



HAL
open science

Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (*Danio rerio*) par des PCB et des HAP

Tarek Daouk

► **To cite this version:**

Tarek Daouk. Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (*Danio rerio*) par des PCB et des HAP. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2011. Français. NNT : 2011LAROS346 . tel-00753036

HAL Id: tel-00753036

<https://theses.hal.science/tel-00753036>

Submitted on 16 Nov 2012

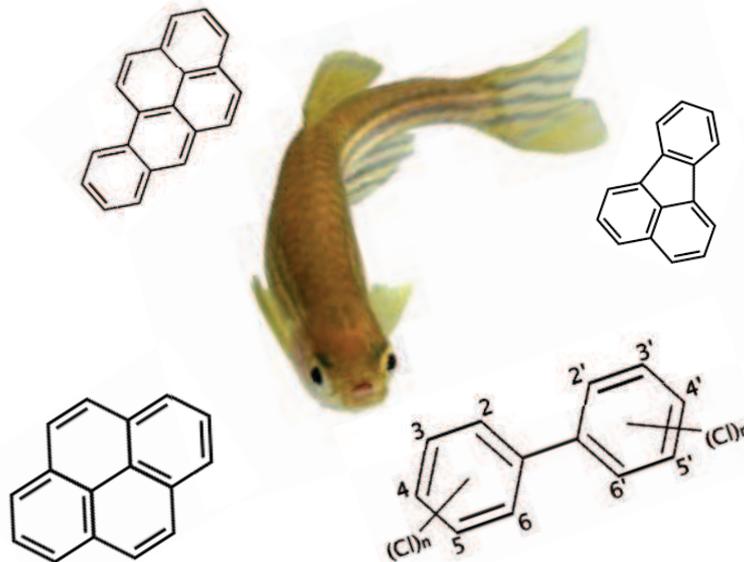
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

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

Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (*Danio rerio*) par des PCB et des HAP

ÉCOLE DOCTORALE GAY LUSSAC

Laboratoire : Ifremer - Laboratoire d'Écotoxicologie, L'Houmeau



THÈSE présentée par :

Tarek DAOUK

Le 30 juin 2011

pour l'obtention du grade de : **Docteur de l'Université de La Rochelle**

Discipline : **Biologie de l'Environnement, des Populations, Écologie**

JURY :

Paco BUSTAMANTE	Professeur, Université La Rochelle président du jury
Jérôme CACHOT	Professeur, Université Bordeaux 1, Rapporteur
Christophe MINIER	Professeur, Université du Havre, Rapporteur
Xavier COUSIN	Chargé de Recherche, INRA (mis à disposition de l'Ifremer)
Véronique LOIZEAU	Cadre de Recherche, Ifremer
François BRION	Chargé de Recherche, INERIS

*La Voie lactée
le champ de patates
les hérons blancs !*

Masoaka Shiki

Avant-propos

Cette thèse a été financée par une bourse doctorale octroyée par le Conseil Général de la Charente-Maritime pour une période de 3 ans (2007-2010).

En 2006 a débuté le projet ANR SoleBEMOL qui visait à évaluer les effets de polluants organiques des familles PCB, HAP et PBDE sur les populations de sole. Ce projet incluait un volet *in situ* et un volet expérimental. Le volet expérimental prévoyait une exposition chronique de juvéniles par voie trophique.

La biologie de la sole ne permettait pas d'envisager dans le cadre d'un projet ANR une étude sur le cycle de vie. Dans le même temps, l'absence de géniteurs élevés et les difficultés associées à la reproduction des soles en captivité compliquaient les études portant sur les stades précoces du développement embryonnaire.

En 2007 a donc été mis en place un projet similaire, financé par EC2CO-Cytrix : le projet GénérationPOP, dont les objectifs étaient, en tirant partie des avantages liés à l'utilisation d'une espèce modèle, le poisson zèbre, de caractériser les effets d'une exposition précoce à deux familles de polluants organiques persistants, les PCB et les HAP, selon 4 axes principaux :

- Embryotoxicité, génotoxicité et tumorigénèse
- Effet sur la croissance
- Effet sur la reproduction
- Transfert aux populations en utilisant l'approche de modélisation DEB

Une partie de ces objectifs faisaient partie de mon sujet de thèse.

Remerciements

Tout d'abord, je remercie Philippe-Jacques Hatt puis Jean Prou, les directeurs successifs de la station Ifremer de L'Houmeau, pour m'avoir accueilli dans le cadre de cette thèse.

Je tiens à remercier le Conseil Général de la Charente-Maritime qui a financé cette thèse.

Je remercie aussi mon directeur de thèse Xavier Cousin, pour son aide et ses conseils pour accomplir ces travaux dans le cadre du projet GénérationPOP, ainsi que pour sa patience pour corriger mes fautes d'orthographe.

Je remercie les Professeurs Jérôme Cachot et Christophe Minier qui ont accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Professeur Paco Bustamante, Véronique Loizeau et François Brion pour leur participation au jury.

Il ne faut pas oublier l'aide et les conseils des techniciens qui m'ont aidé, une pensée à Michel Prineau, Didier Leguay, Lucette Joassard et Laura Lyphout. Je tiens également à remercier Marie-Laure Bégout pour sa gentillesse et ses conseils utiles.

Je remercie aussi toutes les personnes ayant collaboré à ce projet :

Hélène Budzinski, Jérôme Cachot, Karyn Le Menach Ludovic Vicquelin et les stagiaires du LPTC de Bordeaux qui ont préparé les sédiments HAP, fait les dosages et m'ont appris de nouvelles techniques d'écotoxicologie; Véronique Loizeau, François Rroupsard et Anne-Marie Le Guellec d'Ifremer Brest qui ont préparé l'aliment et fait les dosages PCB ; Thierry Burgeot, Farida Akcha et Dominique Ménard d'Ifremer Nantes pour les analyses génotoxiques et EROD et enfin Thibaut Larcher et Mireille Ledevin d'ONIRIS Nantes qui ont effectués toutes les coupes histologiques et m'ont appris à les analyser.

Un remerciement pour les stagiaires qui m'ont aidé pendant ma thèse Cyril Rigaud, Jérémy Potier, Caroline Vignet qui sont devenus des collègues et des amis.

Finalement, il ne faut pas oublier l'ensemble des personnes de la station de L'Houmeau, qui m'ont accueilli et supporté pendant 4 ans.

J'aurai sans doute un grand et beau souvenir du laboratoire et des gens qui m'ont entouré. Je tiens à remercier Françoise Mornet, ma voisine de bureau pendant 4 ans, pour le soutien quotidien, ses encouragements et surtout sa bonne humeur.

Je n'oublie pas Bénédicte Charrier, Évelyne Travers et Marie Chivaille pour leur aide administrative pour diverses démarches compliquées.

Un remerciement spécial pour Marie-Élise Schwartz pour ses desserts et pour avoir bien joué le rôle d'enseignante de français, et pour Samuel Péan, *Biolo Geek* de service, pour son aide informatique. Je les remercie plus particulièrement de m'avoir soutenu lors de ces dernières semaines.

Je remercie de tout cœur Marcella, Fabrizio, Christel, Serena, Christine et Toni pour leurs amitiés, les bons moments et les repas italiens partagés ensemble.

Je remercie mes amis du laboratoire, dont Vincent, Christine, Cécile, Lilian, Renaud, Sandie...qui m'ont beaucoup soutenu pendant ma thèse et m'ont encouragé pendant ces années.

Je n'oublie pas également mes amis libanais Adolphe 'zouzou', Habib 'bibo' et Nazir qui m'ont aidé à plusieurs reprises, et m'ont permis de ne pas oublier la langue libanaise, ainsi que les moments passés ensemble à la salle de sport avec mon coach 'privé' Didier de Maison.

Et je n'oublierai jamais la bonne humeur et les blagues de Didier Leguay et la passion mutuelle pour les voitures, surtout les minis.

Pour finir, je remercie mes parents, surtout ma mère qui m'a aidé et remonté le moral chaque jour. Je n'oublierai jamais mon grand frère qui m'a soutenu moralement et financièrement pendant mes études.

Je garde de ces 4 ans de beaux souvenirs de la vie à La Rochelle, notamment de l'accueil que j'y ai reçu. Plusieurs profondes amitiés se sont créées, et j'ai rencontré des personnes que je ne vais jamais oublier. Merci à tous de m'avoir supporté lors de mes moments de stress et d'angoisse.

J'ai attendu 4 ans pour écrire ces mots et je tiens à ce que vous sachiez que "ça vient du fond du cœur". J'espère donc que je n'ai oublié personne...

