau III.3 Chapitre 3 – Partie 2).

Dans la présente thèse, les concentrations dans les sols, particulièrement dans le cas du Cd, n'expliquent qu'une faible partie des concentrations internes mesurées dans les organes cibles (foie et reins) des mulots (Tableau IV.1). Afin de mieux comprendre quels paramètres peuvent moduler les concentrations internes, les effets liés au paysage, aux sessions de captures et aux variables individuelles (âge et sexe) ont été inclus dans la méta-analyse de données suivante (Tableau IV.1).

**Tableau IV.1. Influence des concentrations dans les sols, des types paysagers et de leurs interactions, de la session d'échantillonnage et des caractéristiques individuelles sur l'accumulation en Cd et Pb dans le foie et les reins des mulots capturés autour de l'ancien site industriel de Metaleurop Nord. Pour chacun des modèles sont présentés le R<sup>2</sup> total, ainsi que les R<sup>2</sup> partiels et la significativité pour chacune des variables étudiées (test F,  $p < 0,05$ ). Le nombre d'individus inclut dans ces modèles est de 558 pour la session 2006, de 244 pour la session 2010 et de 84 pour la session 2011 soit un total de 886 mulots analysés.**

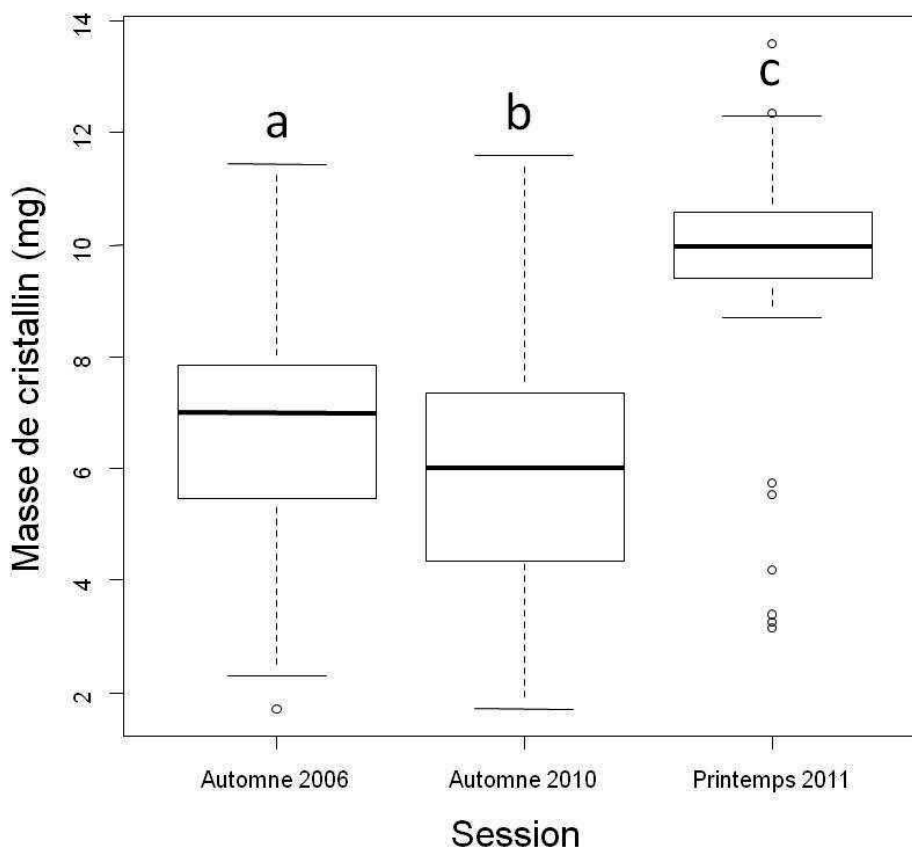
Modèle complet R <sup>2</sup>	Variables explicatives	R <sup>2</sup> partiels	p
[Cd] <sub>foie</sub> ~ [Cd] <sub>sol</sub> * Type paysager + Session + Age + Sexe R <sup>2</sup> = 0.29	[Cd] <sub>sol</sub>	0.02	p < 0.001
	Type paysager	0.11	p < 0.001
	[Cd] <sub>sol</sub> : Type paysager	0.01	p < 0.001
	Session	0.01	p = 0.003
	Age	0.11	p < 0.001
	Sexe	0.03	p < 0.001
	[Cd] <sub>reins</sub> ~ [Cd] <sub>sol</sub> * Type paysager + Session + Age + Sexe R <sup>2</sup> = 0.41	[Cd] <sub>sol</sub>	0.03
Type paysager		0.11	p < 0.001
[Cd] <sub>sol</sub> : Type paysager		0.01	p = 0.002
Session		0.05	p < 0.001
Age		0.18	p < 0.001
Sexe		0.03	p < 0.001
[Pb] <sub>foie</sub> ~ [Pb] <sub>sol</sub> * Type paysager + Session + Age + Sexe R <sup>2</sup> = 0.46		[Pb] <sub>sol</sub>	0.28
	Type paysager	0.07	p < 0.001
	[Pb] <sub>sol</sub> : Type paysager	0.02	p < 0.001
	Session	0.08	p < 0.001
	Age	0.01	p < 0.001
	Sexe	0.01	p = 0.002
	[Pb] <sub>reins</sub> ~ [Pb] <sub>sol</sub> * Type paysager + Session + Age + Sexe R <sup>2</sup> = 0.45	[Pb] <sub>sol</sub>	0.30
Type paysager		0.08	p < 0.001
[Pb] <sub>sol</sub> : Type paysager		0.03	p < 0.001
Session		0.04	p < 0.001
Age		0.01	p = 0.010
Sexe			p = 0.163

Les caractéristiques paysagères (occupation du sol, dominante paysagère, diversité des habitats) étudiées dans le cadre de cette thèse ont une influence sur les concentrations dans les sols et sur la biodisponibilité. L'influence de l'hétérogénéité spatiale et de l'exploitation du territoire par les animaux qui en résulte ont déjà été montrées comme partiellement responsables des faibles relations entre la contamination environnementale et les concentrations mesurées dans les organes (Fritsch et al, 2011; van den Brink et al, 2008;



Vermeulen et al, 2009; Wijnhoven et al, 2007). Les interactions entre certaines caractéristiques paysagères et les ETMs dans le sol pourraient notamment être responsables des concentrations en Cd très élevées dans les organes cibles des animaux provenant de la maille 117, correspondant à une maille moyennement polluée (++). Cette maille est principalement composée de plantations récentes d'arbres. Or, les présents résultats ont montré (cf. Supplementary Material, Chapitre 4) que les concentrations en Cd dans les organes cibles des mulots, à concentration fixée dans le sol, étaient significativement plus importantes dans les milieux composés de plantations récentes que dans les autres types d'occupation du sol. D'une manière plus générale, l'occupation du sol, à travers les interactions qu'elle peut avoir sur la biodisponibilité des ETMs (modification du pH du sol, rétention ou stabilisation par la végétation, etc.) pourrait être responsable de l'accumulation en « cloche » du Cd observée le long du gradient de contamination autour de Metaleurop (*i.e.* pour les sessions 2010 et 2011 l'accumulation du Cd est maximale chez les individus provenant des sites moyennement contaminés).

Les différences d'accumulation des ETMs observées entre les trois sessions d'échantillonnage proviennent du fait que, les captures n'ont pas toutes été réalisées aux mêmes périodes de l'année : les sessions 2006 et 2010 ont été effectuées à l'automne alors que la session 2011 s'est déroulée au printemps. Or, le régime alimentaire des mulots peut fluctuer en fonction des saisons (Abt et Bock, 1998; Khammes et Aulagnier, 2007; Rogers et Gorman, 1995), et ces différences de régime alimentaires peuvent elles-mêmes moduler l'accumulation (Smith et al, 2007; van den Brink et al, 2011). De plus, comme les sessions de captures n'ont pas été réalisées aux mêmes périodes, les structures d'âge des populations diffèrent entre les sessions. Les moyennes d'âge les plus faibles sont observées au cours de la session 2010 et les plus élevées au cours de la session de capture 2011 (Figure IV.1). Ces différences proviennent du fait que les mulots se reproduisent principalement pendant l'été, de nombreux juvéniles et sub-adultes sont donc capturés au cours des sessions d'automne alors que les individus capturés au printemps 2011 sont presque tous adultes. Comme l'accumulation des ETMs diffère avec l'âge (Beernaert et al, 2007; Lopes et al, 2002), les variations entre les différentes sessions peuvent également provenir de ces structures d'âge différentes.



**Figure IV.1.** Distribution des masses de cristallin (utilisé en tant qu'estimateur de l'âge) entre les mulots capturés au cours des trois sessions d'échantillonnage de la thèse. Les lettres indiquent des différences significatives (tests de Tukey,  $p < 0.05$ ).

De nombreuses caractéristiques individuelles peuvent également moduler l'exposition et donc le transfert des ETMs depuis le sol vers les organes cibles des animaux étudiés (Figure IV.2, Peakall et Burger, 2003; Smith et al, 2007). Parmi ces facteurs, nous pouvons citer les caractéristiques individuelles (âge, sexe et mue), le comportement (exploitation de l'habitat, taille du domaine vital...), le régime alimentaire et les différents traits d'histoire de vie (stade de développement, période de reproduction...) (Butet et Paillat, 1997; Fritsch, 2010; Peakall et Burger, 2003; Smith et al, 2007). Les travaux menés au cours de la présente thèse ont montré l'importance de certaines caractéristiques individuelles (âge et sexe) sur l'accumulation des ETMs. L'âge apparaît en effet comme une variable qui module positivement l'accumulation du Cd dans les organes cibles. L'influence de l'âge sur l'accumulation du Pb est moins marquée (Tableau IV.1). L'accumulation du Cd et du Pb est également influencée, dans une moindre mesure, par le sexe des individus (Tableau IV.1). Les femelles présentent des niveaux d'accumulations moyens dans le foie et les reins légèrement supérieurs à ceux des mâles (données non présentées). Comme le sexe peut avoir un rôle sur

certaines traits d'histoire de vie (dimorphisme, reproduction, régime alimentaire, prospection...) (Peakall et Burger, 2003), de plus amples recherches devraient être menées afin de mieux comprendre comment, à travers des habitudes de vie différentes entre mâles et femelles, il peut moduler l'accumulation des ETMs dans les organes cibles.

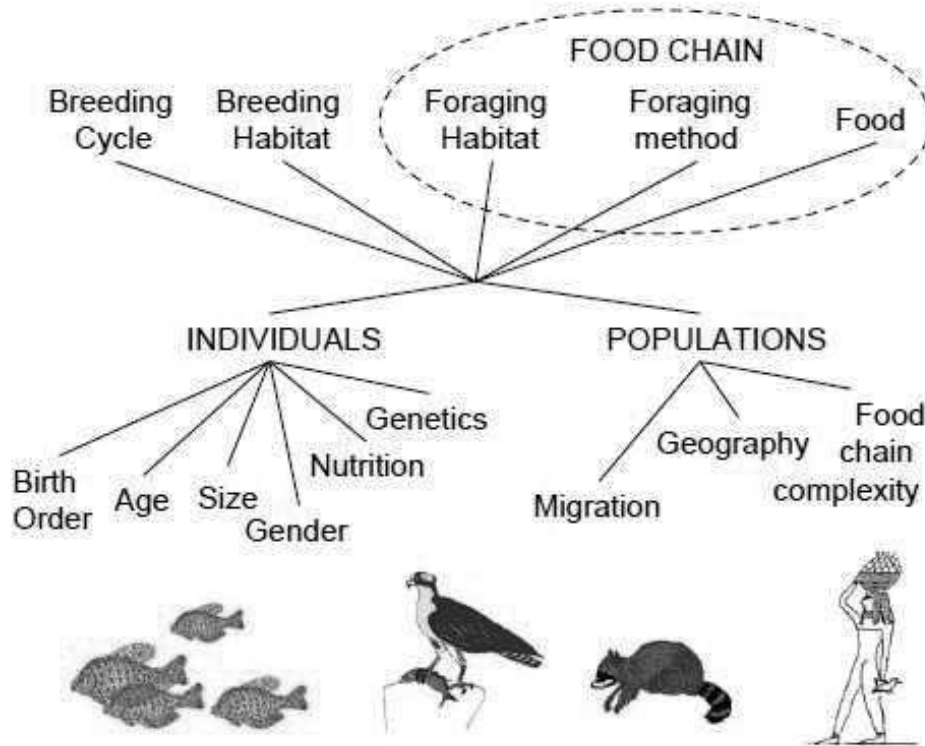


Figure IV.2. Caractéristiques individuelles pouvant moduler la biodisponibilité des ETMs ou d'autres contaminants (Peakall et Burger, 2003).

Les différences d'accumulation entre les sessions de captures, les types paysagers, les variables individuelles (âge et sexe) ont permis d'expliquer une partie de la variabilité des concentrations internes dans les organes cibles de mulots qui n'était pas expliquée par les concentrations dans les sols (Tableau IV.1). Cependant, une part importante de la variabilité des concentrations internes n'est toujours pas expliquée par les variables étudiées. D'autres paramètres encore peu étudiés en écotoxicologie et liés à la physiologie des individus (différences génétiques et phénotypiques, statut nutritionnel, statut de reproduction), au régime alimentaire ou au comportement (période d'activité, prospection alimentaire, déplacements...) modulent également l'accumulation des ETMs chez le mulot sylvestre et leur étude pourraient contribuer à une meilleure prédiction des concentrations internes (Figure IV.2, Peakall et Burger, 2003).

---

## 2 Seuils toxiques

---

Dans le présent projet, en parallèle des différents biomarqueurs d'effets étudiés, le risque au niveau individuel de présenter des atteintes ou de développer des pathologies liées aux ETMs a été estimé par l'intermédiaire de seuils toxiques. Ces seuils proviennent d'études menées en laboratoire (Ma, 1989, 1996; Scheuhammer, 1991; Shore et Douben, 1994a, b). Tout au long de la présente étude, les seuils définis par Shore et Douben (1994a, b) ont été utilisés, ils correspondent aux LOAELs (Lowest Observed Adverse Effect Levels) estimés chez les micromammifères pour les effets toxiques du Cd (15 µg/g de matière sèche dans le foie, 105 µg/g de matière sèche dans les reins) et du Pb (10 µg/g de matière sèche dans le foie et 25 µg/g de matière sèche dans les reins). Les concentrations internes en Cd et Pb dans le foie et les reins ont été comparés aux seuils toxiques. Lorsqu'un individu présentait au moins une de ses concentrations internes supérieure aux seuils toxiques, il était considéré comme à risque à cause du stress induit par les ETMs (Tableau IV.2, Figure IV.3).