Tarek Daouk

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE 1 : INTRODUCTION GENERALE..... 1

1	Pollution et polluant organiques.....	3
1.1	Définitions de la pollution et de l'écotoxicologie.....	3
1.2	Pollution en milieu aquatique.....	3
1.3	Biodisponibilité d'une molécule.....	5
1.4	Bioaccumulation, bioconcentration et réseau trophique.....	6
2	Les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	7
2.1	PCB : Généralités, historique et source d'origine.....	7
2.2	Structure des PCB.....	9
2.3	Toxicité des PCB.....	10
2.4	Propriétés des PCB.....	11
2.5	Exemple de mélange commercial : les Aroclor.....	12
2.6	HAP : généralités, historique et source d'origine.....	12
2.7	Structure des HAP et congénères.....	13
2.8	Propriétés des HAP.....	14
3	Mode/voie de contamination.....	15
3.1	La voie alimentaire : structure et fonction de l'appareil digestif.....	16
3.2	Voie cutanée : structure de la peau du poisson.....	19
3.3	Métabolisation des xénobiotiques.....	19
4	Effet des polluants (PCB et HAP) sur les poissons.....	24
4.1	Répartition de l'énergie au sein d'un organisme - altération par les polluants.....	24
4.2	Croissance.....	26
4.3	Perturbation du système endocrinien :.....	27
4.4	Effet sur la reproduction.....	30
4.5	Anomalies durant les stades embryonnaires et larvaires.....	33
4.6	Génotoxicité et tumorigenèse.....	34
5	Modèle biologique : le poisson zèbre (Danio rerio).....	34
5.1	Phylogénie et nom commun.....	34
5.2	Caractéristiques de l'espèce.....	35
5.3	Modèle de laboratoire.....	42

CHAPITRE 2 : BIOACCUMULATION, TRANSFERT ET EFFETS PHYSIOLOGIQUES D'UNE CONTAMINATION PAR VOIE TROPHIQUE AVEC DES MELANGES DE PCB CHEZ LE POISSON ZEBRE (DANIO RERIO)..... 44

1	Préambule.....	46
1.1	Contexte des expériences.....	46
1.2	Première expérience de contamination (2007).....	47
1.3	Deuxième expérience de contamination (résumé de l'article 1).....	50
2	Article 1 : Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situation induces ovary pathology and impairs reproduction ability.....	52
2.1	Introduction.....	53
2.2	Material and methods.....	55
2.3	Results.....	60
2.4	Discussion.....	67
2.5	Conclusions.....	71
3	Travaux complémentaires.....	72

- 3.1 Article en cours de rédaction : Bioaccumulation des PCB après contamination par voie trophique de poissons zèbres juvéniles et adultes. Mise en évidence d'une bioaccumulation et d'un transfert différentiels vers les œufs 72
- 3.2 Article en cours de rédaction : Electronic individual identification of zebrafish using Nonatec[®] RFID tags 74

CHAPITRE 3 : ETUDE DES EFFETS DES HAP SUR LE DEVELOPPEMENT DES EMBRYONS DE POISSON ZEBRE EN VALIDANT UN TEST DE SEDIMENT-CONTACT ADAPTE AUX MOLECULES HYDROPHOBES 76

1 Contexte expérimental 78

2 Expositions 80

3 Résultats 81

4 Conclusion 86

CHAPITRE 4 : CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 90

1 Conclusion générale..... 92

2 PCB - Conclusions particulières et perspectives 93

3 HAP – Conclusions particulières et perspectives 95

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 98

HOFFMAN, D. J., RATTNER, B. A., JR, G. A. B. & JR, J. C. (2002). HANDBOOK OF ECOTOXICOLOGY - SECOND EDITION, CRC PRESS. ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

ANNEXES 115

1 Expériences avec les PCB..... 117

1.1 Contamination des géniteurs avec les PCB..... 117

1.2 Doses théoriques des différents congénères utilisés 118

1.3 Expériences réalisées pendant la contamination 119

2 Hydrocarbures polycycliques aromatiques : B[a]P / DMBA / Pyr / Fl : expériences. 124

2.1 Concentrations réelles 124

2.2 Protocole expérimental 124

2.3 Directive REACH 125

3 Poisson zèbre : entretien, reproduction et histologie 126

3.1 Conditions d'élevage des poissons 126

3.2 Reproduction, pontes et survie..... 130

3.3 Histologie du poisson zèbre 132

4 Protocoles 136

4.1 Protocole de l'hybridation *in situ* 137

4.2 Protocole Immunohistochimie (IHC) 138

4.3 PCR (Polymérase Chain Reaction) 139

4.4 Synthèse de sonde (transcription) 140

4.5 Protocole comète sur embryons de poisson zèbre (d'après Farida Akcha modifié) 141

4.6	Protocole EROD (Nouri <i>et al.</i> 2006, d'après le protocole du Cemagref laboratoire d'Ecotoxicologie, modifié).....	143
4.7	Protocole de contamination des sédiments par des composés hydrophobes, exposition sédiment-contact sur médaka et poisson zèbre.....	144
4.8	Protocole d'histologie pour le poisson zèbre (Thibault Larcher et Mireille Ledevin, ONIRIS Nantes, protocole adapté).....	145
4.9	Schéma des étapes statistiques.....	146
5	Solutions	147

Liste des figures

Figure 1 : Répartition globale des PCB dans l'environnement	4
Figure 2 : Différents types de pollution.....	5
Figure 3 : Exemple de bioamplification au sein du réseau trophique	6
Figure 4 : Structure d'un congénère de PCB	9
Figure 5 : Comparaison des structures et toxicités entre la dioxine et les PCB "dioxin-like" CB-126 et CB-105.....	11
Figure 6 : Voie d'absorption, de distribution et d'élimination des toxiques chez les poissons	16
Figure 7 : Système digestif du poisson zèbre	17
Figure 8 : Tubule hépatique chez le poisson	18
Figure 9 : Biotransformation métabolique des xénobiotiques chez le poisson	20
Figure 10 : Mécanisme d'induction du cytochrome P450	22
Figure 11 : Modèle dynamique du bilan énergétique.....	25
Figure 12 : Schéma général du principe de perturbation endocrinienne.....	28
Figure 13 : Contrôle central de la synthèse de la Vtg et de la Zrp chez le poisson.....	29
Figure 14 : Cladogramme des Téléostéens	35
Figure 15 : Dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre	36
Figure 16 : Description générale du cycle de vie du poisson zèbre	37
Figure 17 : Période de clivage.....	38
Figure 18 : Période d'épibolie et de gastrulation	39
Figure 19 : Période de segmentation	40
Figure 20 : Embryon de 96 h.....	41
Figure 21 : Femelle adulte de poisson zèbre disséquée	42
Figure 22 : Bioaccumulation des PCB en fonction de la dose et du temps.....	47
Figure 23 : Accumulation différentielle selon le sexe.....	48
Figure 24 : Accumulation selon le sexe et transfert des PCB vers les œufs	49
Figure 25 : Patron d'expression du gène <i>myod</i> à 24 hpf.....	49
Figure 26 : Schéma expérimental pour les deux expériences de contamination au PCB.	51
Figure 27 : PCBs concentration in fish over-time.....	60
Figure 28 : PCB concentration in eggs.....	61
Figure 29 : Spawn quality distribution.....	63
Figure 30 : Spawn quality distribution according to sex of the contaminated fish.....	64
Figure 31 : Follicle stages	65
Figure 32 : Histological structure of ovaries	66
Figure 33 : Bioaccumulation des PCB	73
Figure 34 : Transfert des PCB dans les œufs	74
Figure 36 : Cartographie des deux sites Yville et Oissel	78
Figure 37 : Taux de saturation en oxygène d'embryons exposés à différents sédiments	79
Figure 38 : Présentation de la gamme de concentration utilisée dans ce projet.....	80
Figure 39 : Schéma résumant les différentes analyses réalisées lors de nos expériences de contamination par les 4 HAP	81
Figure 40: Test des comètes à 24 hpf.....	82
Figure 41 : Rythme cardiaque	84
Figure 42 : Mesure de la longueur et de la chambre cardiaque.....	85
Figure 43 : Malformations induites par le B[a]P sur des embryons de 96 hpf	86
Figure 44 : Structure des PCB utilisés lors de la deuxième expérience.....	118
Figure 45 : Principe général de l'hybridation <i>in situ</i>	121
Figure 46 : Patron d'expression du gène <i>myoD</i>	122
Figure 47 : Schéma d'exposition des embryons au sédiment contaminé.....	125
Figure 48 : Photo des embryons en contact avec le sédiment.....	125

Figure 49 : Schéma de la salle d'élevage avec toutes les installations	127
Figure 50 : Aquarium individuel de 20 poissons et filtre à charbon	129
Figure 51 : Système de surverse permettant le changement d'eau lors de l'activation de la pompe	129
Figure 52 : Schéma et photographie de l'installation expérimentale utilisée pour la deuxième expérience de contamination aux PCB.....	129
Figure 53 : Pondeur contenant des billes introduit dans un bac	131
Figure 54 : Pondeur de 1 L	131
Figure 55 : Présentation d'une coupe entière d'un poisson zèbre (femelle)	133
Figure 56 : Coupe entière de poisson zèbre	134
Figure 57 : Gonades femelles.....	135
Figure 58 : Gonade mâle	136
Figure 59 : Schéma montrant la stratégie statistique adoptée	146

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Concentration annuelle médiane de polluants, mesurée de 1995 à 2000 chez les bivalves, sur plusieurs sites d'étude du programme ROCCH.....	4
Tableau 2 : Distribution des congénères de PCB selon leur nombre de substitution en atome de chlore	9
Tableau 3 : Exemples de HAP	14
Tableau 4 : Récapitulatif de la toxicité de PCB et HAP	23
Tableau 5 : Mise en évidence de l'induction ou de la non-induction du cytochrome P4501A chez le poisson	24
Tableau 6 : Régimes utilisés avec la concentration de chaque congénère en ng/g PS et les spécificités des congénères choisis	47
Tableau 7 : Diets composition.....	56
Tableau 8 : Biometry and survival among different groups.....	61
Tableau 9 : Organs biometry	62
Tableau 10 : Spawn characteristics	62
Tableau 11 : Médiane du temps de survie.....	81
Tableau 12 : Surface de la chambre cardiaque.....	85
Tableau 13 : Longueur des larves	85
Tableau 14 : Pourcentage de malformation induit par les différentes contaminations à 96hpf.	86
Tableau 15 : Synthèse des résultats obtenus après expositions directes d'embryons à des sédiments enrobés avec des HAP individuels	87
Tableau 16 : Concentrations théoriques des 4 CB mélangés à la nourriture pour la première expérience.....	119
Tableau 17 : Concentrations théoriques des 13 CB mélangés à la nourriture pour la seconde expérience.....	119
Tableau 18 : Dosages utilisés pour la première méthode de dépigmentation des embryons .	120
Tableau 19 : Tableau des anticorps primaires	123
Tableau 20 : Concentrations théoriques et réelles du sédiment enrichi et rendement pour le B[a]P, DMBA, Fl et Pyr.....	124