Au cours de la session 2006, sur les 561 mulots analysés, 106 sont considérés à risque soit 18,9% de l'échantillon. Pour la session 2010, sur les 247 individus analysés, 47 sont considérés à risque soit 19,0% de l'échantillon et pour la session 2011, 16 mulots sur les 84 analysés, soit 19,0% des individus sont à risque. Ces résultats montrent que le nombre d'individus présentant des concentrations supérieures aux seuils toxiques est constant au cours du temps et donc que le risque lié à la présence des ETMs autour du site de Metaleurop ne diminue pas malgré la cessation d'activité de l'usine en 2004. La Figure IV.3 permet d'observer l'augmentation de la proportion d'animaux considérés à risque le long du gradient de pollution. Ce pourcentage augmente significativement lorsque les individus proviennent des sites les plus pollués. Sur l'ensemble de la thèse, plus de 15% et 25% des animaux capturés respectivement sur les sites moyennement pollués (++) et très pollués (+++) se situent au-dessus des seuils toxiques (Figure IV.3d). Une proportion non négligeable des mulots étudiés présente donc des concentrations très élevées en Cd et/ou Pb. Chez les mulots considérés à risque, certains biomarqueurs mesurés indiquent des effets plus marqués que chez les individus en-dessous des seuils toxiques. Par exemple, les animaux considérés à risque présentent des niveaux d'hématocrite plus faibles (Chapitre 3 – Partie 2). De même, la somme des notes des altérations histologiques est significativement plus élevée chez les animaux présentant des concentrations internes supérieures aux seuils toxiques (Chapitre 3 – Partie 1). Les informations apportées par les seuils toxiques de référence, couplées aux informations récoltées par les différents biomarqueurs évalués, indiquent donc que les

animaux vivants sur les sites pollués, autour de l'ancienne usine de Metaleurop, présentent des risques accrus de développer des pathologies (atteintes histologiques, œdèmes, cancers, etc) à cause des ETMs.

**Tableau IV.2. Nombre d'individus et pourcentage d'individus (entre parenthèses) au-dessus des seuils toxiques (LOAELs) définis par Shore et Douben (1994a, b) pour le Cd et le Pb dans le foie et les reins pour chacune des sessions d'échantillonnage réalisées dans le cadre de la thèse.**

Session de capture	ETM	Organe cible	0	+	++	+++
2006	Cd	foie		4/122 (3,3%)	12/178 (6,7%)	24/260 (9,2%)
		reins		0/121 (0%)	1/178 (0,6%)	4/261 (1,5%)
	Pb	foie		1/122 (0,8%)	2/178 (1,1%)	21/260 (8,1%)
		reins		1/121 (0,8%)	16/178 (9,0%)	63/261 (24,1%)
2010	Cd	foie	1/42 (2,4%)	0/16 (0%)	3/47 (6,4%)	2/132 (1,5%)
		reins	0/42 (0%)	0/16 (0%)	0/48 (0%)	1/141 (0,7%)
	Pb	foie	0/42 (0%)	0/16 (0%)	0/47 (0%)	10/139 (7,2%)
		reins	0/42 (0%)	0/16 (0%)	7/48 (14,6%)	23/141 (16,3%)
2011	Cd	foie	0/17 (0%)	1/18 (5,6%)	8/27 (29,6%)	2/22 (9,1%)
		reins	0/17 (0%)	0/18 (0%)	1/27 (3,7%)	0/22 (0%)
	Pb	foie	0/17 (0%)	0/18 (0%)	0/27 (0%)	0/22 (0%)
		reins	0/17 (0%)	1/18 (5,6%)	2/27 (7,4%)	2/22 (9,1%)

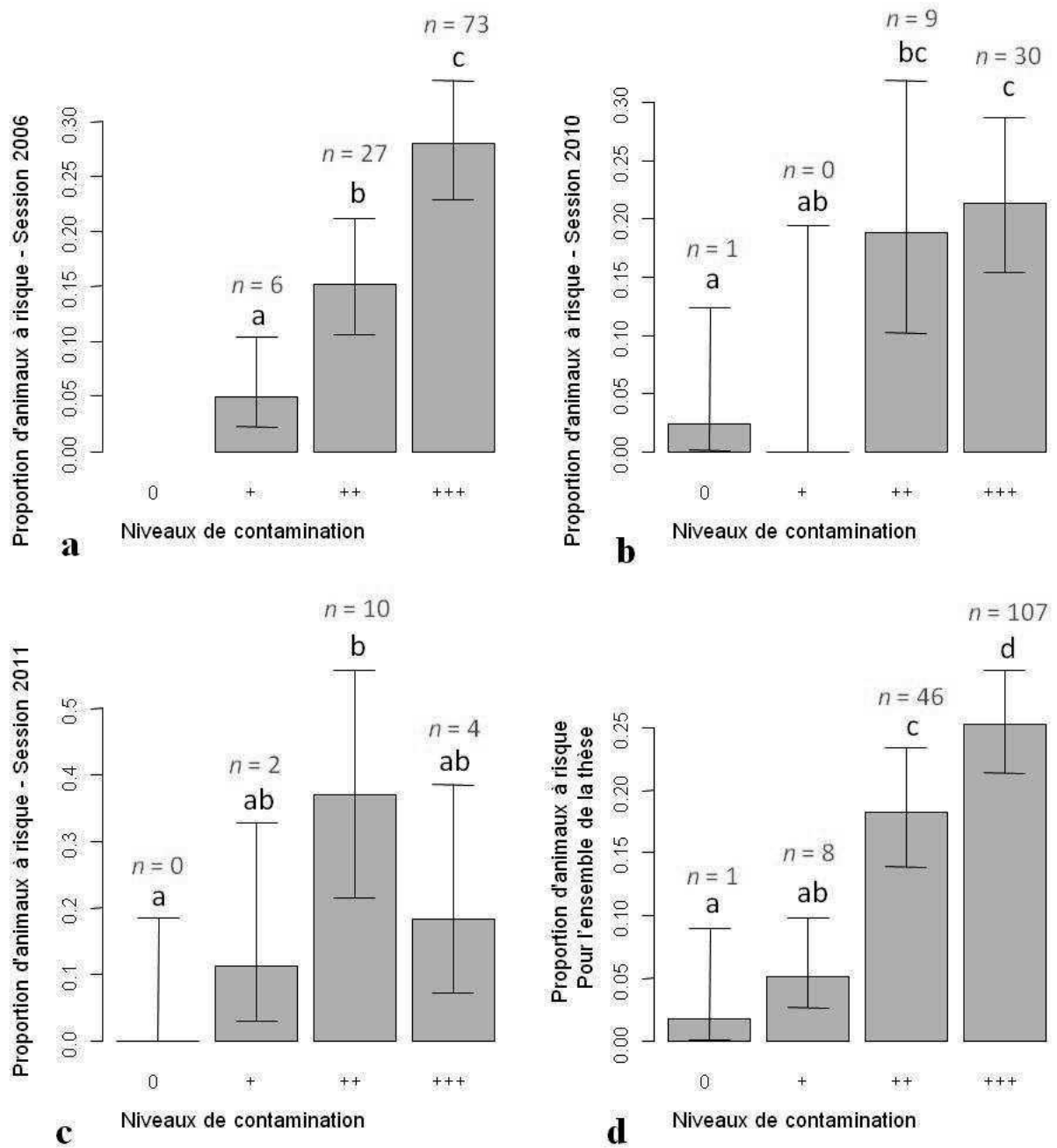


Figure IV.3 Proportion d'animaux considérés à risque car présentant des concentrations internes en Pb et/ou Cd dans le foie et/ou les reins supérieurs aux seuils toxiques de référence (Shore et Douben, 1994a, b) pour la session 2006 (a), 2010 (b), 2011 (c) et pour l'ensemble de la thèse (d). Les lettres indiquent des différences significatives ( $p < 0,05$ ) entre les niveaux de contamination (test exact de Fisher  $\chi^2$ ).

### **3 Effets des stress sur la santé des mulots**

---

Afin d'étudier les interactions entre les ETMs et le parasitisme et leurs effets sur la santé des mulots sylvestres, dans la présente étude, plusieurs biomarqueurs ont été étudiés à différents niveaux d'organisation biologique (cellulaire, tissulaire, individuel). Les informations récoltées ont permis de mieux comprendre le lien entre les concentrations observées dans les organes cibles, la présence de parasites et les effets observés chez les individus soumis à des niveaux de stress élevés.

L'objectif 1 a permis de mettre en évidence des relations entre les indices de condition corporelle (standardisation du poids des individus par la longueur du corps) et les concentrations internes en Cd et Pb. L'indice de condition corporelle ne semble être négativement affecté par les concentrations en Cd dans les organes seulement chez les animaux provenant des sites les plus contaminés ( $20 \leq [\text{Cd}] \leq 70 \mu\text{g/g sol}$ ). Ce résultat suggère des effets potentiels des ETMs sur la santé des mulots. Il renforce l'hypothèse selon laquelle les animaux soumis au stress métallique présenteraient une diminution de la condition corporelle pouvant être révélatrice d'une diminution du statut nutritionnel (statut énergétique) et donc de leur fitness (Green, 2001; Schulte-Hostedde et al, 2001, 2005). Cependant ces relations, même si elles sont significatives, ne permettent pas d'établir de lien de cause à effet direct entre les concentrations en ETMs mesurées et la variation de la condition corporelle. Les effets observés sur la condition physique peuvent être directement ou indirectement liés à la présence des ETMs dans l'environnement ou dans les organes. De même, d'autres stress peuvent également diminuer la condition corporelle. Ainsi, des liens ont déjà été évoqués entre diminution de la condition corporelle et le parasitisme (Beldomenico et al, 2008; Borgsteede, 1996). En effet, par leurs effets néfastes sur la santé des hôtes, certains parasites peuvent diminuer la condition corporelle et donc la reproduction ou la survie (Borgsteede, 1996), causant également des atteintes au niveau populationnel. De plus, la diminution de la condition corporelle a déjà été évoquée comme une prédisposition au parasitisme (Beldomenico et al, 2008). Les hôtes présentant une baisse de leur condition corporelle auraient une susceptibilité accrue d'être parasités, ce qui entrainerait une baisse supplémentaire de leur condition physique (Beldomenico et al, 2008). Dans le chapitre consacré aux interactions entre parasitisme et polluants (Chapitre 4), aucune influence de ces deux stress sur la condition corporelle n'a pu être établie. Mais d'autres stress pourraient également être à l'origine de la diminution de la condition corporelle. En effet, la diminution de la condition corporelle peut être interprétée comme la conséquence d'une diminution des

ressources alimentaires disponibles ou de la baisse de qualité de ces ressources (McMurry et al, 1996; Tattersall et al, 2001). Dans leur étude, Tattersall et al (2001) ont montré qu'après la période de reproduction, les mulots mâles piégés dans les milieux forestiers étaient significativement plus lourds que ceux piégés le long des bordures de cultures. Ces résultats indiquent que le paysage et l'habitat, qui modulent largement la diversité, la quantité et la qualité des ressources alimentaires disponibles, pourraient être responsables des variations de condition corporelle observées. Dans le présent projet aucun lien n'a pu être établi entre les métriques paysagères étudiées dans le premier chapitre (occupation du sol) et la condition corporelle. D'autres analyses, prenant en compte des métriques paysagères plus fines, telles que l'habitat à l'échelle du domaine vital du mulot, la diversité paysagère, la fragmentation paysagère ou une estimation des ressources disponibles pour les mulots pourrait peut-être permettre d'établir des liens entre la condition corporelle et la qualité de l'habitat et donc des ressources alimentaires. La condition corporelle étant liée aux ressources alimentaires, elle est également liée à la compétition pour ces ressources et donc à la densité de population (Norrdahl et Korpimäki, 2002). Dans le chapitre dédié aux indices de condition corporelle (chapitre 1), les taux de captures des mulots étaient significativement plus importants sur les sites très contaminés (+++) par rapport aux taux de captures sur les sites correspondant aux autres niveaux de contamination (+ et ++). Ces densités plus importantes pourraient donc également être à l'origine de la diminution de condition corporelle observée chez les animaux provenant des sites les plus contaminés. Les ETMs pourraient également avoir un effet indirect sur la condition corporelle en dégradant la qualité de l'habitat (disparition de certaines espèces végétales ou de proies potentielles sensibles à la pollution) et donc en limitant les quantités et la qualité des ressources disponibles. Certaines études devraient être menées afin d'évaluer la diminution potentielle de biodiversité végétale et faunistique le long du gradient de contamination autour de Metaleurop Nord qui pourrait entraîner une diminution des ressources alimentaires pour les mulots.

Dans un concept d'écologie du stress, il est nécessaire de prendre en compte les différentes sources de stress qui pourraient influencer sur la condition corporelle. La diminution de la condition corporelle des animaux provenant des sites les plus contaminés pourrait ainsi être expliquée comme étant la conséquence de l'action de plusieurs stress sur les animaux (Figure IV.4). L'action cumulée des stress pourraient déséquilibrer le compromis énergétique nécessaire pour maintenir une condition corporelle suffisante (stockage d'énergie) et remplir les différentes fonctions biologiques primaires des mulots (Figure IV.4). Ce déséquilibre pourrait notamment provenir de l'allocation d'énergie supplémentaire utilisée dans les



défenses immunitaires afin de lutter contre les effets des stress (Figure IV.4). L'impact des ETMs sur le système immunitaire des animaux implique une allocation d'énergie importante dédiée à la lutte contre les effets néfastes des ETMs ce qui limite les ressources énergétiques disponibles pour remplir d'autres fonctions biologiques (Beldomenico et al, 2008).

Certains ETMs, notamment le Cd et le Pb, ont été décrits comme immunotoxiques (Bernier et al, 1995; Institoris et al, 2001a, 2001b; Krzystyniak et al, 1995; Mc Murry et al, 1996; Tersago et al, 2004). Les effets des polluants peuvent se traduire par une immunosuppression, une immunodépression ou encore une immunostimulation (Krzystyniak et al, 1995). Lorsque le système immunitaire est atteint, plusieurs conséquences peuvent à leur tour se manifester : diminution de la résistance aux pathogènes opportunistes (virus, bactéries, mycoses ou autres agents infectieux), susceptibilité accrue de développer des pathologies (cancer) ou encore augmentation du risque de réactions auto-immunes suite à des réactions allergiques (Krzystyniak et al, 1995). Comme les défenses antiparasitaires sont liées à l'efficacité du système immunitaire, des niveaux élevés d'ETMs dans les organes cibles pourraient augmenter la susceptibilité d'un hôte d'être infecté (Beldomenico et al 2008; Borgsteede 1996 ; Lafferty et Kuris 1999). L'impact des ETMs sur le système immunitaire pourrait notamment expliquer le lien observé entre l'augmentation de la prévalence de certains parasites et l'augmentation de la richesse des coccidies chez les animaux provenant des sites les plus contaminés (Chapitre 4). Les résultats du Chapitre 4 concernant les approches multi-stress ont en effet montré que la pollution (concentrations dans les sols ou dans les tissus cibles) pouvait influencer les prévalences et la richesse parasitaire. Les prévalences de certains parasites et notamment des coccidies étaient modulées par les concentrations en ETMs dans les sols et dans les organes cibles. Cependant, les différences de prévalences parasitaires observées étaient également reliées à certaines métriques paysagères, notamment les changements d'utilisation des sols liés aux activités anthropiques. Comme les métriques paysagères sont impliqués dans l'équilibre entre les interactions hôtes - vecteurs – parasites, elles peuvent moduler la transmission de la maladie (Allan et al, 2003; Glass et al, 1995; Meerburg et al, 2009; Patz et al, 2000). Les caractéristiques paysagères peuvent également avoir un impact sur la transmission de la maladie en modifiant les ressources disponibles pour la faune locale. En effet, si ces ressources diminuent, les défenses immunitaires mises en place par les animaux pour lutter contre le parasitisme, en partie conditionnées par la condition physique, seront moins efficaces (Beldomenico et al, 2008; Borgsteede, 1996; Bradley et Altizer, 2006; Pedersen et Greives 2008). Les différences de prévalences parasitaires observées entre les sites d'étude (Chapitre 4) pourraient aussi être

expliquées par des effets indirects de la pollution. En effet, comme les cycles de transmission de nombreux parasites sont complexes, impliquant parfois plusieurs vecteurs et hôtes, la sensibilité aux polluants de chaque espèce impliqués dans la transmission du parasite doit être connue pour prédire l'effet de la pollution sur la prévalence des parasites. Par exemple, il a été démontré que les ETMs peuvent agir sur la communauté microbienne du sol, et réduire les populations bactériennes et de protozoaires (Müller et al, 2001). Les ETMs peuvent également avoir un effet positif sur les prévalences de certaines bactéries transmises par les tiques. Par exemple, il a été démontré que lorsque des tiques, du genre *Ixodes* (impliqué dans la transmission de nombreuses maladies zoonotiques) étaient soumises à des niveaux élevés de cadmium, elles présentaient des modifications morphologiques qui augmentaient leur capacité vectorielle (Alekseev et al, 2006). Les résultats présentés dans le Chapitre 4 indiquent qu'il existe des interactions entre la pollution, le parasitisme et le paysage. Cependant, les liens de cause à effet n'ont pas pu être établis et il n'est, à ce jour, pas possible de discriminer les effets du paysage et de la pollution sur les prévalences parasitaires observées.