Abréviations :

POP : Polluants organiques persistant
Flu : fluoranthène
PCB : polychlorobiphényles
HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques
TCDD : 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine
AhR : Aryl hydrocarbure Recepteur
TEF : Toxic Equivalent Factor
K_{ow} :
Pregnane X Receptor (PXR).
DMBA :
Pyr :
Phe :
B[a]P :
DEB : Dynamic Energy Budget
ER : récepteurs des œstrogènes
FSH : hormone folliculo-stimulante
LH : hormone lutéinisante
BSD : blue sac disease
PS : poids sec
DCE : Directive Cadre de l'Eau

Définitions :

POP : Désigne les Polluants Organiques Persistants. C'est-à-dire des molécules organiques qui au-delà d'une certaine concentration exerce des effets négatifs sur l'environnement. Leurs propriétés physicochimiques (par ex. stabilité, résistance à la métabolisation, hydrophobicité) leur confèrent des propriétés de persistance dans l'environnement. Les POP regroupent des molécules d'origines variées résultant de l'activité humaine (pesticides, de substances chimiques industrielles, ou de sous-produits involontaires des procédés industriels ou d'autres processus). Les POP incluent les PCB et les HAP dont il va être question dans ce manuscrit.

Biodisponibilité : Proportion d'une substance qui va effectivement agir dans l'organisme par rapport à la quantité absorbée. C'est aussi la proportion d'une substance présente dans un environnement mobilisable par un organisme.

Biotope : Le *biotope* est l'environnement physico-chimique, inerte, dit « abiotique » (littéralement « sans vie »). Il englobe toutes les composantes extérieures aux êtres vivants : le sol, l'air, l'eau, la lumière, le climat, etc (Larousse).

Bioaccumulation : On désigne par bioaccumulation le processus d'absorption par lequel les êtres vivants peuvent accumuler et concentrer dans leur organisme une substance quelle qu'elle soit y compris les polluants et quelle que soit la voie de pénétration considérée.

Notion d'embryon : En termes de développement, pour les poissons, le stade embryon définit la période entre la fécondation et l'éclosion. En ce qui concerne la réglementation en termes de tests *in vitro*, on considère la période eulothéroembryon qui s'étend jusqu'au premier repas et qui inclut donc des stades embryonnaires et des stades larvaires. Pour le poisson zèbre, la limite est actuellement discutée pour des raisons de précision des tests, ou de définition précise des stades. Elle est généralement considérée comme durant jusqu'à 96hpf.

Chapitre 1 : Introduction générale

1 Pollution et polluant organiques

1.1 Définitions de la pollution et de l'écotoxicologie

La pollution est définie par la dégradation de l'environnement par des facteurs naturels ou par l'activité humaine (Dictionnaire Larousse 2010). En 1965, le mot pollution est définie de façon large par les experts du Comité scientifique du premier Comité de la Maison-Blanche pour la protection de l'environnement : *« la pollution, dit ce rapport, est une modification défavorable du milieu naturel qui apparaît en totalité ou en partie comme un sous-produit de l'action humaine, au travers d'effets directs ou indirects altérant les critères de répartition des flux de l'énergie, des niveaux de radiation, de la constitution physico-chimique du milieu naturel et de l'abondance des espèces vivantes. Ces modification peuvent affecter l'homme directement ou au travers des ressources agricoles, en eau et autres produits biologiques. Elles peuvent aussi l'affecter en altérant les objets physiques qu'il possède, les possibilités récréatives du milieu ou encore en enlaidissant la nature. »* (d'après Ramade, 1992) Généralement, la pollution résulte de l'introduction de un ou plusieurs contaminant(s) nocif(s) dans le milieu naturel qui cause(nt) un dérèglement au sein de l'écosystème. Le terme d'écotoxicologie a émergé en 1969 ; l'écotoxicologie est la science qui inclut l'étude du devenir et des effets d'un polluant dans un écosystème et l'évaluation des risques qui y sont liés.

1.2 Pollution en milieu aquatique

Les polluants sont retrouvés dans tous les compartiments de l'environnement (atmosphère, sols, milieux aquatiques). Ces différents compartiments échangent entre eux par différents processus biogéochimiques par exemple : évaporation, érosion des sols, dépôts atmosphériques, ruissellements et lessivage des sols. Une conséquence de ces échanges est l'accumulation élevée de polluants dans le milieu aquatique et en particulier le milieu marin (Rowe *et al.*, 2007) comme présenté en Figure 1. Les résultats de la surveillance de la contamination chimique du littoral français obtenus par le Réseau d'Observation de la Contamination CHimique du littoral (ROCCH, ex-RNO) confirment les niveaux élevés de différents types de polluants dans l'environnement marin côtier (Tableau 1).

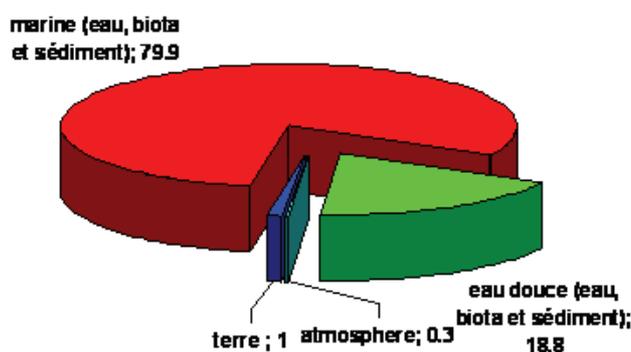


Figure 1 : Répartition globale des PCB dans l'environnement

Les différentes études et données indiquent en pourcentage que le compartiment marin constitue le plus grand réservoir de contaminants persistants (d'après Hoffman *et al.*, 2002).

Tableau 1 : Concentration annuelle médiane de polluants, mesurée de 1995 à 2000 chez les bivalves, sur plusieurs sites d'étude du programme ROCCH

Côte Atlantique et Manche	Activité humaine	Métaux lourds (mg.kg^{-1} de poids sec)					Produit organique (ng.g^{-1} de poids sec)				
		Cd	Cu	Hg	Pb	Zn	ΣDDT	Lindane	PCB (CB-153)	HAP (Flu)	
Somme	Estuaire	modérée	0.73	187.2	0.05	0.30	2989	4.9	3.2	31.8	161.6
Seine	Estuaire	élevée	2.40	257.6	0.10	1.04	4013	28.4	6.0	321.0	385.0
Vilaine	Baie	modérée	0.91	211.2	0.06	0.37	3886	3.1	3.2	26.4	129.8
Loire	Estuaire	modérée	2.30	240.0	0.10	0.68	6192	5.4	2.5	55.7	137.2
P. Breton	Baie	modérée	2.31	239.2	0.21	1.40	2298	6.4	2.4	26.7	115.9
Gironde	Estuaire	élevée	27.4	1275.5	0.24	2.45	5490	6.9	2.7	53.0	123.2

Les sources de pollution du milieu aquatique sont multiples ; ces pollutions peuvent être de cause anthropique (liée à l'activité humaine) ou naturelle (Figure 2). Parmi les pollutions naturelles, on retrouve les éruptions volcaniques, mais également les tempêtes ou les crues qui peuvent, par leur action de brassage, remettre en suspension et/ou disperser des sédiments ou sols contaminés. Les pollutions d'origine anthropique sont d'origines très diverses. Il peut s'agir de pollutions chroniques, telles que la dispersion de produits chimiques liée aux activités industrielles (dans l'air ou l'eau), portuaires (hydrocarbures, biocides) ou agricoles (pesticides, produits phytosanitaires, fèces) ou à la vie courante (gaz d'échappement, produits pharmaceutiques). Il peut également s'agir de pollutions accidentelles telles que les marées noires ou certaines catastrophes nucléaires.