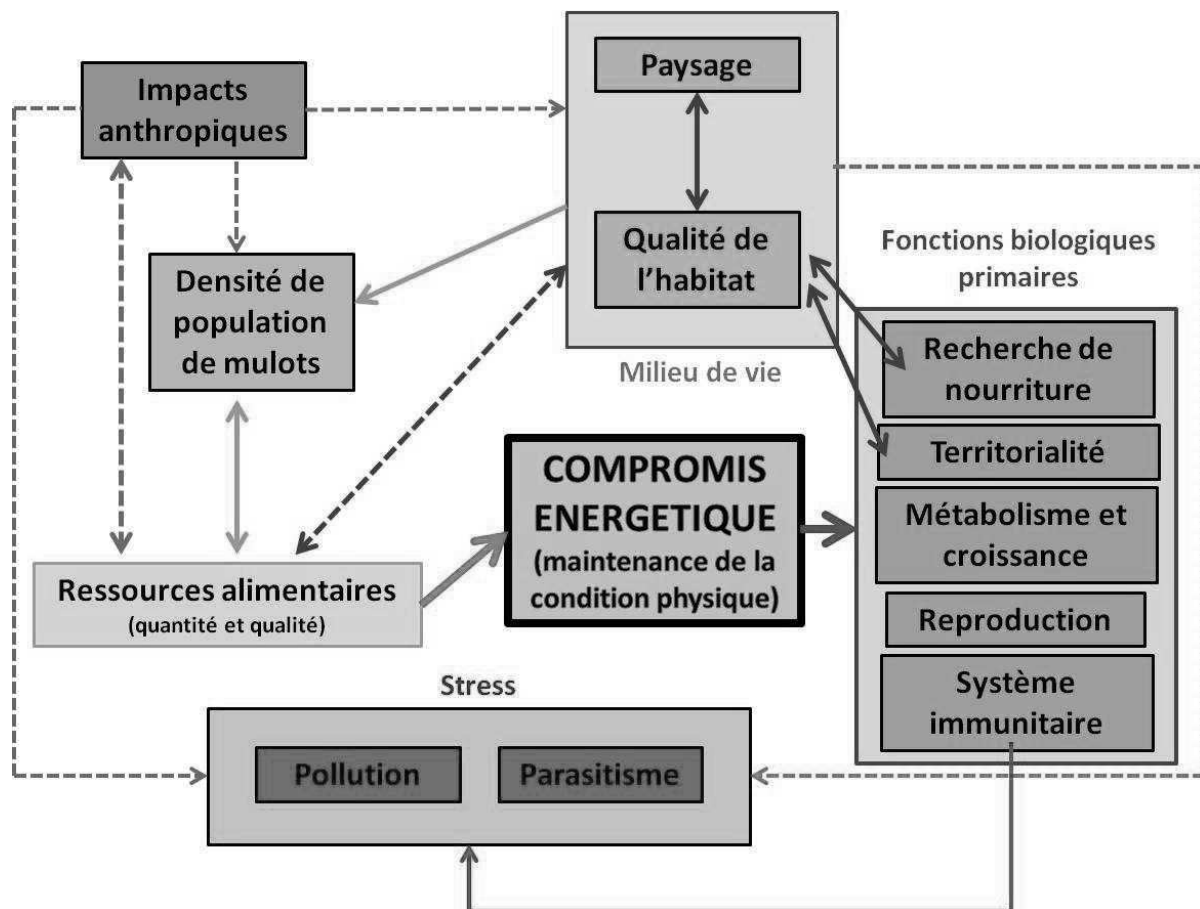


Figure IV.4. Schéma simplifié, basé sur les résultats de la thèse, montrant les interactions entre les différents facteurs influençant la condition corporelle (flèches pointillées) et les flux d'énergie expliquant les variations de la condition corporelle (flèches pleines).

Les résultats du Chapitre 1 concernant les indices somatiques (standardisation du poids d'un organe par la longueur du corps) ont montré que l'indice du foie était négativement affecté par les concentrations en Cd dans les organes seulement chez les animaux provenant des sites les plus contaminés ( $20 \leq [\text{Cd}] \leq 70 \mu\text{g/g sol}$ ). De même, l'indice des reins augmentait avec les concentrations rénales en Cd et l'indice du foie diminuait avec les concentrations hépatiques en Pb. Dans plusieurs études, la variation de la masse relative de ces organes, atrophie ou hypertrophie, a été imputée à la présence d'atteintes histologiques (altérations structurelles ou œdèmes) causées par les toxiques (Ma, 1989; Milton et al, 2003; Sanchez-Chardi et al, 2007). Les résultats observés en histologie (Chapitre 3), notamment la présence de certaines pathologies, pourraient donc être mis en lien avec l'augmentation des indices somatiques chez les animaux les plus contaminés (Chapitre 1). Dans le Chapitre 3, les résultats ont en effet montré que les organes cibles du Cd et du Pb, les reins et le foie, présentaient des altérations. De plus, l'augmentation de certaines de ces altérations et de leur sévérité a pu être reliée aux concentrations environnementales ou tissulaires en ETMs. L'augmentation de la nécrose des hépatocytes était liée aux concentrations environnementales en Cd et Pb et les atteintes au niveau des tubules dans les reins étaient également liées aux concentrations en Pb dans les reins. Ces altérations sont typiques des atteintes causées par les ETMs dans les organes cibles (Liu et al, 2010; Salinska et al, 2012, 2013; Wlostowski et al, 2000). Cependant, malgré les résultats, et au même titre que ceux concernant la condition corporelle, la variation des indices somatiques et l'apparition de certaines pathologies ne peuvent pas être mises en lien direct avec les concentrations en ETMs. D'autres causes pourraient être à l'origine de ces pathologies (Figure IV.5). En effet, les résultats ont montré que la plupart des altérations histologiques ne sont pas reliées aux concentrations dans les organes cibles (à l'exception de la nécrose tubulaire dans les reins qui est reliée aux concentrations rénales en Pb) mais ces altérations sont plus généralement reliées aux concentrations environnementales. Une fois encore, ces résultats pourraient indiquer un effet indirect des ETMs sur l'apparition de certaines lésions tissulaires et sur la variation des indices somatiques (Figure IV.5). Il a ainsi été démontré que la qualité de la nourriture consommée pourrait expliquer la variation de la masse relative de certains organes. Harju and Tahvanainen (1994) ont montré que lorsque des campagnols agrestes (*Microtus agrestis*) adultes étaient nourris deux semaines avec de la nourriture enrichie en bouleau (*Betula pendula*), un élément de l'alimentation consommée par les campagnols seulement en temps de forte densité de population (donc de stress), ils présentaient une augmentation de la taille du

foie. Les modifications du paysage et la perte de qualité de l'habitat induites par les perturbations anthropiques et la présence des ETMs pourraient donc être à l'origine d'une diminution de la qualité de la nourriture, entraînant elle-même un impact sur la masse relative des organes (Figure IV.5). Un des objectifs du Chapitre 3 était de mettre en lien les indices somatiques avec les altérations structurelles observées. Malheureusement, les indices somatiques n'ont pas pu être mesurés chez les animaux utilisés dans le cadre des analyses histologiques (animaux prélevés au cours de la session 2011). En effet, les dissections ayant été réalisées sur le terrain, pour éviter l'apparition de nécroses *post-mortem* sur les organes étudiés en histologie, dans des conditions climatiques compliquées (vent, pluie), il n'a pas été possible de peser les organes (la balance de terrain ne permettait d'obtenir une précision suffisante). Même si plusieurs études avancent l'hypothèse que la variation de masse relative d'un organe est due à des altérations structurelles, à ce jour, aucune relation de cause à effet n'a pu être établie (Milton et al, 2003; Sanchez-Chardi et al, 2007, 2009a). Comme cette hypothèse reste spéculative, et que nous n'avons pas pu répondre à cette question, l'étude de l'impact potentiel de la présence de pathologies sur la variation de la masse d'un organe devrait faire l'objet de futures recherches. De nombreuses altérations histologiques observées dans le Chapitre 3 ne sont pas significativement reliées à la présence d'ETMs ni dans l'environnement, ni dans les organes. Comme la qualité des ressources alimentaires a déjà été décrite comme potentiellement responsable de l'atrophie ou l'hypertrophie de certains organes (Harju and Tahvanainen, 1994), de plus amples études devraient également être menées afin de comprendre comment le régime alimentaire (carences en certains oligo-éléments, manque de vitamines...) pourrait également influencer l'apparition de lésions structurelles dans le foie ou les reins.

Les analyses hématologiques ont montré que les taux leucocytaires diminuaient avec les concentrations en Cd dans les reins et que les individus des mailles témoins et du site le plus contaminé (+++) présentaient une augmentation du taux de leucocytes (Chapitre 3). Cette augmentation peut être révélatrice de plusieurs choses. Tout d'abord, l'augmentation du nombre de leucocytes peut être interprétée comme une indication de la présence d'inflammations, d'infections à certains pathogènes ou de certaines pathologies (Adham et al, 2011; Gorriz et al, 1996; Guilhermino et al, 1998). Les stress environnementaux à l'origine de ces atteintes peuvent être divers (Figure IV.5). Le parasitisme, par son action sur le système immunitaire, peut notamment jouer un rôle important sur l'augmentation du taux leucocytaire. De même, les ETMs peuvent augmenter ce taux de manière directe par leur effet immunotoxique ou de manière indirecte en induisant l'apparition de certaines lésions ou

pathologies impliquant elles même le système immunitaire (Adham et al, 2011; Gorriz et al, 1996; Guilhermino et al, 1998; Kanter et al, 2005; Tersago et al, 2004; Topashka-Ancheva et al, 2003). Les résultats du Chapitre 3 ont également montré que les taux d'hématocrite étaient liés aux concentrations en ETMs et notamment en Cd dans les organes. La diminution de l'hématocrite peut être révélatrice d'effets négatifs des ETMs sur la capacité de transport d'oxygène du sang, conduisant potentiellement à une anémie (Rogival et al, 2006; Tersago et al, 2004). Comme le Cd a déjà été décrit comme pouvant induire des anémies (parmi d'autres effets néfastes) (Shore et Rattner, 2001), ces résultats indiquent que les mulots les plus exposés peuvent être considérés comme à risque à cause des teneurs en Cd. Dans le Chapitre 4, certains parasites, notamment la bactérie *A. phagocytophilum*, dont les prévalences chez le mulot sont importantes sur le site très contaminé (33%), ont également été décrits comme potentiellement responsables d'anémies chez certains hôtes. Ces résultats montrent la difficulté de discriminer les effets du parasitisme et de la pollution sur l'apparition de certaines pathologies (anémie) et, plus généralement sur la santé de la faune sauvage.

Les paramètres hématologiques étudiés ont été mesurés sur les mêmes individus que ceux utilisés dans le cadre des analyses histologiques (prélevés en 2011) et devaient initialement être reliés aux altérations observées dans les organes cibles. Des analyses de concentrations de gamma glutamyl transférases ( $\gamma$ -GT), ont également été réalisées sur des échantillons de sérum sanguins prélevés sur les mulots. Mais, suite à des problèmes techniques (liés à la conservation et au calibrage des manipulations) ces résultats n'ont malheureusement pas pu être exploités. Si les analyses avaient pu être réalisées, les  $\gamma$ -GT en tant qu'enzymes considérées comme représentatives des atteintes hépatiques, auraient pu permettre de promouvoir l'utilisation des échantillons sanguins en tant que biomarqueurs non létaux d'effets. Aucune relation significative n'a pu être établie entre les altérations histologiques observées et les paramètres sanguins étudiés (résultats non présentés). Les paramètres sanguins ne peuvent donc pas, dans l'état actuel, être utilisés comme biomarqueurs d'effets en substitution aux analyses histologiques (qui nécessitent le sacrifice des animaux étudiés). Les résultats de cette thèse indiquent finalement que ces deux biomarqueurs sont complémentaires et ne sont pas spécifiques des mêmes atteintes. Si l'histologie permet une évaluation des atteintes causées par les ETMs sur les tissus observés (Liu et al, 2010; Salinska et al, 2012, 2013; Wlostowski et al, 2000), les paramètres hématologiques sont plus informatifs de signaux d'alertes précoces qui n'entraînent pas nécessairement d'atteintes tissulaires (Rogival et al, 2006; Tersago et al, 2004).