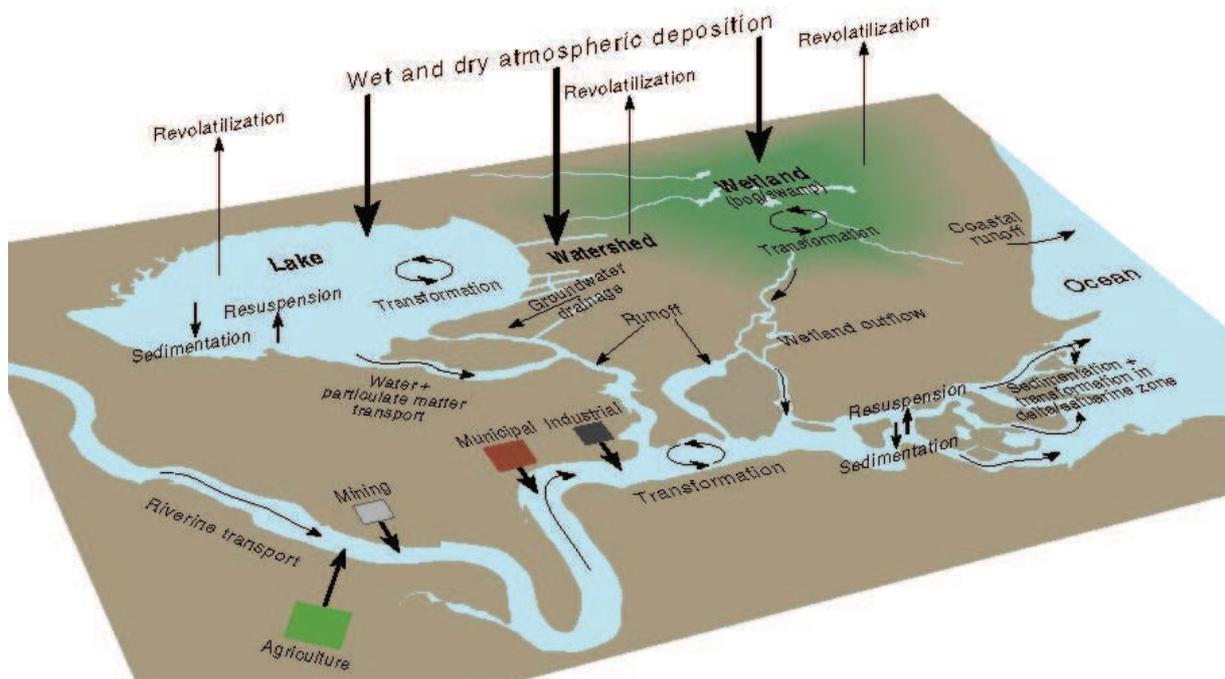


Figure 2 : Différents types de pollution
(AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues 1998)

1.3 Biodisponibilité d'une molécule

Depuis longtemps, les écologues végétaux distinguent pour les éléments minéraux nutritifs présents dans les sols le calcaire total et le calcaire dit « actif » (Lemée, 1969), qui en est la fraction réellement absorbable par les plantes donc disponible pour ces dernières. La biodisponibilité d'une substance en général et d'un polluant en particulier est donc la fraction de la quantité totale de ce dernier présente dans le biotope qui est absorbable par les animaux qui peut donc être prélevée dans le biotope par un organisme et être transférée, stockée et métabolisée par ce dernier (W. Kördel, 1997). Il convient toutefois d'exclure de la fraction réputée biodisponible celle qui transite dans le tube digestif des animaux sans être utilisée et qui n'est donc pas assimilée.

La notion de biodisponibilité est particulièrement importante pour les éléments toxiques (métaux et POP) car selon leur état chimique ils sont plus ou moins assimilables, sans omettre le fait que toutes choses égales par ailleurs, cet état joue un rôle majeur dans la toxicité d'un élément. Il a été démontré que la biodisponibilité des polluants organiques présents dans un biotope donné pouvait varier selon la constitution chimique de ce dernier et aussi dans un même biotope en fonction du temps (d'après Ramade, 1992). La disponibilité d'un polluant organique peut avoir une tendance à diminuer dans le temps. Ainsi, il est apparu que dans un sol traité pour la dernière fois quelque 49 ans auparavant par du DDT et de la dieldrine, la

biodisponibilité pour un ver de terre (*Eisenia foetida*) avait respectivement décrus pour ces insecticides de 50 et 80 % (Morrison *et al.*, 2000).

Par extension, la biodisponibilité peut également représenter la fraction d'une molécule contenue dans une matrice (sédiment par exemple) susceptible d'être transférée vers un organisme.

1.4 Bioaccumulation, bioconcentration et réseau trophique

On désigne par bioaccumulation le processus d'absorption par lequel les êtres vivants peuvent accumuler dans leur organisme des nutriments, toute autre substance présente naturellement dans son environnement ou encore un polluant organique de synthèse, quelle que soit la voie de pénétration dans l'organisme considéré. Chez les poissons la bioaccumulation sera la somme des absorptions par contact et par ingestion, plus celle par voie transbranchiale. La bioaccumulation n'implique pas obligatoirement un accroissement de concentration d'un polluant quand il passe du biotope dans l'organisme considéré. Généralement, la bioaccumulation se mesure par la concentration du produit dans un organe ou un animal, rapportée à sa masse ou à la masse de lipides dans le cas des composés organiques lipophiles, comme les PCB et les HAP (Tracey & Hansen, 1996). Le facteur de bioaccumulation est calculé par la concentration de toxique accumulée divisée par la concentration du toxique dans le milieu.

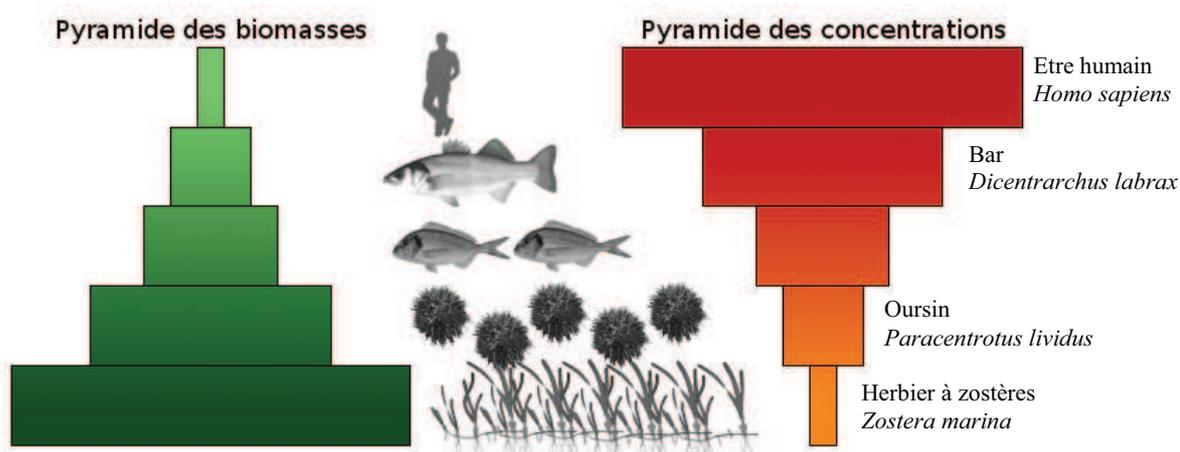


Figure 3 : Exemple de bioamplification au sein du réseau trophique

Les différentes espèces aquatiques se nourrissent les unes des autres selon leur niveau trophique et la concentration en polluant dans les organismes augmente au fur et à mesure d'un niveau à l'autre (modifié d'après Ramade, 1992).

La bioconcentration est le processus par lequel une substance prélevée dans un biotope par un être vivant va se rencontrer dans l'organisme de ce dernier à des concentrations supérieures à

celles auxquelles il se trouve selon le cas dans l'eau, l'air et /ou les sols. Il n'existe aucune différence fondamentale entre les processus de bioaccumulation et bioconcentration, cette dernière ne constituant qu'un cas particulier de la précédente : celui où existe un accroissement de concentration quand le polluant passe du biotope dans la biomasse, quel que soit le niveau trophique de l'organisme concerné.

Un réseau trophique se définit comme un ensemble de chaînes alimentaires reliées entre elles au sein d'un écosystème et par lesquelles l'énergie et la matière circulent (échanges d'éléments tel que le flux de carbone et d'azote entre les différents niveaux de la chaîne alimentaire, échange de carbone entre les végétaux autotrophes et les hétérotrophes). Ce dernier est formé d'un ensemble d'espèces qui se trouvent dans un même écosystème. En effet, les organismes qui ont ainsi concentré telle ou telle substance toxique vont servir de nourriture à d'autres espèces animales qui les accumuleront à leur tour dans leurs tissus. Le facteur de bioconcentration sera d'autant plus élevé que la substance sera moins rapidement métabolisable.

Avec les polluants xénobiotiques persistant peu ou pas biodégradables, leur concentration dans les êtres vivants s'élèvera à chaque niveau trophique, de sorte que, dans tous les cas, ce seront les superprédateurs, situés au sommet de la pyramide trophique, qui présenteront les taux de contamination les plus élevés (Figure 3 ; Gray, 2002 et Ramade, 1992). Ce processus est dénommé bioamplification des polluants (Daley *et al.*, 2009). Il faut également tenir compte des processus de métabolisation et d'excrétion.

2 Les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)

2.1 PCB : Généralités, historique et source d'origine

Les PCB sont des composés organiques de synthèse qui forment une large famille de 209 congénères variant par le nombre et la répartition des atomes de chlore (Tableau 2). La principale utilisation des PCB était dans les transformateurs électriques souvent appelés pyralène. En France, ils ont été synthétisés par l'industrie de 1930 à 1980. On les retrouve souvent dans les huiles, les peintures, les isolants électriques, etc. Il est estimé que plus d'un million de tonnes ont été produits dans le monde, du début des années 1920 jusqu'en 1977 (La Rocca & Mantovani, 2006). Les PCB sont interdits à l'usage et à la production depuis environ 30 ans, à cause de leur grande toxicité pour les animaux et l'Homme (Crinnion, 2011 et Meeker & Hauser, 2010).