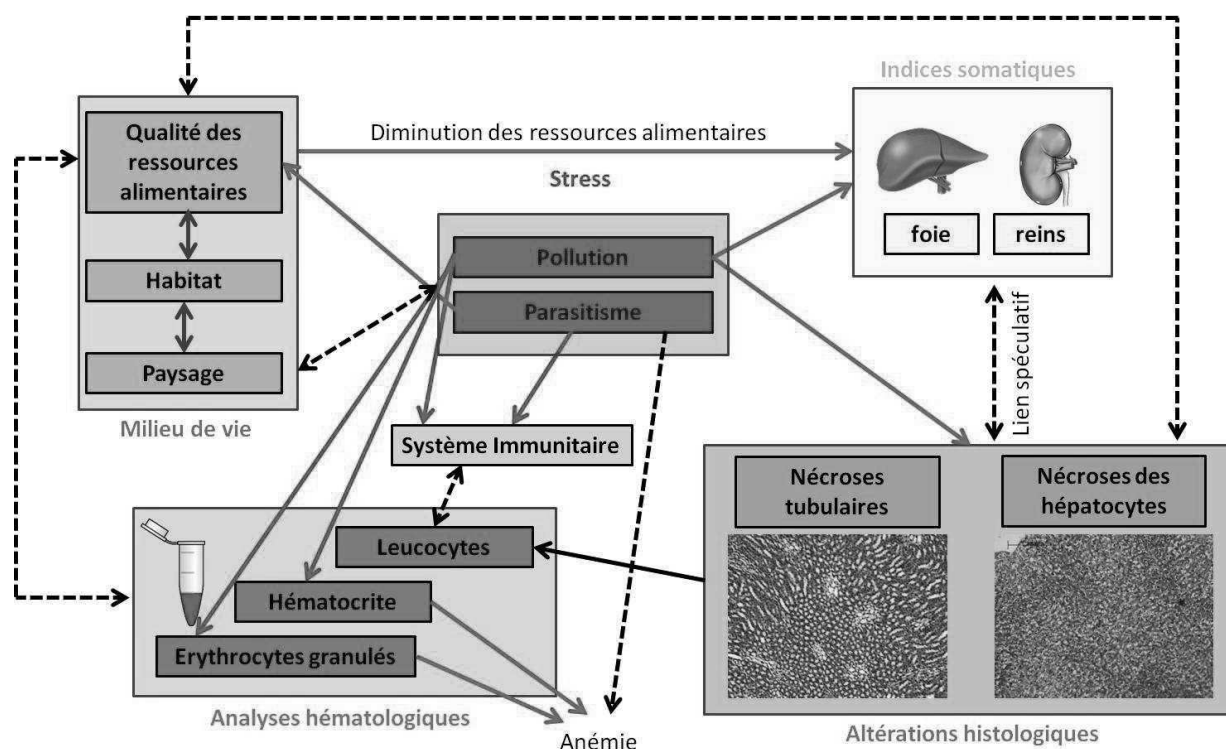


Figure IV.5 Schéma simplifié des résultats concernant les effets observés aux niveaux somatiques, histologiques et hématologiques. Les effets négatifs sont figurés par des flèches rouges et les interactions par des flèches noires pointillées.

Les indices de condition corporelle et les indices somatiques sont largement débattus en écologie (Green, 2001; Schulte-Hostedde et al, 2005; Peig et Green, 2009, 2010). Les méthodes de calculs et l'interprétation de ces indices sont sujettes à de nombreuses discussions à la fois fondamentales (relations entre les indices et fitness des individus) et appliquées (utilisation de la condition corporelle comme outil non léthal dans les études de biologie de la conservation). En écotoxicologie, ces indices ont été peu utilisés et les résultats des études précédentes sont contrastés, voire contradictoires (Nunes et al, 2001; Sánchez-Chardi et al, 2007). Dans le présent projet, nous avons posé comme hypothèse que les ETMs avaient un effet négatif sur la condition corporelle des individus car une partie de l'énergie nécessaire au stockage et à l'excrétion des polluants était supposée n'être plus disponible pour maintenir la condition corporelle (principe d'« energy budget ») (Green, 2001; Schulte-Hostedde et al, 2001, 2005). De même, nous avons supposé que les indices somatiques devraient augmenter avec les concentrations en ETMs à cause de la présence de pathologies et d'œdèmes dans les organes cibles (Ma, 1989; Milton et al, 2003; Sánchez-Chardi et al, 2007). Nos hypothèses ont été confirmées dans le cas de la condition corporelle et de l'indice somatique du foie mais pas des reins. Malgré les relations significatives mises en évidence entre ces indices et les concentrations en ETMs, il est cependant difficile d'interpréter leur

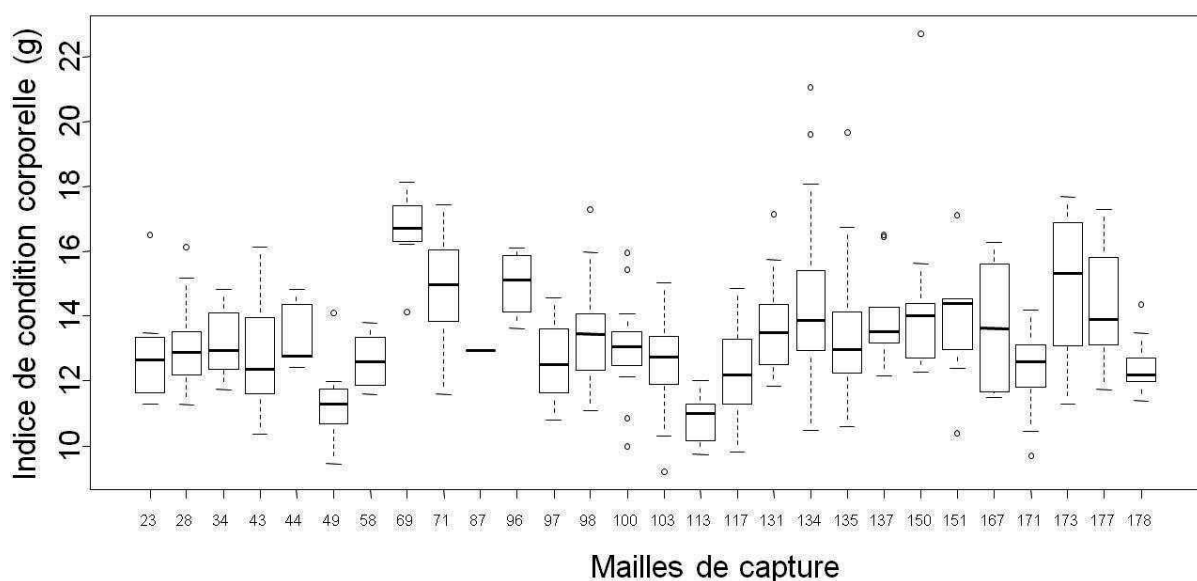
variation comme une conséquence directe des teneurs en ETMs. De plus, ces indices ne sont peut-être pas assez sensibles et/ou spécifiques pour être utilisés en tant que biomarqueurs d'effet de la pollution. Leur utilisation dans un contexte écotoxicologique reste donc compliquée et d'autres études plus « mécanistiques » (expériences d'exposition en laboratoire par exemple) devraient être réalisées afin de mettre en évidence les liens de cause à effet entre concentrations en ETMs et variations de ces indices.

Malgré l'observation d'effets liés à la présence des ETMs, l'ensemble des individus présentant des concentrations élevées, même supérieures aux seuils toxiques, ne présentaient pas systématiquement d'effets décelables. A l'inverse, certains individus présentant des concentrations plus faibles présentaient certaines pathologies. Ces résultats suggèrent donc une certaine tolérance ou sensibilité des individus face au stress induit par la présence du Cd et du Pb. La production de métallothionéines (MTs), protéines impliquées dans le stockage et l'excrétion des ETMs, peut expliquer, parmi d'autres causes, la tolérance des individus aux ETMs (Fritsch, 2010). Comme la production de MTs est déterminée par des caractéristiques individuelles (prédisposition génétique, âge, condition corporelle) et environnementales, cette hypothèse expliquerait également des différences de sensibilité observées entre les individus (Wlostowski et al, 2004; Swiergosz-Kowalewska et al, 2007). De plus, même si le coût de la tolérance à l'exposition aux ETMs reste un sujet débattu (Kammenga and Laskowski, 2000), l'énergie allouée dans la production de MTs pourrait également être une des causes de la baisse de condition corporelle observée chez les animaux les plus contaminés.

Les études écotoxicologiques cherchant à démontrer des effets au niveau populationnel sont plus complexes à mener que les études au niveau individuel. Les effets observés au niveau individuel dans cette thèse sont difficilement transposables au niveau populationnel et ne permettent donc pas de conclure sur le risque encouru par la population de mulots vivant aux alentours du site de Metaleurop Nord. Comprendre quelles peuvent être les répercussions des effets observés à un niveau d'organisation biologique sur un niveau d'organisation plus élevé représente un des challenges actuels de l'écotoxicologie. Dans le cadre de l'évaluation des risques environnementaux il semble donc important d'étudier et de développer des biomarqueurs permettant d'aller dans ce sens. Dans son étude, Tannenbaum (2001) explique que la stabilité d'une population est gouvernée par la fitness des individus qui la composent, c'est-à-dire leur capacité à atteindre l'âge adulte et à se reproduire. L'auteur émet des doutes quant à l'intérêt d'étudier des atteintes à l'échelle individuelle ou tissulaire et de transposer les conséquences de ces effets à l'échelle populationnelle (Tannenbaum, 2001). Dans son article, l'auteur explique que la perte de poids de certains animaux, que la variation de certains

paramètres biochimiques ou que la toxicité des polluants dans certains organes n'entraînera pas nécessairement des effets sur la population (Tannenbaum, 2001). Les taux de captures de la session 2006 sont, par exemple, supérieurs sur les sites très pollués comparés aux sites moyennement et peu pollués. En se basant exclusivement sur ces résultats, il serait possible de conclure que les mulots vivants autour de l'ancien site industriel de Metaleurop ne sont pas atteints par la pollution en ETMs au niveau populationnel. Cette conclusion irait à l'encontre de l'ensemble des résultats présentés ici qui indiquent des effets sur la santé des mulots, au niveau individuel, parfois importants. La génomique des populations pourrait à terme permettre d'évaluer, de manière plus précise, l'effet de la pression évolutive due aux polluants.

A la différence de nombreuses études qui conventionnellement comparent les animaux provenant d'un site de référence à des animaux provenant d'un site pollué, dans la présente thèse, l'approche développée était de prélever les animaux le long d'un gradient de contamination autour du site de Metaleurop Nord. Au cours de ces travaux, les résultats obtenus (relations entre concentrations environnementales et internes, relations entre les différents biomarqueurs évalués et les concentrations en ETM, interactions pollution-parasitisme) se sont avérés plus contrastés que les résultats provenant d'études réalisées dans des scénarii de comparaison d'un site témoin à un site pollué. Par exemple les indices de condition corporelle se sont avérés très variables d'une maille à l'autre, et la comparaison d'un site témoin unique à un site très pollué aurait pu conduire à une interprétation erronée des résultats (Figure IV.6).



**Figure IV.6** Distribution des indices de condition corporelle en fonction des mailles échantillonnées au cours de la session 2006.



Au cours de la session 2006, le fait d'avoir prélevé les animaux sur de multiples sites ( $n = 30$ ), afin d'obtenir des répliques de plusieurs mailles par niveau de contamination et par type paysager a notamment permis de prendre en compte certaines variables environnementales qui peuvent moduler les effets des stress et qui n'auraient pas pu être étudiées dans des études conventionnelles. L'approche intégrée utilisée dans ce projet est plus réaliste que certaines études écotoxicologiques qui comparent uniquement des animaux provenant d'un site témoin à ceux provenant d'un site pollué et qui ne permettent pas de discriminer les effets liés aux différences entre les deux sites de captures (variations de paysage, populations d'animaux différentes) des effets liés aux ETMs. De nouvelles analyses sont actuellement en cours (sous échantillonnage aléatoire des individus capturés, diminution du nombre de maille analysées, comparaison entre maille témoin et très polluée) afin d'évaluer les effets potentiels d'un échantillonnage insuffisant sur l'interprétation des résultats.

## **4 Développement de méthodes non létales**

---

### 4.1 Apports de la thèse et enjeux

---

Si aujourd'hui l'usage de méthodes non létales est motivé par un cadre juridique (Directive Européenne UE2010/63) et par une pression importante de la société dans le domaine de l'éthique, le développement de ces méthodes doit également être poursuivi pour plusieurs raisons scientifiques. Tout d'abord, le prélèvement de tissus (ou matrices) non létaux et peu intrusifs permet le suivi à long terme d'individus avec la possibilité de faire des captures-marquage-recapture (CMR). Ce type d'études est encore peu répandu en écotoxicologie mais devrait permettre de répondre à de nombreuses questions qui n'ont pas pu être abordées jusqu'à présent. Par exemple, le suivi des animaux par la pose de transpondeur ou le radio-pistage pourrait permettre, à terme, de mieux comprendre comment les caractéristiques individuelles ou les traits de vie des animaux (prospection, occupation du territoire) qui peuvent influencer l'exposition ou moduler les effets des ETMs. De même, par l'intermédiaire des techniques de CMR, les déjections récoltées pourraient être analysées afin d'évaluer le régime alimentaire (par exemple grâce au développement des techniques de séquençage de nouvelle génération sur ADN dégradé). L'utilisation de méthodes non létales permettrait aussi de réaliser des études sur des modèles biologiques qui, jusqu'à présent, ne pouvaient pas (ou peu) être étudiés en raison de leur statut de protection. Par exemple, des biopsies et des prélèvements réalisés sur de la graisse, de la peau, dans le sang de différentes espèces de mammifères aquatiques (Bryan et al, 2007; Aubail et al, 2013; Yang et al, 2002), sur des plumes (Ansara-Ross et al, 2013), sur des coquilles d'œufs de tortue (Lam et al, 2006) ont permis une estimation non invasive des concentrations en différents ETMs. L'ensemble de ces travaux montre la diversité des types de prélèvements non létaux qui peuvent être développés afin d'évaluer l'accumulation des ETMs dans les organes cibles.

Malgré des résultats contrastés concernant le Cd, cette thèse a permis de démontrer que les poils pouvaient être représentatifs des concentrations en ETMs dans les organes cibles, notamment dans le cas du Pb. Cependant, à cause de l'influence des caractéristiques individuelles et de la variabilité temporelle, leur utilisation en tant que biomarqueur d'accumulation reste à ce jour encore difficile. A notre connaissance, très peu d'études ont estimé les concentrations internes ou environnementales en ETMs grâce aux poils chez les micromammifères (Beernaert et al, 2007; D'Havé et al, 2006; Marcheselli et al, 2010; McLean et al, 2009). Le développement de cette matrice en tant que marqueur d'accumulation doit donc être poursuivi. L'objectif 1 a permis de mettre en évidence des relations

significatives entre les indices de condition corporelle et les concentrations en Cd et Pb. Même si l'utilisation de ces indices en écotoxicologie est débattue et même si leur emploi en tant que biomarqueurs d'effets est à ce jour encore difficile, des recherches ultérieures doivent être menées afin de mieux comprendre quels sont les principaux stress ou caractéristiques individuelles qui peuvent les influencer. Certains paramètres hématologiques évalués dans cette étude sont également reliés aux teneurs en ETMs. Les prélèvements sanguins et certains paramètres biochimiques, moins étudiés en écotoxicologie, doivent donc aussi faire l'objet de futures recherches et pourraient permettre, à terme, d'évaluer de façon non létale les effets de la pollution sur la faune sauvage.