En France, leur utilisation a été interdite en 1979 dans quelques produits tels que les encres, les huiles, les adhésifs ainsi que leur application dans les espaces ouverts. Puis, en 1987, il a été interdit de vendre ou d'acheter tout matériel contenant des PCB (système fermé, ex : transformateur) (McKinney & Waller, 1994). Finalement, en 2003, un plan de décontamination a été mis en place pour éliminer tout appareil contenant des PCB. Les PCB sont des polluants qui s'accumulent dans les poissons pendant toute leur vie et qui présentent une grande probabilité d'être transmis à l'Homme et de s'y accumuler (Belpaire *et al.*, 2010 ; Hardell *et al.*, 2010 ; Someya *et al.*, 2010).

Actuellement, les recherches sur les PCB démontrent que ces polluants, bannis depuis une trentaine d'années, sont toujours présent dans l'environnement et en particulier dans le milieu aquatique (Harrad *et al.*, 1994 ; de Mora *et al.*, 2010 ; Kožul *et al.*, *In press*).

2.2 Structure des PCB

Les PCB sont formés d'un biphényle substitué par un ou plusieurs atomes de chlore et ont comme formule chimique $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ où n est le nombre d'atome de chlore (Figure 4).

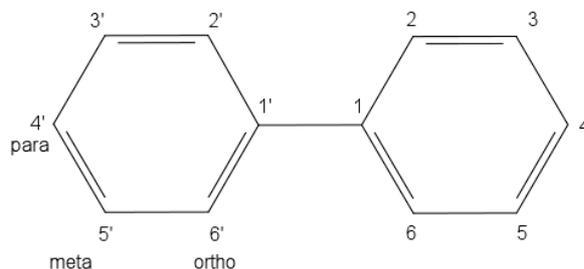


Figure 4 : Structure d'un congénère de PCB

La nomenclature utilisée pour le positionnement des atomes de chlore est la suivante (McFarland & Clarke, 1989) :

- Ortho : substitution au niveau des positions 2, 2', 6 et 6'
- Meta : substitution au niveau des positions 3, 3', 5 et 5'
- Para : substitution au niveau des positions 4 et 4'

Il peut y avoir 1 à 10 substitutions en chlore dans un congénère de PCB (Tableau 2)

Tableau 2 : Distribution des congénères de PCB selon leur nombre de substitution en atome de chlore

<i>Groupes homologues (sur la base du nombre de substitutions)</i>	<i>Congénères possibles</i>
Monochloro-biphényles	3
Dichloro-biphényles	12
Trichloro-biphényles	24
Tetrachloro-biphényles	42
Pentachloro-biphényles	46
Hexachloro-biphényles	42
Heptachloro-biphényles	24
Octachloro-biphényles	12
Nonachloro-biphényles	3
Decachloro-biphényle	1
TOTAL	209

2.3 Toxicité des PCB

La toxicité des PCB sera détaillée plus loin dans la section 4. Néanmoins, il apparaît important de préciser ici que les propriétés toxiques des différents congénères dépendent de leurs propriétés physico-chimiques, et en particulier du nombre de substitution par des atomes de chlore et de leur position sur le biphényle.

Deux éléments sont essentiels pour comprendre la toxicité des PCB, la similarité de structure avec la dioxine et la coplanarité pour les PCB "dioxin-like". Les autres PCB (non "dioxin-like") présentent une toxicité liée au nombre de substitution.

Les dioxines constituent une famille de polluants dont le congénère le plus connu est le 2,3,7,8-tétrachlorodibenzo-p-dioxine (TCDD) (Figure 5). Le TCDD présente une affinité très élevée pour le récepteur Aryl hydrocarbon (AhR) et a une toxicité élevée. La toxicité des PCB est peut être évaluée par rapport à celle de la dioxine, sous la forme d'un facteur d'équivalence toxique (TEF, Toxic Equivalent Factor). La similarité à la dioxine est définie sur la base de la structure des congénères. Les congénères de PCB sans substitution en position ortho (non-orthosubstitués) ou avec une substitution en position ortho (mono-orthosubstitués) et ayant des chlores en position para et au moins 2 chlores en position meta sont appelés "dioxin-like" (ex : le CB-126, Figure 5).

La coplanarité est définie par le positionnement de tous les atomes d'une molécule dans un même plan. L'élément déterminant pour les congénères de PCB "dioxin-like" est la substitution ou non en position ortho, si cette position est di-substitués moins le congénère sera toxique. On distinguera les "dioxin-like" non-orthosubstitués (comme les CB-77, CB-81, CB-126 et CB-169) qui sont coplanaires et les "dioxin-like" mono-orthosubstitués qui sont non coplanaires (8 congénères, comme le CB-105 présenté en Figure 5). La toxicité de ces congénères de PCB vient de leur capacité à se lier et à activer le récepteur AhR. Les PCB di-, tri- ou tetra-orthosubstitués sont plus encombrants ce qui leur confère une toxicité moindre et surtout différente de celle des "dioxin-like", ils font intervenir des mécanismes de toxicité indépendante de l'activation du récepteur AhR (Hoffman *et al.*, 2002).

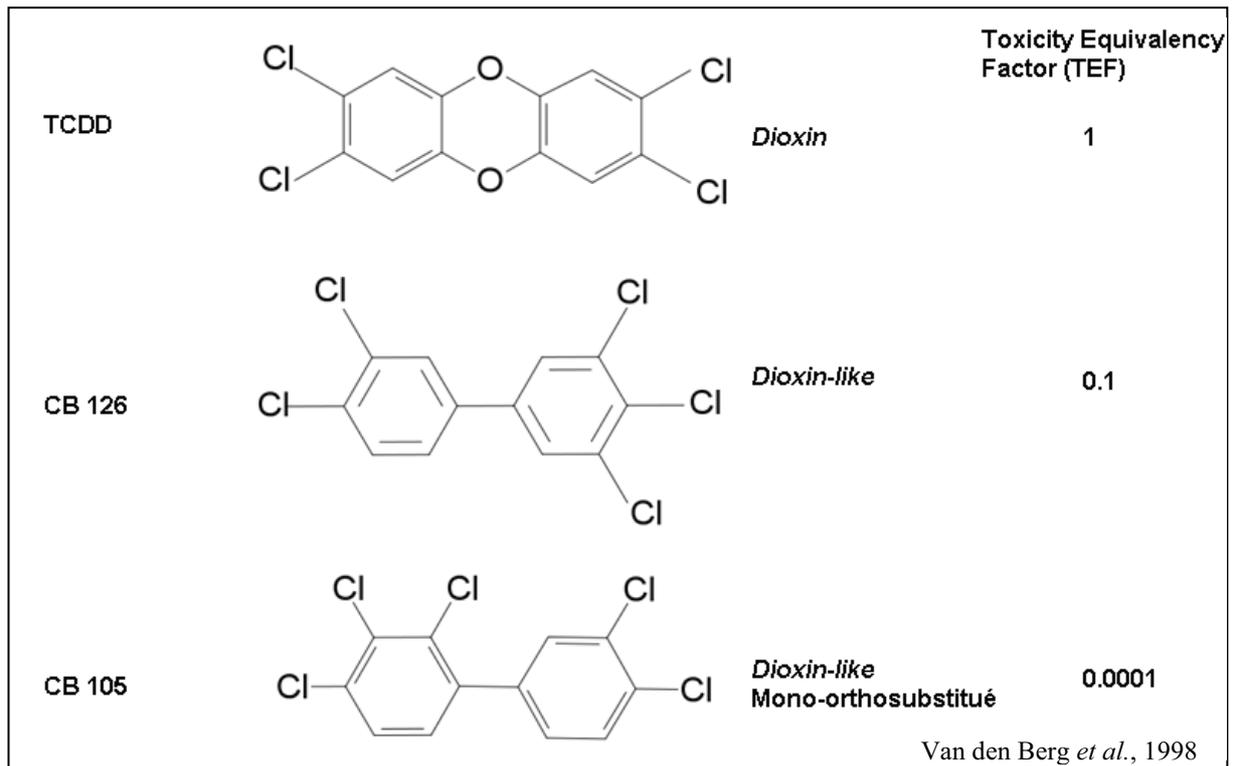


Figure 5 : Comparaison des structures et toxicités entre la dioxine et les PCB "dioxin-like" CB-126 et CB-105.

2.4 Propriétés des PCB

- Les PCB sont facilement transportés lors du lessivage des sols ou par le courant, la pluie et le vent, parfois très loin de leur site de production (Bergen *et al.*, 1998).
- La solubilité des PCB dans l'eau étant faible (Log K_{oc} élevé), ils auront tendance à s'adsorber sur le sédiment ou les particules organiques.
- Leur dégradation dans l'environnement est très faible. Elle dépend du nombre et de la répartition des atomes de chlore. En conséquence, les PCB sont des molécules stables et leur demi-vie est très longue (McKinney & Waller, 1994).
- Leur bioaccumulation diffère selon les congénères, l'espèce (mammifères, poissons,...) et les organes considérés (foie, muscle,...). Les PCB sont lipophiles et se concentrent dans les tissus et organes riche en graisse mais aussi dans les sites de détoxification tels que le foie (Fisk *et al.*, 2001 ; Nfon & Cousins, 2006 ; Letcher *et al.*, 2010).
- Les PCB sont bioamplifiables le long de la chaîne trophique, surtout dans les écosystèmes aquatiques car les chaînes trophiques y sont plus longues (Borgå *et al.*, 2001).