Dans cette étude, les résultats concernant la détection des parasites ont été réalisés sur des tissus qui ont nécessité des prélèvements létaux. Cependant, dans le cadre de développement de méthodes non létales, nous avons également tenté de réaliser la détection de certaines bactéries sur des morceaux d'oreille (tissus bien vascularisés), ou sur quelques microlitres de sang (résultats non présentés). Ces résultats se sont avérés peu concluants, notamment à cause de problèmes liés à la conservation des échantillons. Cependant, ces tissus pourraient, à terme, permettre d'effectuer un diagnostic parasitaire. De même, le diagnostic concernant la présence/absence de certains parasites intestinaux, effectué dans cette thèse sur des contenus intestinaux, pourrait être réalisé de manière non létale. Des analyses immunologiques réalisées sur des échantillons de sang couplées à la détection dans les déjections des animaux de certains parasites, présents sous forme de kystes contenus dans les cellules épithéliales, pourraient être réalisées.

Les interactions et les effets cumulés des ETMs et du parasitisme sur la santé des animaux, qui constitue une approche originale de l'écologie du stress, pourraient être observés, de manière non létale, à travers le dosage de certaines hormones dans les déjections. Par exemple, une étude menée aux Etats-Unis sur des souris sauvages du genre *Peromyscus* a montré que le niveau d'hormones stéroïdes dites « de stress » (corticostérone) diminuait significativement dans les fèces de populations supplémentées en nourriture et déparasitées par rapport au niveau fécal de l'hormone chez des populations non supplémentées et non déparasitées (Pedersen and Greives, 2008). La mesure des concentrations de cette hormone dans les fèces pourrait donc, entre autres, être un outil pertinent pour mesurer le stress de populations diversement exposées à des polluants au parasitisme (Pedersen and Greives, 2008).

A ce jour, la principale limite à l'utilisation des méthodes non létales est liée à la lourdeur des manipulations. En effet, il est complexe de prélever des animaux dans leur milieu naturel,

de les maintenir en vie, de réaliser des mesures ou prélèvements sur des animaux vigiles ou sous anesthésie, et de les relâcher de façon à ce que la perturbation liée à la manipulation soit la plus faible possible. De plus, dans le cadre d'expérimentations de terrain, l'ensemble de ces étapes doivent être réalisé *in situ* dans des conditions parfois difficiles. Ces difficultés ne doivent cependant pas constituer un frein, et le développement d'équipements et de matériels transportables et aisément utilisables en conditions extérieures devraient, à terme, permettre de manipuler plus simplement les animaux lors des expérimentations de terrain.

#### 4.2 Prise en compte des caractéristiques individuelles

---

Dans cette thèse, il a été montré que les caractéristiques individuelles étudiées (âge et sexe) influençaient les paramètres étudiés (marqueurs d'accumulation ou d'effets). Ainsi, malgré l'utilisation de nouvelles méthodes de calculs des indices de condition corporelle et somatiques (Chapitre 1, standard major axis regression, SMA) développées pour limiter l'effet des caractéristiques individuelles (allométrie de développement, dimorphisme sexuel) (Peig et Green, 2009, 2010), ces indices étaient encore dépendants de l'âge et du sexe. De même, la gravité de certaines altérations histologiques (dégénération des tubules et nécroses dans les reins) différaient entre mâles et femelles. Si le développement de marqueurs non létaux d'accumulation ou d'effets des polluants semble amorcé, la prise en compte de manière non létale des variables individuelles, notamment de l'âge et du sexe, chez les animaux étudiés peut être problématique. Le sexage par simple observation des parties génitales des rongeurs adultes et sexuellement matures est aisé (Figure IV.7). Cependant, il est plus compliqué lorsque les animaux sont jeunes ou en période de repos sexuel. Il est naturellement indispensable dans le cadre du développement de méthodes non létales d'utiliser des techniques de sexages non intrusives. Aujourd'hui, les méthodes les plus répandues consistent à sexer les individus lors des dissections en laboratoire. Cependant, les outils biomoléculaires peuvent constituer une alternative à ces techniques. Ainsi, une simple analyse moléculaire réalisée sur les phanères ou déjections des animaux peut permettre de déterminer le sexe des individus étudiés (Shaw et al, 2003).

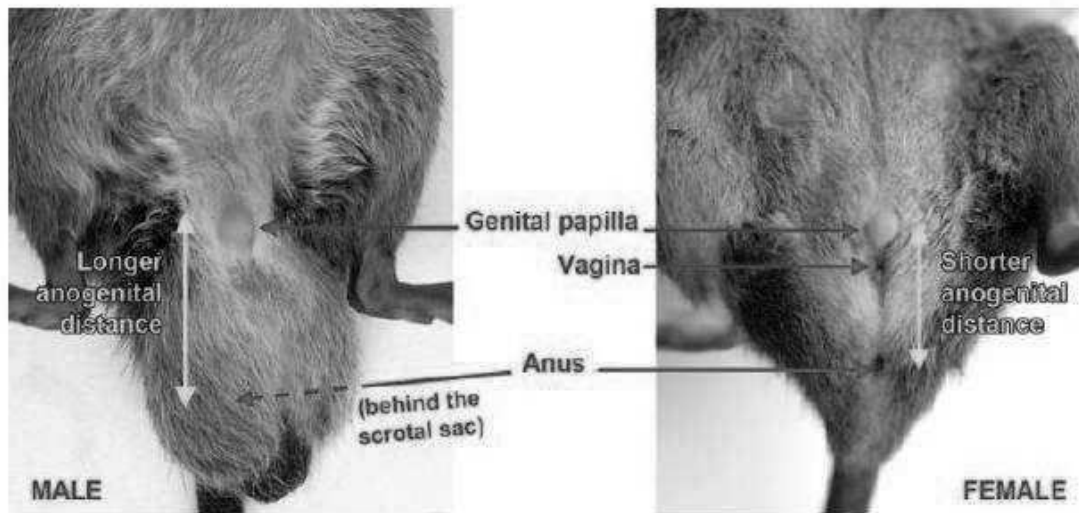


Figure IV.7 Comparaison externe des organes reproducteurs mâles et femelles (Herbretreau et al, 2011).

Pour l'évaluation de l'âge des animaux, le problème est similaire. Une fois encore, des méthodes alternatives au prélèvement des cristallins devraient être utilisées. Dans la présente thèse, la masse des individus permettait une estimation assez proche de celle obtenue par la pesée des cristallins ( $n = 315$ ,  $R^2 = 0,69$ ). En complément de la masse corporelle, d'autres observations peu intrusives peuvent également être réalisées. Ainsi, la croissance des molaires et le développement de l'appareil sexuel chez les rongeurs peuvent constituer un outil permettant de déterminer à quel stade de croissance (estimation relative de l'âge) appartiennent les individus étudiés (Figure IV.8).

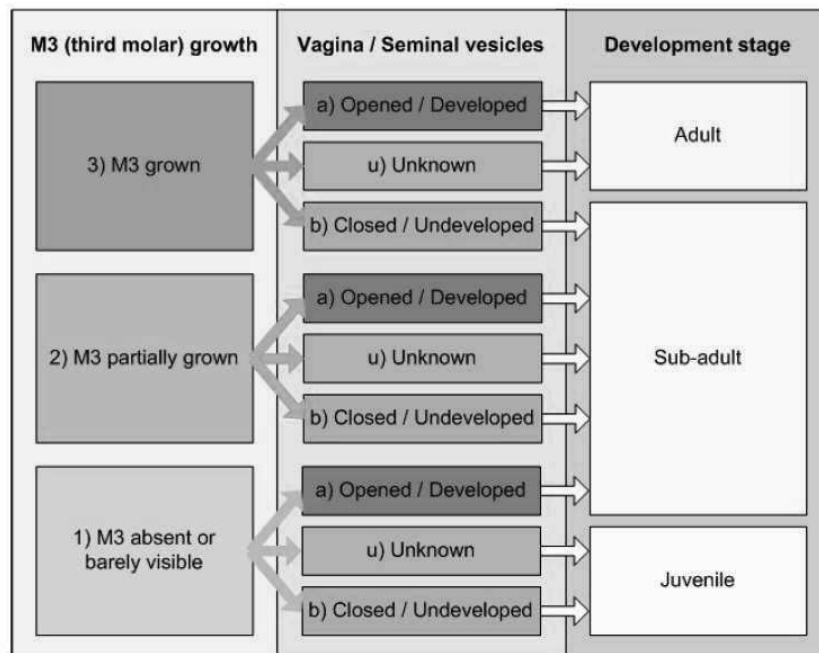


Figure IV.8 Critères de détermination permettant d'assigner une classe d'âge à un individu. (Herbretreau et al, 2011).

## **5 Limites de l'étude**

---

### 5.1 Modèle d'étude

---

Les micromammifères sont décrits comme des modèles d'étude fiables en écotoxicologie cependant leur utilisation est parfois débattue (Shore et Rattner, 2001; Tannenbaum, 2003). Leur espérance de vie étant réduite et leur taux de reproduction étant élevé, une sélection naturelle rapide des micromammifères les plus résistants pourrait s'opérer sur les sites d'étude les plus contaminés (Tannenbaum, 2003). Les animaux analysés dans le cadre des études écotoxicologiques seraient alors des animaux adaptés à leur milieu. La pression de sélection induite sur certains individus pourrait leur permettre d'être plus résistants aux polluants, ce qui induirait un biais dans les résultats, telle qu'une sous-estimation du risque encouru par les animaux (Tannenbaum, 2003). Cette hypothèse permettrait en partie d'expliquer le fait que certains individus présentant des concentrations élevées, notamment au-dessus des seuils toxiques de références, ne présentent pas d'altération ou d'effet délétère sur leur santé.

### 5.2 Prise en compte de sources de pollution multiples

---

Dans cette thèse, les animaux étaient soumis à de multiples stress. Parmi les stress liés aux polluants, seulement les trois principaux ETMs présents sur le site ont été mesurés : le Cd, le Pb et le Zn. Comme le Zn constitue un oligo-élément et qu'il est physiologiquement régulé, ses effets potentiels sur les individus n'ont pas été étudiés et seules les concentrations en Cd et Pb ont fait l'objet de mesures dans l'environnement et dans les organes cibles. Les liens entre les effets délétères et la présence de ces deux polluants ont été réalisés de façon indépendante. D'un part, les effets observés étaient reliés aux concentrations en Cd et d'autre part, ces effets étaient reliés aux concentrations en Pb. Ces analyses ne permettent pas de prendre en compte les effets conjoints du Cd et du Pb sur les biomarqueurs étudiés.

### 5.3 Stratégie d'échantillonnage

---

Le maillage réalisé sur le site autour de Metaleurop Nord a permis un découpage en 160 mailles de la zone d'étude. L'échantillonnage des micromammifères réalisé sur les mailles sélectionnées à chaque session a permis d'évaluer les effets du paysage et de la pollution sur les paramètres étudiés. Cependant, pour des raisons diverses (problèmes d'accès à certaines zones, de représentativité de certains types paysagers le long du gradient de contamination), il a été impossible de réaliser un échantillonnage orthogonal qui aurait permis de prendre en compte indépendamment les effets du paysage et de la pollution. Ce problème a également été

identifié dans le cadre de l'étude du parasitisme, certains paysages étant sur- ou sous-représentés le long du gradient de contamination. L'augmentation de certaines prévalences, même si elle est corrélée aux concentrations en ETMs, n'a donc pas pu être dissociée des variations paysagères.

#### 5.4 Choix de la maille témoin

---

Le choix de la maille témoin peut également être remise en question. Tout d'abord celle-ci se situe à 10 km de la zone d'étude et présente des caractéristiques paysagères différentes de celles rencontrées sur la zone d'étude autour du site industriel de Metaleurop Nord. La maille témoin est principalement composée de milieux forestiers moins anthropisés que ceux rencontrés sur le site d'étude. D'autre part, par sa distance au site de Metaleurop Nord, les populations de mulots sylvestres prélevées sur ce site pourraient présenter des différences (génétiques, de structure de population) rendant difficile leur comparaison aux populations de mulots prélevées sur le site de Metaleurop Nord. Enfin, même si cette maille est considérée comme une maille témoin, les concentrations mesurées dans les sols sont supérieures aux concentrations moyennes mesurées dans les sols du Nord-Pas-de-Calais. Les valeurs médianes de fonds pédogéochimiques mesurées pour le Nord-Pas-de-Calais (tout type de sols confondus) sont de 0,40 [0,03 – 1,39] µg/g MS de sol pour le Cd et de 29,7 [13,4 - 198,1] µg/g MS de sol pour le Pb (Sterckeman et al, 2007). Pour la maille témoin, ces valeurs sont de  $[Cd]_{\text{médiane}} = 1,5 \text{ µg/g MS de sol}$ ,  $[Pb]_{\text{médiane}} = 105 \text{ µg/g MS de sol}$   $[Zn]_{\text{médiane}} = 168 \text{ µg/g MS de sol}$ . Les concentrations en ETMs présentes dans les sols de la maille témoin pourraient également être à l'origine de certains effets ou de certaines pathologies observées chez les animaux prélevés sur cette maille.

## 6 Perspectives

---

### 6.1 Impacts cumulés des ETMs et du parasitisme sur la santé de la faune sauvage

---

Les résultats de la présente thèse indiquent qu'il existe des interactions multiples entre paysage, pollution et parasitisme chez les mulots vivants aux alentours de l'ancien site industriel de Metaleurop Nord. Ces résultats soulèvent donc de nouvelles questions concernant le rôle que peut jouer le parasitisme sur les réponses des animaux face au stress induit par les ETMs. Etant donné l'influence du parasitisme et des ETMs sur le statut immunitaire des animaux (Propst et al, 1999; Tersago et al, 2004), l'impact cumulé de ces deux sources de stress sur la santé des rongeurs devrait être plus amplement étudié. A notre connaissance, encore peu d'études prenant en compte les effets conjoints des ETMs et du parasitisme sur la faune terrestre ont été réalisées. Il semble donc indispensable de développer des approches d'écologie du stress s'intéressant plus précisément aux interactions entre le parasitisme et la pollution et à leurs effets conjoints sur le système immunitaire.

### 6.2 La poursuite du développement de méthodes non létales

---

Des études doivent donc être poursuivies afin de développer certains paramètres hématologiques en tant que biomarqueurs d'effets des ETMs non létaux. En plus des paramètres étudiés dans le présent projet, d'autres paramètres mesurables dans le sang et également spécifiques d'atteintes hépatiques ou rénales pourraient, à terme, permettre d'utiliser les prélèvements sanguins en substitution aux traditionnelles études histologiques. L'activité d'autres enzymes, révélatrices d'atteintes hépatiques (alanine amino transferase (ALT) ou aspartate amino transferase (AST) ou rénales (Lactate Déshydrogénase (LDH) et d'une manière plus générale, la biochimie du sang pourrait permettre de donner des indications plus précises concernant les atteintes des ETMs sur les organes cibles (Rogival et al, 2006; Sánchez-Chardi et al, 2007, 2008).