➔ **Les PCB sont donc des composés persistants et bioaccumulables**

2.5 Exemple de mélange commercial : les Aroclor

Avant l'interdiction de l'utilisation des PCB, les industries liées à la fabrication des matériels électriques utilisaient des mélanges techniques de PCB qui ont été commercialisés sous plusieurs noms. En France, deux mélanges de PCB (Phénoclor et Pyralène) ont été produits par la société Prodolec. D'autres compagnies ont produit des mélanges tels que le Clophen, le Kaneclor etc. Les mélanges les plus connus sont les Aroclor, commercialisés aux États-Unis et au Royaume-Uni (Urbaniak, 2007). Il existe 9 types d'Aroclor (1221, 1232, 1016, 1242, 1248, 1254, 1260, 1262, et 1268) tous produits par The Monsanto Corporation (Madison, NJ, USA). Dans leur nomenclature, le 12 correspond au nombre d'atome de carbone du biphenyle (seul l'Aroclor 1016 déroge à cette règle malgré la présence de 12 carbones également) tandis que les deux derniers chiffres désignent le pourcentage en masse des atomes de chlore présents dans le mélange. Chaque mélange est unique et possède des propriétés physiques et thermodynamiques différentes. Le mélange le plus utilisé est l'Aroclor 1254 (Newman *et al.*, 1998). En raison de l'utilisation de ces mélanges techniques, les PCB sont retrouvés dans l'environnement sous la forme de mélanges complexes, dont les proportions de congénères peuvent varier considérablement.

2.6 HAP : généralités, historique et source d'origine

Les HAP sont des composés organiques composés de plusieurs noyaux aromatiques. On distingue trois catégories de HAP en fonction de leur origine :

- les HAP pyrolytiques, issus de combustions incomplètes de la matière organique ;
- les HAP pétrogéniques, issus du pétrole et de ses dérivés (le fioul, l'huile et le charbon) (Hylland, 2006) ;
- les HAP diagéniques, issus de la décomposition de la matière organique par des organismes vivants.

Les HAP pyrolytiques et pétrogéniques sont majoritaires dans l'environnement. Contrairement aux PCB, les émissions de HAP sont en constante augmentation en raison de l'activité humaine (industrie, chauffage, gaz d'échappement...). Ainsi, la quantité de HAP émise dans l'atmosphère augmente considérablement ; en 1987, elle était estimée à 50 000 tonnes par an (Eisler, 1987), de nos jours, elle est estimée à plus de 500 000 tonnes (Zhang & Tao, 2009).

Comme dans le cas des PCB, les HAP peuvent être transportés sur de longues distances. Les HAP entrent dans le milieu aquatique par plusieurs voies : dépôts atmosphériques,

ruissellement d'eaux de pluies ou émission directe par le transport maritime ou les marées noires.

2.7 Structure des HAP et congénères

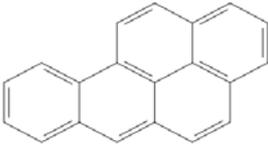
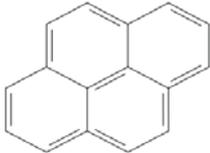
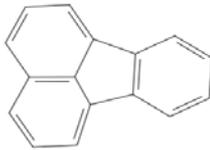
Les HAP sont des polluants organiques formés de plusieurs cycles aromatiques, possédant des caractéristiques physico-chimiques et toxiques différentes en fonction de leur structure. Contrairement à la famille des PCB qui est composée de 209 congénères, le nombre de HAP dans le milieu naturel semble infini. La solubilité d'un composé organique dans l'eau est définie par son coefficient de partage octanol-eau exprimé sous la forme de $\log K_{ow}$. Un grand nombre de HAP ont des valeurs de $\log K_{ow} < 5$ et sont faiblement solubles dans l'eau. Les HAP qui ont été utilisés sont peu solubles dans l'eau ($\log K_{ow} > 5$) et adhèrent sur le sédiment, et leur solubilité diminue avec l'augmentation du nombre de cycles (Hylland, 2006).

Dans le monde entier, les agences de protection de l'environnement ont établi une liste de 16 HAP, considérés comme toxiques ou potentiellement cancérigènes pour l'Homme et les animaux (EPA, commissions OSPAR 1998 et 2004, convention de Stockholm pour les Polluants Organique Persistants (POP)).

Liste des 16 HAP: Naphtalène ($\log K_{ow} = 3.35$), Acénaphène, Acénaphylène, Fluorène, Phénanthrène ($\log K_{ow} = 4.52$), Anthracène ($\log K_{ow} = 4.5$), Fluoranthène ($\log K_{ow} = 5.22$), Pyrène ($\log K_{ow} = 5.18$), Benz[a]anthracène ($\log K_{ow} = 5.91$), Chrysène ($\log K_{ow} = 5.86$), Benzo[k]fluoranthene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[a]pyrène ($\log K_{ow} = 6.04$), Indéno[1,2,3-cd]pyrène, Dibenz[a,h]anthracène, Benzo[ghi]perylene.

Tableau 3 : Exemples de HAP

Benzo[a]pyrène : B[a]P ; 7,12-diméthylbenzo[a]anthracène : DMBA ; Pyrène : Pyr ; Fluoranthène : Fl
(modifié d'après Hylland, 2006)

Congénères	Solubilité dans l'eau ($\mu\text{g/l}$)	Log K_{ow}	Nombre de cycles	Structures
B[a]P	1,6	6,04	5	
DMBA	140	6.36	4	
Pyr	132	5.18	4	
Fl	201	5.22	4	

2.8 Propriétés des HAP

- Leur nombre est indéfini.
- Ils peuvent être distribués partout dans l'environnement et transportés loin de leur source d'émission (Simonich *et al.*, 2011).
- Ils sont hydrophobes et peu solubles dans l'eau mais s'adsorbent facilement sur des particules (Aas *et al.*, 2000 ; Haritash & Kaushik, 2009; Tableau 3).
- Ils sont volatils, photodégradables et se dégradent chimiquement (Haritash & Kaushik, 2009).
- Ils sont bio-métabolisables dans différents organismes, dont les poissons. Cette métabolisation dépend de leur structure, de la température, du pH et des organismes présents dans le milieu (Haritash & Kaushik, 2009).
- Les métabolites produits peuvent être plus toxiques que la molécule initiale (Aas *et al.*, 2000).

- Un certain nombre d'entre eux ont des effets toxiques, mutagènes et cancérigènes sur les organismes (Yang *et al.*, 2010).

3 Mode/voie de contamination

Les principales différences entre les téléostéens et les espèces terrestres sont liées aux caractéristiques associées à la vie en milieu aquatique, comme l'extrême dépendance vis-à-vis du milieu, puisque les poissons sont des animaux osmorégulateurs et poïkilothermes.

Plusieurs voies de contamination existent pour un xénobiotique : la voie alimentaire, la voie respiratoire (assurée par les branchies chez les poissons et appelée trans-branchiale), la voie cutanée et la voie maternelle. Quatre étapes sont essentielles pour suivre le parcours d'un polluant dans un poisson : l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'excrétion (Figure 6).