---

## *V. Conclusion*

---



Ce travail de recherche avait pour objectif de promouvoir l'utilisation de méthodes non létales dans le cadre des études de bioaccumulation et d'évaluation des effets des ETMs et du parasitisme sur la santé de la faune sauvage. A travers l'utilisation d'effectifs importants d'animaux (mulots sylvestres) prélevés *in situ*, sur plusieurs sites, la présente thèse a permis d'étudier plusieurs stress subis par les animaux dans leur environnement naturel ainsi que certaines sources de variabilité influençant les réponses des biomarqueurs (d'accumulation ou d'effets) abordés. Les résultats ont montré que les animaux vivant sur les sites pollués présentaient des concentrations importantes en ETMs dans leur organes cibles et parfois supérieures aux seuils toxiques. L'approche intégrée du présent projet a également permis de mettre en évidence que les caractéristiques paysagères ainsi que les prévalences parasitaires interagissaient avec la contamination en ETMs. Ces résultats novateurs amènent de nouvelles questions fondamentales concernant les effets cumulatifs que peuvent avoir les ETMs, le parasitisme et la qualité de l'habitat sur la santé des individus étudiés. Les interactions entre ces paramètres apparaissent donc comme une thématique de recherche qu'il faudrait développer en écologie du stress. La présente étude a également montré que certaines approches impliquant des techniques d'étude non létales et peu intrusives pouvaient être informatives et qu'elles pouvaient être utilisées en complément aux méthodes actuellement utilisées en écotoxicologie. Le développement de méthodes non létales doit être poursuivi afin de pouvoir, à terme, remplacer les techniques qui nécessitent le sacrifice des individus étudiés. Outre le fait que les méthodes non létales permettent de réaliser des études sur des modèles biologiques qui ne peuvent actuellement pas être étudiés, ces techniques permettent aussi l'ouverture de nouveaux champs d'études. Parmi les nouvelles possibilités, le suivi des animaux à long terme par la pause de transpondeurs ou l'utilisation de techniques biomoléculaires permettant d'évaluer certains paramètres (sexe, parasitisme ou régime alimentaire), semblent être des thématiques de recherches à développer. Les perspectives de recherches de ce projet pourraient notamment permettre d'intégrer les études de dynamique de population et de biologie de la conservation en écotoxicologie, avec beaucoup moins d'interférence sur les modèles étudiés que les techniques létales ou intrusives actuelles. A terme, ces perspectives pourraient également permettre de proposer des outils d'évaluation non létaux des risques environnementaux pour la gestion des sites pollués et le suivi de la santé des écosystèmes.



---

## *VI. Bibliographie*

---



## 1 R  rences bibliographiques

---

### A

Abt KF, Bock WF. 1998. Seasonal variations of diet composition in farmland field mice *Apodemus* spp. and bank voles *Clethrionomys glareolus*. *Acta Theriol* 43 : 379-389.

Adham KG, Al-Eisa NA, Farhood MH. 2011. Impact of heavy metal pollution on the hemogram and serum biochemistry of the libyan jird, *Meriones libycus*. *Chemosphere* 84 : 1408-1415.

Albers PH. 2003. Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. *In*: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (eds). *Handbook of ecotoxicology* (2nd ed.). CRC Press, Boca Raton (FL), Etats-Unis : 341–371.

Alekseev AN, Dubinina HV, Chirov PA. 2006. Tick morphology, tick microbiocenosis, and the ability to accumulate tick-borne pathogens as a result of anthropogenic pressure? *Int J Med Microbiol* 296 : 169-171.

Allan BF, Keesing F, Ostfeld RS. 2003. Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. *Conserv Biol* 17 : 267-272.

Angelstam P, Hansson L, Pehrsson S. 1987. Distribution borders of field mice *Apodemus sylvaticus*: the importance of seed abundance and landscape composition. *Oikos* 50 : 123-130.

Ansara-Ross TM, Ross MJ, Wepener V. 2013. The use of feathers in monitoring bioaccumulation of metals and metalloids in the South African endangered African grass-owl (*Tyto capensis*). *Ecotoxicol* 22 : 1072-1083.

Aubail A, Mendez-Fernandez P, Bustamante P, Churlaud C, Ferreira M, Vingada JV, Caurant F. 2013. Use of skin and blubber tissues of small cetaceans to assess the trace element content of internal organs. *Mar Pollut Bull* 76 : 158-169.

**B**

Bailey GNA. 1970. The carnivorous behavior of the Wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. J Zool Lons 162 : 533-534.

Barandika JF, Hurtado A, Garcia-Esteban C, Gil H, Escudero R, Barral M, Jado I, Juste RA, Anda P, Garcia-Perez AL. 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. Appl Environ Microbiol 73 : 6166-6171.

Beernaert J, Scheirs J, Leirs H, Blust R, Verhagen R. 2007. Non-destructive pollution exposure assessment by means of wood mice hair. Environ Pollut 145 : 443-451.

Beldomenico PM, Telfer S, Gebert S, Lukomski L, Bennett M, Begon M. 2008. Poor condition and infection: a vicious circle in natural populations. P Proc R Soc B: Biol Sci 275 : 1753-1759.

Berckmoes V, Scheirs J, Jordaens K, Blust R, Backeljau T, Verhagen R. 2005. Effects of environmental pollution on microsatellite DNA diversity in wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations. Environ Toxicol Chem 24 : 2898-2907.

Bernier J, Brousseau P, Krzystyniak K, Tryphonas H, Fournier M. 1995. Immunotoxicity of heavy metals in relation to Great Lakes. Environ Health Perspect 103 : 23-34.

Bersenyi A, Fekete SG, Szocs Z, Berta E. 2003. Effect of ingested heavy metals (Cd, Pb, and Hg) on hematology and serum biochemistry in rabbits. Acta Vet Hung 53 : 297-304.

Bickham J, Sandhu S, Hebert P, Chikhi L, Athwal R. 2000. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. Mutat Res 463 : 33-51.

Biser J, Vogel L, Berger J, Hjelle B, Loew SS. 2004. Effects of heavy metals on immunocompetence of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*). J Wildl Dis 40 : 173-184.



Borgsteede FHM. 1996. The effect of parasites on wildlife. *Vet Q* 18 : 138-140.

Bradham KD, Dayton EA, Basta NT, Schroder J, Payton M, Lanno RP. 2006. Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. *Environ Toxicol Chem* 25 : 769-775.

Bradley CA, Altizer S. 2007. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. *Trends Ecol Evol* 22 : 95-102.

Bryan CE, Christopher SJ, Balmer BC, Wells RS. 2007. Establishing baseline levels of trace elements in blood and skin of bottlenose dolphins in Sarasota Bay, Florida: Implications for non-invasive monitoring. *Sci Total Environ* 388 : 325-342.

Butet A. 1986. Régime alimentaire d'une population de mulots sylvestres (*Apodemus sylvaticus* L., 1758), dans une lande xéro-mésophile en cours de recolonisation. *Bull Ecol* 17 : 21-37.

Butet A, Paillat G. 1997. Insectivores et rongeurs de France : le Mulot Sylvestre – *Apodemus sylvaticus* (Linné, 1758). *Arvicola* 9 : 7-23.

## C

Cairns J Jr. 1988. Putting the Eco in Ecotoxicology. *Regulat Toxicol Pharmacol* 8 : 226-238.

Calvert JH. 1876. Pheasant poisoning by swallowing shot. *The Field* 47 no. 1208, 19 février, pp. 189

Cleaveland S, Hess GR, Dobson AP, Laurenson MK, MacCallum HI, Roberts MG, Woodroffe R. 2002. The role of pathogens in biological conservation. *In*: Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, Heesterbeek H, Dobson AP (eds). *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford : 139-150.

Cooke JA, Johnson MS. 1996. Cadmium in small mammals. *In*: Beyer WN, Heinz GH, Redmon-Norwood AW (eds). *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. CRC Press, Boca Raton (FL), Etats-Unis : 377-388.

Cutler SJ, Fooks AR, van der Poel WHM. 2010. Public health threat of new, reemerging, and neglected zoonoses in the industrialized world. *Emerg Infect Dis* 16 : 1-7.

## D

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop* 78 : 103-116.

Dauwe T, Bervoets L, Blust R, Pinxten R, Eens M. 2000. Can excrement and feathers of nestling songbirds be used as biomonitors for heavy metal pollution? *Arch Environ Contam Toxicol* 39 : 541-546.

Des Ligneris L, Douay F, Sterckeman T. 1999. Teneurs en métaux (Pb, Cd et Zn) de végétaux cultivés dans les exploitations agricoles et les jardins familiaux. *In*: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Programme de Recherches Concertées " Environnement et Activités humaines : Etude d'un secteur pollué par les métaux ", Région Nord-Pas-de-Calais, Feder, France : 130.

Deter J. 2007. Ecologie de la transmission de parasites (virus, nematodes) au sein d'une communauté de rongeurs à populations cycliques. Conséquences sur la santé humaine. Thèse de Doctorat. Montpellier: Université de Montpellier II.

D'Havé H, Scheirs J, Kayawe Mubiana V, Verhagen R, Blust R, De Coen W. 2006. Non-destructive pollution exposure assessment in the European hedgehog (*Erinaceus europaeus*): II. Hair and spines as indicators of endogenous metal and As concentrations. *Environ Pollut* 142 : 438-448.

Dickman CR, Doncaster P. 1989. The ecology of small mammals in urban habitats. II. Demography and dispersal. *J Anim Ecol* 58 : 119-127.

Dmowski K, Kozakiewicz M, Kozakiewicz A. 1995. Ecological effect of heavy metal pollution (Pb, Cd, Zn) on small mammal populations and communities. *Bull Acad Pol Sci Biol* 43 : 1-10.

Douay F, Perdrix E, Fourrier H, Plaisance H. 2001a. Cartographie des teneurs en cadmium, plomb et zinc dans les horizons organo-minéraux des parcelles agricoles autour des sites métallurgiques de Noyelles-Godault et d'Auby. *In: Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, Programme de Recherches Concertées " Environnement et Activités humaines : Etude d'un secteur pollué par les métaux "*, Région Nord-Pas-de-Calais, Feder, France : 27.

Douay F, Roussel H, Pruvot C, Waterlot C. 2008. Impact of a smelter closedown on metal contents of wheat cultivated in the neighbourhood. *Env Sci Pollut Res* 15 : 162-169.

Douay F, Pruvot C, Waterlot C, Fritsch C, Fourrier H, Lorette A, Bidar G, Grand C, de Vaufléury A, Scheifler R. 2009. Contamination of woody habitat soils around a former lead smelter in the North of France. *Sci Total Environ* 407 : 5564-5577.

DRIRE. 2003. L'Industrie au Regard de l'Environnement en 2002. Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement Nord-Pas de Calais, Douai, France, pp. 308.

## E

Eilser R. 1988. Lead Hazards to fish, wildlife and invertebrates: A synoptic review. *Biological Report* 85(1.14), U.S. Department of the Interior, U.S. Fish and Wildlife Service.

Epstein JH, Price JT. 2009. The significant but understudied impact of pathogen transmission from humans to animals. *Mt Sinai J Med* 76 : 448-455.

**F**

Faulkner BC, Lochmiller RL. 2000. Ecotoxicity revealed in parasite communities of *Sigmodon hispidus* in terrestrial environments contaminated with petrochemicals. *Environ Pollut* 110 : 135-145.

Forbes VE, Forbes, TL. 1994. *Ecotoxicologie - Théorie et applications*. INRA eds, Paris, France, pp. 256.

Friberg L, Nordberg GF, Vouk V. 1986. *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier North Holland Biomedical Press, New York, Etats-Unis, pp. 293.

Fritsch C. 2010. *Utilisation intégrée de bioindicateurs pour la surveillance des sols et des écosystèmes terrestres*. Thèse de Doctorat. Besançon: Université de Franche-Comté.

Fritsch C, Giraudoux P, Coeurdassier M, Douay F, Raoul F, Pruvot C, Waterlot C, de Vaufleury A, Scheifler R. 2010a. Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere* 81 : 141-155.

Fritsch C, Cosson RP, Coeurdassier M, Raoul F, Giraudoux P, Crini N, de Vaufleury A, Scheifler R. 2010b. Responses of wild small mammals to a pollution gradient: Host factors influence metal and metallothionein levels. *Environ Pollut* 158 : 827-840.

Fritsch C, Coeurdassier M, Giraudoux P, Raoul F, Douay F, Rieffel D, de Vaufleury A, Scheifler R. 2011. Spatially explicit analysis of metal transfer to biota: Influence of soil contamination and landscape. *PLoS ONE* 6 : e20682.

Furness RW. 1996. Cadmium in birds. *In*: Beyer WN, Heinz GH, Redmon-Norwood AW (eds). *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. CRC Press, Boca Raton (FL), Etats-Unis : 389-404.

## G

Gilot B. 1985. Bases biologiques, écologiques et cartographiques pour l'étude des maladies transmissibles par les tiques dans les Alpes françaises et leur avant pays. Thèse de Doctorat. Grenoble: Université de Grenoble.

Giraudoux P, Pleydell, Raoul F, Vaniscotte A, Ito A, Craig PS. 2007. *Echinococcus multilocularis*: Why are multidisciplinary and multiscale approaches essential in infectious disease ecology? Trop Med Health 35 : 293-299.

Giraudoux P, Raoul F, Pleydell D, Craig PS. 2008. Multidisciplinary studies, systems approaches and parasite eco-epidemiology: something old, something new. Parasite 15 : 469-476.

Glass GE, Schwartz BS, Morgan III JM, Johnson DT, Noy PM, Israel E. 1995. Environmental risk factors for Lyme disease identified with geographic information systems. American J Public Health 85 : 944-948.

González XI, Aboal JR, Fernández JA, Carballeira A. 2006. Considerations on the sample size of wood mice used to biomonitor metals. Sci Total Environ 366 : 910-914.

González XI, Aboal JR, Fernández JA, Carballeira A. 2008. Evaluation of some sources of variability in using small mammals as pollution biomonitors. Chemosphere 71 : 2060-2067.

Gorriz A, Llacuna S, Riera M, Nadal J. 1996. Effects of air pollution on hematological and plasma parameters in *Apodemus sylvaticus* and *Mus musculus*. Arch Environ Contam Toxicol 31 : 153-158.

Green A. 2001. Mass/length residuals: Measures of body condition or generators of spurious results? Ecol 82 : 1473-1483.

Grinnell GB. 1894. Lead poisoning. For Stream 42: 117-118.

Guilhermino L, Soares AMVM, Carvalho AP, Lopes MC. 1998. Effects of cadmium and parathion exposure on hematology and blood biochemistry of adult male rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 38 : 969-974.

## H

Halbrook R, Kirkpatrick R, Scanlon P, Vaughan MR, Veit HP. 1993. Muskrat populations in Virginia's Elizabeth river - physiological condition and accumulation of environmental contaminants. *Arch Environ Contam Toxicol* 25 : 438-445.

Halle S. 1993. Wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) as pioneers of recolonization in a reclaimed area. *Oecologia* 94 : 120-127.

Hansson L. 1985. The food of bank voles, wood mice and yellow-necked mice. *In*: Flowerdew JR, Gurnell J, Gipps JHW (eds). The ecology of woodlands rodents. *Symp Zool Soc Lond*, 55. Clarendon Press, Oxford : 141-168.

Harju A, Tahvanainen J. 1994. The effect of silver birch (*Betula pendula*) powder on physiological performance of field voles (*Microtus agrestis*). *Ann Zool Fennici* 31 : 229-234.