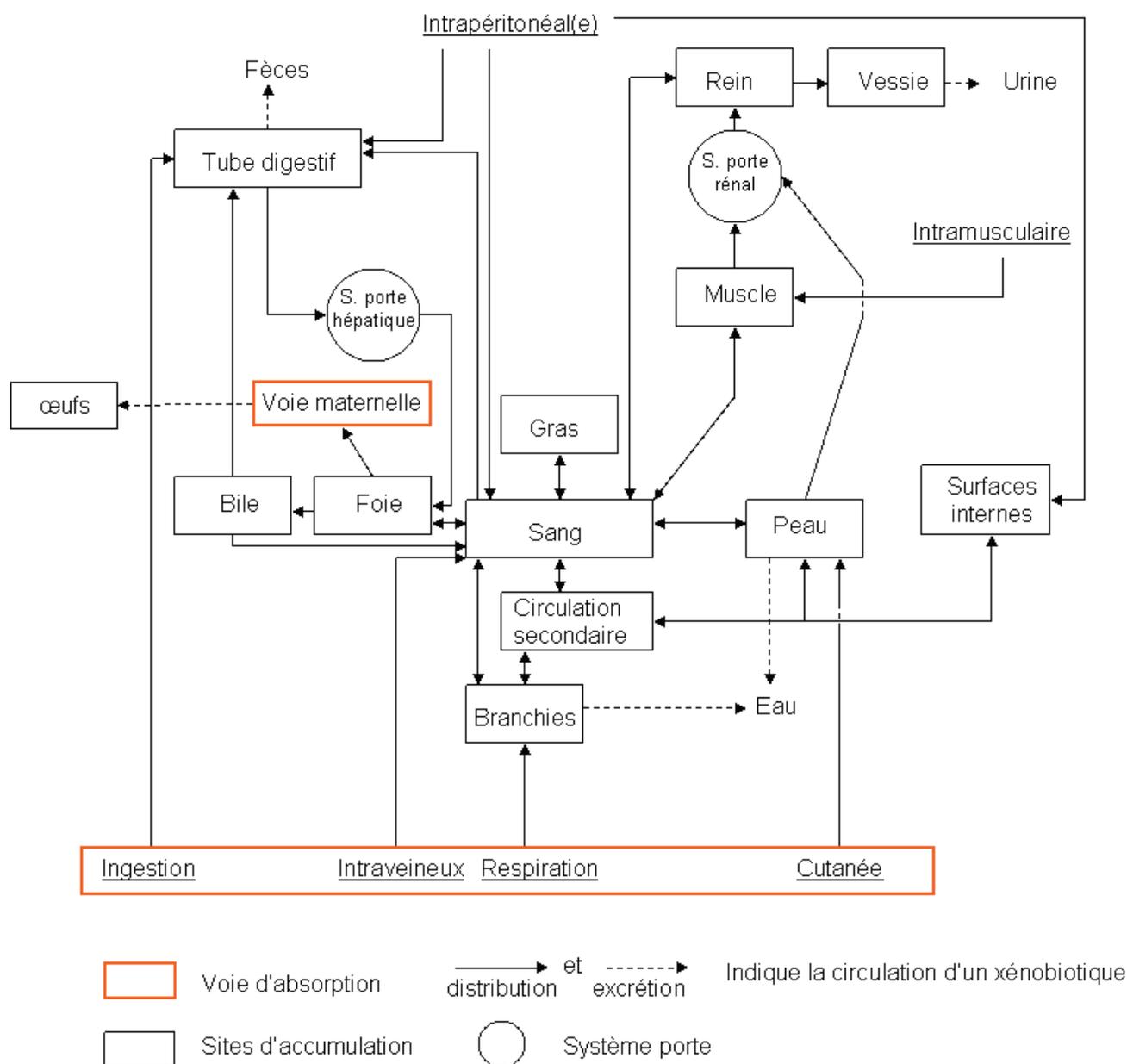


Figure 6 : Voie d'absorption, de distribution et d'élimination des toxiques chez les poissons

Les voies d'absorption (ingestion, respiration, cutanée et maternelle) sont encadrées en orange et les sites d'accumulation (organes potentiels d'accumulation des xénobiotiques) sont encadrés en noir, les flèches indiquent le chemin de circulation d'un xénobiotique chez les téléostéens (modifié d'après The Toxicology of Fish).

3.1 La voie alimentaire : structure et fonction de l'appareil digestif

Dans ce paragraphe, l'accent est mis sur le tube digestif, où se déroule l'absorption, et sur le foie, qui est impliqué dans les processus de détoxification.

3.1.1 Système digestif

L'organisation du système digestif du poisson zèbre est proche de celle des autres poissons (Pack *et al.*, 1996). Après une bouche dépourvue de dents, on trouve un œsophage court puis un intestin en deux parties ainsi que le foie, une vésicule biliaire et un pancréas sous forme d'îlots diffus (Wallace & Pack, 2003; Figure 7).

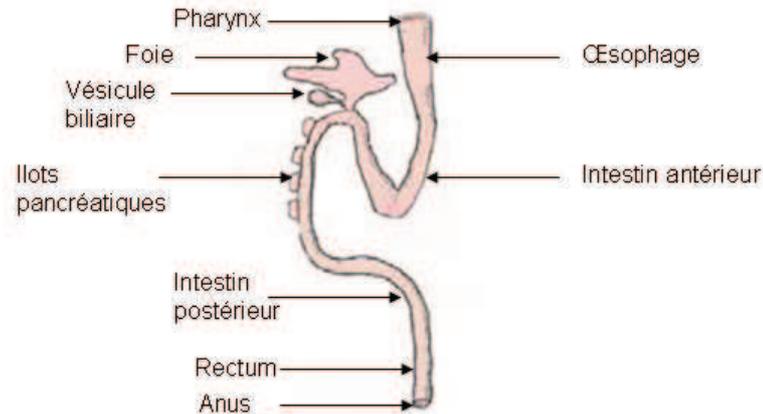


Figure 7 : Système digestif du poisson zèbre

3.1.2 Fonction du tube digestif

Il est caractérisé par une grande surface d'absorption qui favorise l'entrée des xénobiotiques vers la circulation sanguine. Au niveau de l'épithélium intestinal, plusieurs types de cellules sont présents : les entérocytes, responsables de l'absorption des nutriments et des xénobiotiques, les cellules à mucus et les cellules endocrines. Chez les téléostéens, l'intestin antérieur (Figure 7) est le site principal de l'absorption des lipides (Honkanen *et al.*, 1985).

La durée du transit du bol alimentaire est d'environ 24 h, le contact entre la nourriture ingérée et système digestif est donc relativement long. Les acides et enzymes sécrétés par l'intestin transforment la nourriture en liquide, rendant ainsi les contaminants (comme les nutriments) plus disponibles dans l'intestin. Après digestion, les PCB lipophiles adhèrent aux micelles de lipides qui sont ensuite absorbés par la surface intestinale antérieure. Les métaux qui ont une grande affinité avec les protéines, forment des complexes avec les acides aminés et les petits peptides. Ces xénobiotiques (PCB, métaux...) traversent le tube digestif par diffusion ou par pinocytose, grâce aux entérocytes de la partie postérieure de l'intestin (McLean & Donaldson, 1990). La température, le nombre de repas, la quantité et la qualité de nourriture ingérée influent sur l'effet des contaminants et leur accumulation au sein de l'organisme (Hoffman *et al.*, 1996).

3.1.3 Fonction du foie

Chez le poisson zèbre, le foie est formé de deux lobes (Sadler *et al.*, 2007). Les cellules hépatiques sont arrangées en forme de tubules ; les parties apicales des cellules hépatiques sont dirigées vers le centre du tubule (Figure 8). Les hépatocytes contiennent plusieurs types de protéines de transport membranaire qui servent à transporter les molécules du sang vers la bile (Curtis *et al.*, 2000 ; Kleinow *et al.*, 2000).

Le foie est irrigué directement par la veine hépatique et reçoit donc le flux sanguin contenant les différentes substances assimilées par l'intestin, dont les xénobiotiques. Le foie est impliqué dans le métabolisme, le stockage et la redistribution des nutriments et autres molécules. Il joue un rôle majeur dans les processus de résistance à la contamination. En effet, il est le siège (avec les reins et, dans une moindre mesure, le tube digestif) de la métabolisation des composés toxiques pour l'organisme (voir Chapitre 1, section 3.3, p.19). Les composés métabolisés sont ensuite éliminés directement par la bile ou par les reins.

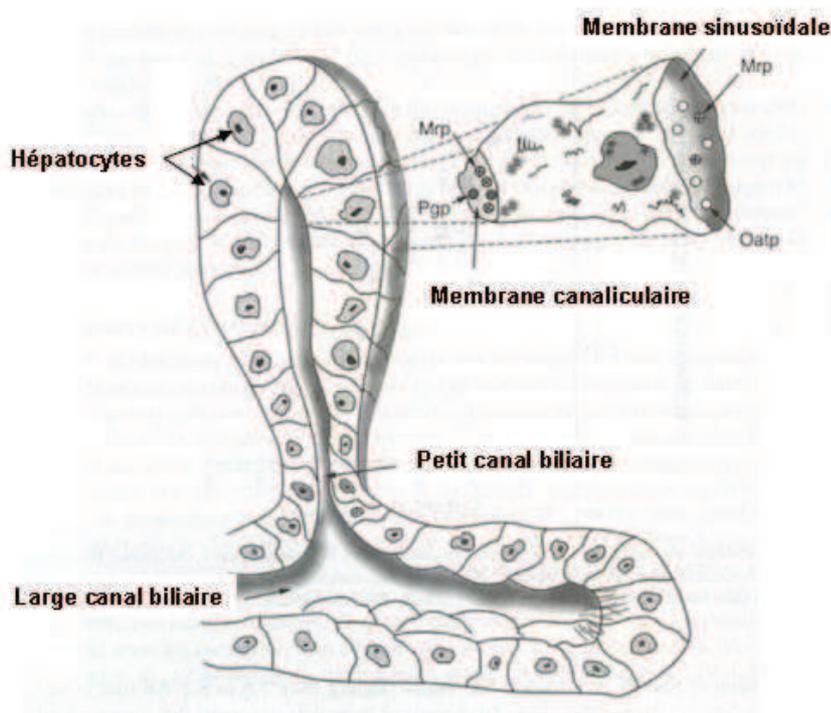


Figure 8 : Tubule hépatique chez le poisson

3.2 Voie cutanée : structure de la peau du poisson

La peau du poisson a plusieurs fonctions : elle joue un rôle de barrière mécanique vis-à-vis du milieu extérieur et elle participe au maintien de l'intégrité osmotique et à la respiration. La peau est un organe essentiel, qui constitue 10% du poids total du poisson (Giulio & Hinton, 2008).

La peau de l'embryon (vers 24 hpf) est composée d'épiderme (Kimmel *et al.*, 1990 ; 1995). A cet âge, des échanges ioniques sont déjà mis en évidence, chez le poisson zèbre. Plusieurs types de cellules (ex. les cellules NCC transporteur Na⁺ et Cl⁻) assurent l'échange entre les milieux interne et externe au niveau de l'épiderme (Hwang, 2009). Par ailleurs, avant l'ouverture de la bouche, l'oxygénation de l'organisme est exclusivement réalisée par la peau (Fu *et al.*, 2010). Par la suite, la peau s'épaissit et l'échange ionique puis la respiration sont assurés par les branchies (Rombough, 1988 ; Rombough & Moroz, 1997 ; Rombough, 2002 ; Fu *et al.*, 2010).

La contamination au PCB *via* la peau est le mode de contamination principale chez les embryons, les larves et les petits poissons adultes comme le médaka (*Oryzias latipes*) et *Pimephales promelas*. Cette observation a conduit les auteurs à proposer l'hypothèse selon laquelle plus le poisson est petit plus la voie cutanée est sollicitée (Lien & McKim, 1993).