Herbreteau V, Jittapalapong S, Rerkamnuaychoke W, Chaval Y, Cosson J-F, Morand S (Eds). 2011. Protocols for field and laboratory rodent studies. Issu du projet CERoPath: [http://www.ceropath.org/FichiersComplementaires/Herbreteau\\_Rodents\\_protocols\\_2011.pdf](http://www.ceropath.org/FichiersComplementaires/Herbreteau_Rodents_protocols_2011.pdf)

Heyman P, Mele RV, Smajlovic L, Dobby A, Cochez C, Vandenvelde C. 2009. Association between habitat and prevalence of Hantavirus infections in bank voles (*Myodes glareolus*) and wood mice (*Apodemus sylvaticus*). *Vector-Borne and Zoonotic Dis* 9 : 141-146.

Hiratsuka H, Katsuta O, Toyota N, Tsuchitani M, Umemura T, Marumo F. 1996. Chronic cadmium exposure-induced renal anemia in ovariectomized rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 137 : 228-236.

Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (eds). Handbook of ecotoxicology (2nd ed.). CRC Press, Boca Raton (FL), Etats-Unis, pp. 1312.

## I

Institoris L, Siroki O, Ündeger Ü, Basaran N, Desi I. 2001a. Immunotoxicological investigation of subacute combined exposure by permethrin and the heavy metals arsenic (III) and mercury (II) in rats. *Int immunopharmacol* 1 : 925-933.

Institoris L, Siroki O, Ündeger Ü, Basaran N, Banerjee BD, Desi I. 2001b. Detection of the effects of repeated dose combined propoxur and heavy metal exposure by measurement of certain toxicological, haematological and immune function parameters in rats. *Toxicol* 163 : 185-193.

Ismail A, Roberts RD. 1992. Arsenic in small mammals. *Environ Technol* 13 : 1091-1095.

## J

Jacoby RO, Fox JG, Davisson M. 2002. Biology and diseases of mice. *In*: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW (eds). *Laboratory Animal Medicine* (2<sup>nd</sup> ed). Elsevier, San Diego, Etats-Unis : 35-120.

Jamon M. 1986. The dynamics of Wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) populations in the Camargue. *J Zool Lond* 208 : 569-582.

Jessup DA, Leighton FA. 1996. Oil pollution and petroleum toxicity to wildlife. *In*: Fairbrother A, Locke LN, Hoff GL (eds). *Noninfectious diseases of wildlife* (2<sup>nd</sup> ed). Iowa State University Press, Ames (IA), Etats-Unis : 141-156.

**K**

Kammenga J, Laskowski R. 2000. Demography in ecotoxicology. John Wiley & Sons Chichester, UK, pp. 297.

Kanter M, Coskun O, Gurel A. 2005. Effect of black cumin (*Nigella sativa*) on cadmium-induced oxidative stress in the blood of rats. Biol Trace Elem Res 107 : 277-288.

Khammes N, Aulagnier S. 2007. Diet of the wood mouse, *Apodemus sylvaticus* in three biotopes of Kabylie of Djurdjura (Algeria). Folia Zool 56 : 243-252.

Khidas K. 1993. Distribution of rodents in the Kalylie of Djurdjura (Algeria). Mammalia 57 : 207-212.

King KC, McLaughlin JD, Boily M, Marcogliese DJ. 2010. Effects of agricultural landscape and pesticides on parasitism in native bullfrogs. Biol Conserv 143 : 302-310.

Koeman JH. 1982. Ecotoxicological evaluation: the ecoside of the problems. Ecotox Envir Saf 6 : 358-362.

Kohn DF, Clifford CB. 2002. Biology and diseases of rats. In: Fox JG, Anderson LC, Loew FM, Quimby FW (eds). Laboratory Animal Medicine (2<sup>nd</sup> ed). Elsevier, San Diego, Etats-Unis : 121-165.

Kolcheva NE. 1986. Dynamics of age structure and population numbers of wood mice (*Apodemus sylvaticus*) in the southern Urals. Sov J Ecol 17 : 356-361.

Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K. 2004. Wildlife as source of zoonotic infections. Emerg Infect Dis 10 : 2067-2072.

Krzystyniak K, Tryphonas H, Fournier M. 1995. Approaches to the Evaluation of Chemical-induced Immunotoxicity. Environ Health Perspect 103 : 17-22.



**L**

Lafferty KD. 1997. Environmental parasitology: What can parasites tell us about human impacts on the environment? *Parasitol Today* 13 : 251-255.

Lafferty KD, Kuris AM. 1999. How environmental stress affects the impacts of parasites. *Limnol Oceanogr* 44 : 925-931.

Lagadic L, Caquet T, Amiard JC. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. *In* : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds). Biomarqueurs en écotoxicologie, aspects fondamentaux. Masson, Paris, France : 1-9.

Lam JCW, Tanabe S, Chan SKF, Lam MHW, Martin M, Lam PKS. 2006. Levels of trace elements in green turtle eggs collected from Hong Kong: Evidence of risks due to selenium and nickel. *Environ Pollut* 144 : 790-801.

Li Y, Yang L, Wang W, Li H, Lv J, Zou X. 2011. Trace element concentrations in hair of healthy Chinese centenarians. *Sci Total Environ* 409 : 1385-1390.

Lidicker WZ. 2007. Levels of organization in biology: on the nature and nomenclature of ecology's fourth level. *Biol Rev* 83 : 71-78.

Liu CM, Zheng YL, Lu J, Zhang ZF, Fan SH, Wu DM, Ma JQ. 2010. Quercetin protects rat liver against lead-induced oxidative stress and apoptosis. *Environ Toxicol Pharmacol* 29 : 158-166.

Lopes PA, Viegas-Crespo AM, Nunes AC, Pinheiro T, Marques C, Santos MC, Mathias Mde L. 2002. Influence of age, sex, and sexual activity on trace element levels and antioxidant enzyme activities in field mice (*Apodemus sylvaticus* and *Mus spretus*). *Biol Trace Elem Res* 85 : 227-239.

Lourenço J, Pereira R, Gonçalves F, Mendo S. 2013. Metal bioaccumulation, genotoxicity and gene expression in the European wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) inhabiting an abandoned uranium mining area. *Sci Total Environ* 443 : 673-680.

## M

Ma W. 1989. Effect of soil pollution with metallic lead pellets on lead bioaccumulation and organ/body weight alterations in small mammals. *Arch Environ Contam Toxicol* 18 : 617-622.

Ma WC. 1996. Lead in mammals. *In*: Beyer WN, Heinz GH, Redmon-Norwood AW (eds). *Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*. CRC Press, Boca Raton (FL), Etats-Unis : 281-296.

Marchand H, Paillat G, Montuire S, Butet A. 2003. Fluctuating asymmetry in bank vole populations (Rodentia, Arvicolinae) reflects stress caused by landscape fragmentation in the Mont-Saint-Michel Bay. *Biol J Linn Soc* 80 : 37-44.

Marcheselli M, Sala L, Mauri M. 2010. Bioaccumulation of PGEs and other traffic-related metals in populations of the small mammal *Apodemus sylvaticus*. *Chemosphere* 80 : 1247-1254.

Martiniaková M, Omelka R, Jancová A, Stawarz R, Formicki G. 2010. Heavy metal content in the femora of yellow-necked mouse (*Apodemus flavicollis*) and wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) from different types of polluted environment in Slovakia. *Environ Monit Assess* 171 : 651-660.

McLean CM, Koller CE, Rodger JC, MacFarlane GR. 2009. Mammalian hair as an accumulative bioindicator of metal bioavailability in Australian terrestrial environments. *Sci Total Environ* 407 : 3588-3596.

McMurry ST, Lochmiller RL, Boggs JF, Leslie Jr DM, Engle DM. 1996. Demography and condition of populations of white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) in late and early successional habitats. *J Mammal* 77 : 335-345.

Meerburg BG, Singleton GR, Kijlstra A. 2009. Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Crit Rev Microbiol* 35 : 221-270.

Miller RA. 1996. The aging immune system: primer and prospectus. *Sci* 273 : 70-74.

Milton A, Cooke JA, Johnson MS. 2003. Accumulation of lead, zinc, and cadmium in a wild population of *Clethrionomys glareolus* from an abandoned lead mine. *Arch Environ Contam Toxicol* 44 : 405-411.

Møller AP, Erritzøe J. 2000. Predation against birds with low immunocompetence. *Oecologia* 122 : 500-504.

Montgomery WI. 1980. Population structure and dynamics of sympatric *Apodemus* species (Rodentia: Muridae). *J Zool Lond* 192 : 351-377.

Montgomery WI. 1989. Population regulation in the Wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. I. Density dependence in the annual cycle of abundance. *J Anim Ecol* 58 : 465-475.

Montgomery WI, Wilson WL, Hamilton R, McCartney P. 1991. Dispersion in the Wood mouse, *Apodemus sylvaticus*: variable resources in time and space. *J Anim Ecol* 60 : 179-192.

Müller AK, Westergaard K, Christensen S, Sørensen SJ. 2001. The effect of long-term mercury pollution on the soil microbial community. *FEMS Microbiol Ecol* 36 : 11-19.

Mussali-Galante P, Del Castillo ER, Tovar-Sánchez E, Valverde M. 2013. Biomarkers of exposure for assessing environmental metal pollution: from molecules to ecosystems. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 29 : 117-140.

## N

Nageeb Rashed M, Soltan ME. 2005. Animal hair as biological indicator for heavy metal pollution in urban and rural areas. *Environ Monit Assess* 110 : 41-53.

Newman MC. 2001. Fundamentals of ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton (FL), Etats-Unis, pp. 459.

Newton I, Wyllie I, Gray A, Eadsforth C. 1994. The toxicity of the rodenticide flocoumafen to barn owls and its elimination via pellets. J Pestic Sci 41 : 187-193.

Norrdahl K, Korpimaki E. 2002. Changes in individual quality during a 3-year population cycle of voles. Oecologia 130 : 239-249.

Norrdahl K, Heinila H, Klemola T, Korpimaki E. 2004. Predator-induced changes in population structure and individual quality of *Microtus* voles: a large-scale field experiment. Oikos 105 : 312-324.

Nunes A, Mathias, Crespo A. 2001. Morphological and haematological parameters in the Algerian mouse (*Mus spretus*) inhabiting an area contaminated with heavy metals. Environ Pollut 113 : 87-93.

## O

Orbtel R. 1975. Animal food eaten by rodents in the reed swamps of Nesyt pond. Zool Listy 24 : 325-334.

Orbtel R, Holisova V. 1979. The food eaten by *Apodemus sylvaticus* in a spruce monoculture. Folia Zool 28 : 299-310.

Orsini P. 1981. Premiers échantillonnages de micromammifères en Provence. Mammalia. 45 : 187-197.

Outridge PM, Scheuhammer AM. 1993. Bioaccumulation and toxicology of chromium: implications for wildlife. Rev Environ Contam Toxicol 130 : 31-77.

**P**

Pain DJ. 1995. Lead in the environment. *In*: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (eds). Handbook of ecotoxicology (2nd ed.). CRC Press, Boca Raton (FL), Etats-Unis : 356-391.

Patz JA, Graczyk TK, Geller N, Vittor AY. 2000. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int J Parasitol* 30 : 1395-1405.

Patz JA, Daszak P, Tabor GM, Aguirre AA, Pearl M, Epstein J, Wolfe ND, Kilpatrick AM, Foufopoulos J, Molyneux D, Bradley DJ, Members of the Working Group on Land Use Change and Disease Emergence. 2004. Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environ Health Perspect* 112 : 1092-1098.

Peakall D, Burger J. 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicol Environ Saf* 56 : 110-121.

Pedersen AB, Greives TJ. 2008. The interaction of parasites and resources cause crashes in a wild mouse population. *J Anim Ecol* 77 : 370-377.

Peig J, Green AJ. 2009. New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118 : 1883-1891.

Peig J, Green AJ. 2010. The paradigm of body condition: a critical reappraisal of current methods based on mass and length. *Funct Ecol* 26 : 1323-1332.

Pereira R, Pereira ML, Ribeiro R, Gonçalves F. 2006. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus*) and Algerian mice (*Mus spretus*) from an abandoned mine area (Southern Portugal). *Environ Pollut* 139 : 561-575.

Posthuma L, Suter GW II, Traas TP. 2002. Species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis Publishers, CRC Press, Boca Raton (FL), Etats-Unis, pp. 616.

Propst T, Lochmiller R, Qualls C, McBee K. 1999. *In situ* (mesocosm) assessment of immunotoxicity risks to small mammals inhabiting petrochemical waste sites. *Chemosphere* 38 : 1049-1067.

## R

Ramade F. 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Editions Tec & Doc. Lavoisier, Paris France.

Rattner BA. 2009. History of wildlife ecotoxicology. *Ecotoxicol* 18 : 773-783.

Rogers LM, Gorman ML. 1995. The diet of the wood mouse *Apodemus sylvaticus* on set-aside land. *J Zool* 235 : 77-83.

Rogival D, Scheirs J, de Coen W, Verhagen R, Blust R. 2006. Metal blood levels and hematological characteristics in wood mice (*Apodemus sylvaticus* L.) along a metal pollution gradient. *Environ Toxicol Chem* 25 : 149-157.

Rogival D, Scheirs J, Blust R. 2007. Transfer and accumulation of metals in a soil-diet-wood mouse food chain along a metal pollution gradient. *Environ Pollut* 145 : 516-528.

Romero LM. 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol Evol* 19 : 249-255.

Russell WMS, Burch RL. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen, Londres.

Rutter M, Russel-Jones R. 1983. Lead versus health: sources and effects of low level exposure, John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 379.

S

Saint Girons MC. 1960. Espace vital et comportement territorial chez *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* et *Microtus agrestis*. Relation avec les populations cycliques. Vie Milieu 11 : 233-260.

Saint Girons MC. 1966. Etude du genre *Apodemus* Kaup, 1829 en France. Mammalia 30 : 547-600.

Saint Girons MC. 1967. Etude du genre *Apodemus* Kaup, 1829 en France. Mammalia 31 : 55-100.

Saint Girons MC. 1973. Les mammifères de France et du Bénélux (faune marine exceptée). Doin, Paris, France, pp. 480.

Salińska A, Włostowski T, Zambrzycka E. 2012. Effect of dietary cadmium and/or lead on histopathological changes in the kidneys and liver of bank voles *Myodes glareolus* kept in different group densities. Ecotoxicol 21 : 2235-2243.

Salińska A, Włostowski T, Oleńska E. 2013. Differential susceptibility to cadmium-induced liver and kidney injury in wild and laboratory-bred bank voles *Myodes glareolus*. Arch Environ Contam Toxicol 65 : 324-331.

Sánchez-Chardi A, Peñarroja-Matutano C, Ribeiro CAO, Nadal J. 2007. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals. Part II. The wood mouse, *Apodemus sylvaticus*. Chemosphere 70 : 101-109.

Sánchez-Chardi A, Marques CC, Gabriel SI, Capela-Silva F, Cabrita AS, López-Fuster MJ, Nadal J, Mathias ML. 2008. Haematology, genotoxicity, enzymatic activity and histopathology as biomarkers of metal pollution in the shrew *Crocidura russula*. Environ Pollut 156 : 1332-1339.

Sánchez-Chardi A, Peñarroja-Matutano C, Borrás M, Nadal J. 2009a. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals Part III: Structural alterations. *Environ Res* 109 : 960-967.

Sánchez-Chardi A, Oliveira Ribeiro CA, Nadal J. 2009b. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland of Doñana. *Chemosphere* 76 : 387-394.

Scheirs J, de Coen A, Covaci A, Beernaert J, Mubiana Kayawe V, Caturla M, de Wolf H, Baert P, Van Oostveldt P, Verhagen R, Blust R, de Coen W. 2006. Genotoxicity in wood mice (*Apodemus sylvaticus*) along a pollution gradient: exposure-, age-, and gender-related effects. *Environ Toxicol Chem* 25 : 2154-2162.

Scheuhammer AM. 1991. Effects of acidification on the availability of toxic metals and calcium to wild birds and mammals. *Environ Pollut* 71 : 329-375.

Schulte-Hostedde A, Millar J, Hickling G. 2001. Evaluating body condition in small mammals. *Can J Zool* 79 : 1021-1029.

Schulte-Hostedde A, Zinner B, Millar J, Hickling G. 2005. Restitution of mass-size residuals: Validating body condition indices. *Ecol* 86 : 155-163.

Shaw CN, Wilson PJ, White BN. 2003. A reliable molecular method of gender determination for mammals. *J Mammal* 84 : 123-128.

Shore RF, Douben PET. 1994a. The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrial small mammals. *Ecotoxicol Environ Saf* 29 : 101-112.

Shore RF, Douben PET. 1994b. Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. *Rev Environ Contam Toxicol* 134 : 49-89.

Shore RF, Rattner BA. 2001. *Ecotoxicology of Wild Mammals*. John Wiley & Sons, Londres, UK, pp. 752.



Smith PN, Cobb GP, Godard-Codding C, Hoff D, McMurry ST, Rainwater TR, Reynolds KD. 2007. Contaminant exposure in terrestrial vertebrates. *Environ Pollut* 150 : 41-64.

Spitz F. 1974. Répartition détaillée des rongeurs en forêt. *In*: Pesson P (ed). *Ecologie forestière - La forêt : son climat, son sol, ses arbres, sa faune*. Gauthier-Villars, Paris, France: 353-357.

Spurgeon DJ, Lofts S, Hankard PK, Toal M, McLellan D, Fishwick S, Svendsen C. 2006. Effect of pH on metal speciation and resulting metal uptake and toxicity for earthworms. *Environ Toxicol Chem* 25 : 788-796.

Sterckeman T, Douay F, Proix N, Fourrier H, Perdrix E. 2002. Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air and Soil Pollut* 135 : 173-194.

Sterckeman T, Douay F, Baize D, Fourrier H, Proix N, Schwartz C. 2007. Référentiel Pédo-Géochimique du Nord-Pas de Calais - Méthode et principaux résultats. *Etude et Gestion des Sols* 14 : 153-168.

Stevenson RD, Woods WA Jr. 2006. Condition indices for conservation: new uses for evolving tools. *Integr Comp Biol* 46 : 1169-1190.

Sures B, Siddal R, Taraschewski H. 1999. Parasites as accumulation indicators of heavy metal pollution. *Parasitol Today* 15 : 16-21.

Sures B. 2004. Environmental parasitology: relevancy of parasites in monitoring environmental pollution. *Trends Parasitol* 20 : 170-177.

Sures B. 2007. Host-parasite interactions from an ecotoxicological perspective. *Parassitologia* 49 : 41-42.

Swiergosz-Kowalewska R, Bednarska A, Callaghan A. 2007. Expression of metallothionein genes I and II in bank vole *Clethrionomys glareolus* populations chronically exposed in situ to heavy metals. *Environ Sci Technol* 41 : 1032-1037.

## T

Tannenbaum LV. 2001. What's so bad about weight loss, blood chemistry effects, kidney toxicity, etc. in a modeled ecological receptor? *Hum Ecol Risk Assess* 7 : 1765-1767.

Tannenbaum LV. 2003. Can ecological receptors really be at risk? *Hum Ecol Risk Assess* 9 : 5-13.

Tattersall FH, Macdonald DW, Hart BJ, Manley WJ, Feber RE. 2001. Habitat use by wood mice (*Apodemus sylvaticus*) in a changeable arable landscape. *J Zool* 255 : 487-494.

Tersago K, de Coen W, Scheirs J, Vermeulen K, Blust R, Van Bockstaele D, Verhagen R. 2004. Immunotoxicology in wood mice along a heavy metal pollution gradient. *Environ Pollut* 132 : 385-394.

Topashka-Ancheva M, Metcheva R, Teodorova S. 2003. A comparative analysis of the heavy metals loading of small mammals in different regions of Bulgaria II: Chromosomal aberrations and blood pathology. *Ecotoxicol Environ Saf* 54 : 188-193.

Truhaut R. 1977. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicol Environ Saf* Sep 1 : 151-173.

## V

van den Brink PJ. 2008. Ecological risk assessment: from book-keeping to chemical stress ecology. *Environ Sci Technol* 42 : 8999-9004.

van den Brink NW, Baveco H, Vermeulen F, de Coen W. 2008. Food web accumulation in a structured environment, SETAC Europe Annual Meeting, Warsaw, Poland.

van den Brink NW, Lammertsma D, Dimmers W, Boerwinkel M-C, van der Hout A. 2010. Effects of soil properties on food web accumulation of heavy metals to the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). *Environ Pollut* 158 : 245-251.

van den Brink NW, Lammertsma DR, Dimmers WJ, Boerwinkel MC. 2011. Cadmium accumulation in small mammals: species traits, soil properties, and spatial habitat use. *Environ Sci Technol* 45 : 7497-7502.

van Gestel CAM, van Straalen NM. 2008. A stress ecology framework for comprehensive risk assessment of diffuse pollution. *Sci Total Environ* 406 : 479-483.

van Straalen NM. 2003. Ecotoxicology becomes stress ecology. *Environ Sci Technol* 37 : 324-330.

Vermeulen F, van den Brink NW, D'Havé H, Mubiana VK, Blust R, Bervoets L, de Coen W. 2009. Habitat type-based bioaccumulation and risk assessment of metal and As contamination in earthworms, beetles and woodlice. *Environ Pollut* 157 : 3098-3105.

## W

Watts WHS. 1969. The regulation of Wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) numbers in Wytham woods, Berkshire. *J Anim Ecol* 38 : 285-304.

WHO. 2013. The world health report 2013 – Research for Universal Health Coverage. Geneva: World Health Organization: pp. 168.

Wijnhoven S, Leuven R, van der Velde G, Jungheim G, Koelemij E, de Vries F, Eijssackers H, Smits A. 2007. Heavy-metal concentrations in small mammals from a diffusely polluted floodplain: importance of species- and location-specific characteristics. *Arch Environ Contam Toxicol* 52 : 603-613.

Włostowski T, Krasowska A, Łaszkiewicz-Tiszchenko B. 2000. Dietary cadmium induces histopathological changes despite a sufficient metallothionein level in the liver and kidneys of the bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Comp Biochem Physiol C* 126 : 21-28.

Włostowski T, Bonda E, Krasowska A. 2004. Photoperiod affects hepatic and renal cadmium accumulation, metallothionein induction, and cadmium toxicity in the wild bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotoxicol Environ Saf* 58 : 29-36.

Wren CD, Harris S, Harttrup N. 1995. Ecotoxicology of Mercury and Cadmium. *In*: Hoffman DJ, Rattner BA, Burton GA Jr, Cairns J Jr (eds). Handbook of ecotoxicology (2nd ed.). CRC Press, Boca Raton (FL), Etats-Unis : 392-423.

## Y

Yang J, Kunito T, Tanabe S, Amano M, Miyazaki N. 2002. Trace elements in skin of Dall's porpoises (*Phocoenoides dalli*) from the northern waters of Japan: an evaluation for utilization as non-lethal tracers. *Mar Pollut Bull* 45 : 230-236.

## Z

Zejda J. 1965. Habitat of the Long-tailed field mouse (*A. sylvaticus* L.) in the Lowland region. *Zool Listy* 14 : 301-316.

Zwolak R. 2009. A meta-analysis of the effects of wildfire, clearcutting, and partial harvest on the abundance of North American small mammals. *For Ecol Manage* 258 : 539-545.

## 2 Références webographiques

---

Bilan Atmo - Nord Pas-de-Calais. 2008. Bilan 2007 des mesures de métaux lourds. Document consultable :

<http://www.atmo-dc.fr/admin/mediatheque/Bilan%202007%20%20Metaux%20lourds.pdf>

CCI-NPdc. Chambre Régionale de Commerce et d'industrie du Nord Pas-de-Calais. Site internet : <http://www.cci.fr/web/territoires/tdbcrci/region?idr=4&session=false>

DREAL L'air - L'environnement en Nord-Pas-de-Calais. Document consultable : <http://www.nord-pas-de-calais.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/air.pdf>

Eléments toxiques pour l'homme et l'environnement : <http://www.senat.fr/rap/100-261/100-26150.html> - ADEME, retombées atmosphériques des métaux en France (consulté en janvier 2014)

Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques (INSEE). 2012. Chiffres clés - Évolution et structure de la population Française : <http://www.insee.fr> (consulté en janvier 2014)

Textes de lois expérimentation animale : <http://legifrance.gouv.fr> (consulté en janvier 2014)





## RESUME DE THESE

En intégrant cette étude dans un contexte d'écologie du stress, l'objectif général de cette thèse est d'une part d'évaluer l'exposition et les effets des éléments traces métalliques (ETMs) et du parasitisme chez le mulot sylvestre (*Apodemus sylvaticus*) et d'autre part de contribuer au développement de marqueurs d'exposition et d'effets toxiques non létaux. Au cours de trois sessions de capture, des individus ont été collectés sur 30 sites localisés autour de l'ancienne fonderie de Metaleurop Nord (Nord – Pas-de-Calais) répartis le long d'un gradient de contamination sur une zone de 40 km<sup>2</sup> polluée en cadmium (Cd) et en plomb (Pb). Les concentrations en Cd et Pb ont été mesurées dans les organes cibles (foie et reins) et dans les poils des mulots. Différents biomarqueurs d'effets toxiques létaux et non létaux ont également été mesurés. Le nombre important de mulots prélevés ( $n = 886$ ) a permis d'étudier l'influence des caractéristiques individuelles (âge et sexe) et des caractéristiques paysagères sur les réponses des biomarqueurs. Les résultats indiquent que les concentrations en ETMs des animaux vivant sur les sites les plus contaminés s'avèrent significativement plus importantes que celles mesurées sur les autres sites. En outre, plus de 25% des mulots provenant des sites les plus pollués présentent des concentrations supérieures aux seuils toxiques et ont donc un risque accru de développer des pathologies (œdèmes, cancers). Par ailleurs, cette étude révèle également que l'accumulation des ETMs chez le mulot est influencée par les caractéristiques individuelles (âge et sexe), par l'occupation des sols et qu'elle varie en fonction de la session de capture. De plus, les résultats montrent que les concentrations en ETMs (dans les organes et dans les sols) et les caractéristiques paysagères modulent les prévalences de certains parasites. En effet, la richesse parasitaire augmente chez les individus les plus exposés aux ETMs. Ces concentrations influencent également les différents biomarqueurs d'effets létaux (indices somatiques, altérations histologiques) et non létaux (condition corporelle, hématologie) évalués. Ces résultats illustrent donc l'intérêt du développement de biomarqueurs non létaux pour l'évaluation des effets toxiques des ETMs. Les animaux avec les concentrations en ETMs les plus élevées présentent des atteintes au niveau individuel (diminution de la condition corporelle et variation des indices somatiques), au niveau tissulaire (apparition de lésions hépatiques et rénales) et au niveau cellulaire (variation de certains paramètres hématologiques). Cependant, étant donné les effets potentiels du parasitisme sur la santé de la faune sauvage, les liens de causalité entre la présence d'ETMs et les atteintes observées sont discutables. Ce travail de thèse souligne l'intérêt des approches multi-stress dans le cadre de l'évaluation de la santé de la faune sauvage.

**Mots clés :** écotoxicologie, éléments traces métalliques, parasitisme, faune sauvage, mulot sylvestre, multi-stress, méthodes non létales, bioaccumulation, effets toxiques, biomarqueurs, zoonoses, caractéristiques paysagères, condition corporelle, indices somatiques, hématologie, histologie, caractéristiques individuelles.

## ABSTRACT

By integrating this study in a stress-ecology framework, the aim of this thesis is to assess exposure and effects of trace metals (TMs) and parasitism on wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) and to contribute to the development of non-lethal exposure and toxicity markers. During three trapping sessions, individuals were collected from 30 sites located around the former smelter Metaleurop Nord (Nord-Pas-de-Calais) along a gradient of contamination over a 40 km<sup>2</sup> area polluted by cadmium (Cd) and lead (Pb). Concentrations of Cd and Pb were measured in the target organs (liver and kidneys) and in the hair of mice. Different lethal and non-lethal biomarkers of toxic effects were also measured. The large number of sampled mice ( $n = 886$ ) allowed to study the influence of individual characteristics (age and sex) and landscape features on the biomarker responses. The results indicate that the concentrations of TMs in animals living on the most contaminated sites are significantly higher than those measured on other sites. In addition, more than 25% of the mice trapped on the most polluted sites present TMs concentrations above toxicity thresholds and therefore have an increased risk of developing pathologies (edema, cancer). This study also reveals that the accumulation of TMs in wood mice is influenced by individual characteristics (age and gender) and landscape features and varies according to the trapping session. In addition, results show that the concentrations of TMs (both in organs and in soils) and landscape characteristics modulate the prevalence of some parasites. Parasite richness increases in individuals most exposed to TMs. These concentrations also influence the different lethal (somatic indices, histological alterations) and non-lethal (body condition, hematology) biomarkers of effects assessed. These results illustrate the importance of non-lethal biomarkers development for the evaluation of TMs toxic effects. Animals with the highest TMs concentrations presented adverse effects at the individual level (decreased body condition and changes in somatic indices), at the tissular level (increased liver and kidney damages) and at the cellular level (variation of some hematological parameters). However, given the potential effects of parasitism on animals' health, the causal links between the presence of TMs and observed alterations are questionable. This work emphasizes the importance of multi-stress approaches in wildlife's health assessment.

**Keywords:** ecotoxicology, trace metals, parasitism, wildlife, wood mouse, multi-stress, non-lethal methods, bioaccumulation, toxic effects, biomarkers, zoonoses, landscape features, body condition, somatic indices, hematology, histology, individual characteristics.

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire Chrono-Environnement (UMR CNRS/UFC 6249, Usc INRA).

Cette thèse a été financée par l'Agence de l'Environnement et de la Maitrise de l'Energie (ADEME) et par le conseil régional de Franche-Comté.

L'inscription universitaire en thèse de doctorat a été réalisée au sein de l'école doctorale Environnement-Santé (ES) de l'Université de Franche-Comté.