3.3 Métabolisation des xénobiotiques

3.3.1 Généralités

Les xénobiotiques comme les POP (PCB et HAP) sont des molécules étrangères à l'organisme et sont reconnues comme telles par les systèmes de défense après leur pénétration. Certains PCB et HAP provoquent des réactions immunitaires chez l'être humain, les rongeurs et les poissons (Neale *et al.*, 2005 et Duffy-Whritenour *et al.*, 2010). Si les xénobiotiques ne peuvent pas être directement excrétés, l'organisme cherchera à les transformer pour que leur élimination soit facilitée. Pour cela, les molécules subissent des transformations, catalysées par plusieurs systèmes enzymatiques capables de prendre en charge des substrats de natures variées (Finn, 2007) : c'est la métabolisation des xénobiotiques dont l'objectif est de rendre les composés hydrosolubles et facilement excrétables (Figure 9).

En fonction de la nature chimique du xénobiotique, il sera métabolisé par les enzymes de Phase I, de Phase II ou les deux. Cependant, de nombreux polluants ont été créés récemment par l'Homme et les systèmes de défense des organismes ne sont pas toujours adaptés pour les éliminer (Lagadic, 1997). C'est ainsi que parfois, la métabolisation des xénobiotiques peut

Phase II : ou phase conjugaison (glucoronidation, sulfonation, méthylation ou acétylation) ces réactions conduit à la liaison d'une substance hydrophile endogène avec un groupe polaire de la molécule (Stoilov *et al.*, 2001). Cette phase elle a lieu soit à la suite de la phase I, soit directement sur les molécules à groupements polaires. En effet, le groupe introduit dans la phase I n'est pas toujours nécessaire aux réactions de biotransformation (Ramade, 1992). Ces réactions de phase II vont aboutir à la formation de métabolites polaires plus hydrosolubles que la molécule initiale, et donc plus faciles à éliminer par la bile ou l'urine (Omiecinski *et al.*, 2010).

3.3.2 Voie de métabolisation et rôle du AhR

L'organe majeur de métabolisation des xénobiotiques est le foie, et dans une moindre mesure les reins, les intestins et la peau. Dans ces tissus, les xénobiotiques vont activer des voies de métabolisation spécifiques. Avant l'identification des réseaux de gènes impliqués dans la régulation de ces voies métaboliques, elles étaient définies selon le nom de deux molécules prototypes : la voie phénobarbital (PB) et la voie 3-méthylcholanthrène (3-MC). On connaît maintenant les mécanismes sous-jacents à l'activation de ces voies.

La voie PB implique plusieurs récepteurs nucléaires : le Constitutive Androstane Receptor (CAR) et le Pregnane X Receptor (PXR). Le PB se lie au PXR et/ou au CAR qui vont former des hétérodimères avec le Rétinoïque X Receptor (RXR) et activer l'expression de gènes cibles tels que *Cyp2b* et *Cyp3a*.

Le 3-MC est un HAP ayant une grande affinité pour le récepteur AhR (*aryl hydrocarbone receptor*). L'AhR est un facteur de transcription de la famille bHLH, normalement inactif. La liaison du ligand va entraîner la translocation du AhR dans le noyau, où il se dimérisera avec le facteur ARNT, pour aller activer l'expression de gènes cibles, dont les membres de la famille des cytochromes P450 1 jusqu'à 4 (Incardona *et al.*, 2005 ; Schwarz & Appel, 2005 ; Pocar *et al.*, 2006 ; Figure 10). Actuellement, la séquence du récepteur AhR est identifiée chez une dizaine d'espèces de poissons (Hahn & Karchner, 1995 ; Finn, 2007 ; Zhou *et al.*, 2010).

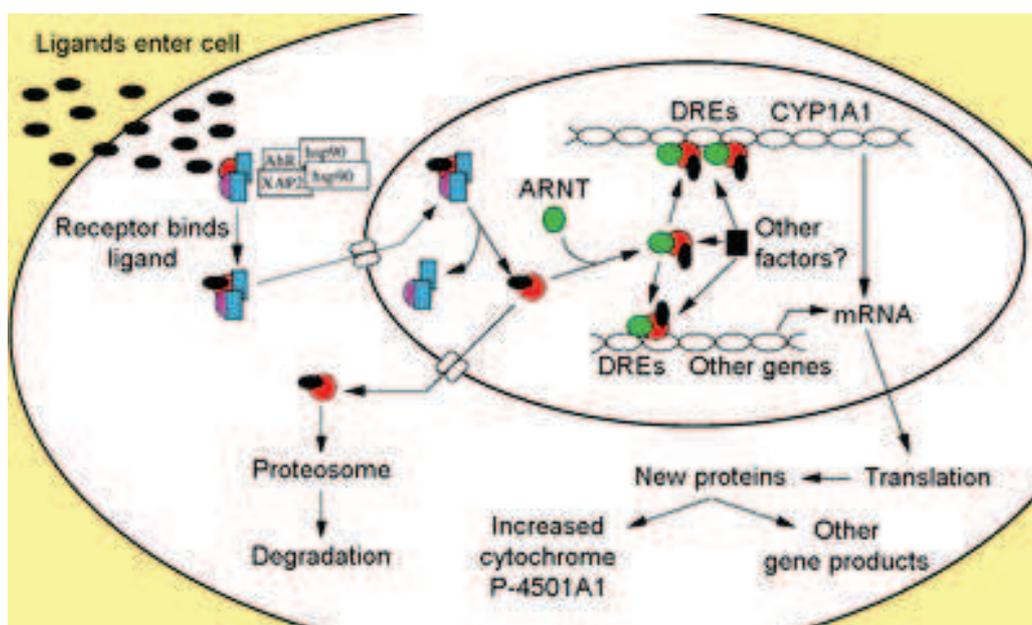


Figure 10 : Mécanisme d'induction du cytochrome P450
(Denison et Nagy, 2003)

La métabolisation des POP par l'une ou l'autre de ces voies dépend de leurs propriétés structurales (Tableau 4). Ainsi, les PCB peuvent être métabolisés par ces deux voies en fonction de leur structure. Les HAP possédant 4 à 5 cycles peuvent être métabolisés par la voie 3-MC. La voie de métabolisation des HAP possédant moins de 4 cycles est encore inconnue.

Une des conséquences de l'utilisation d'un nombre restreint de voies de métabolisation est d'utiliser les mêmes protéines régulatrices et donc d'activer l'expression des mêmes gènes. C'est ainsi que des polluants distincts activant la voie 3-MC ou AhR, tels que les dioxines, certains PCB et certains HAP, vont entraîner l'apparition des mêmes phénotypes sur les embryons ou les adultes de poissons (Teraoka *et al.*, 2003 ; Lee & Anderson, 2005 ; Carney *et al.*, 2008).

Tableau 4 : Récapitulatif de la toxicité de PCB et HAP
(McFarland & Clarke, 1989 ; Incardona *et al.*, 2005 ; Kodavanti, 2005 ; Sable *et al.*, 2006).

<i>Congénères</i>	<i>Voie de métabolisation</i>	<i>Structure</i>	<i>Mécanismes d'action et toxicité (poissons)</i>
"Dioxin-like" (CB-77, CB-126, CB-169)	3-MC	Coplanaire	Grande affinité pour le AhR et toxicité élevée ; effets sur la survie, la croissance et la reproduction
Mono-ortho substitué Aussi considéré des "dioxin-like" (Ex : CB-105 et CB-118)	Mixte (3-MC et PB)	Moins coplanaire	Grande affinité avec le AhR mais toxicité moins forte que les "dioxin-like" non orthosubstituées ; effets sur la reproduction et le système nerveux.
Di-ortho substitué et plus (Ex : CB-138 et CB-153)	Mixte	Non coplanaire	Faible affinité avec AhR et faible toxicité
Autres CB (Ex : CB-190 et CB-152)	PB	Non coplanaire	Très faible
Autres CB	Très faible ou absence de métabolisation	Non coplanaire	Absence de toxicité
HAP < à 4 cycles	Inconnue	-	Mécanisme inconnu ; effet narcotique (réversible à faible dose) Effet sur le système cardiaque
HAP > à 4 cycles	Plusieurs voies dont celle de l'AhR	-	Toxicité dépendante de sa structure ; effets irréversibles et narcotique : génotoxiques, cancérigènes, cardiaques et immunotoxique.

L'activité de l'enzyme éthoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) associée au Cyp1A1 est un indicateur très utilisé pour quantifier la toxicité de certains HAP et PCB ; car l'induction de ce cytochrome est impliquée dans la carcinogénèse chimique liée à la catalyse de la liaison covalente de contaminants organiques à un brin d'ADN conduisant à la formation d'adduits d'ADN. (Sarkar *et al.*, 2006). Cette activité permet de mettre en évidence l'induction du récepteur AhR et la métabolisation de certains HAP par le cytochrome P450. Les HAP ayant plus de 4 cycles aromatiques sont des forts inducteurs de l'EROD, tandis que les HAP ayant un nombre de cycles inférieur à 4 n'induisent pas cette activité (Tableau 5).

Tableau 5 : Mise en évidence de l'induction ou de la non-induction du cytochrome P4501A chez le poisson d'après Van Der Weiden *et al.*, 1994 ; Bols *et al.*, 1999 ; Fent & Bättscher, 2000 ; Barron *et al.* ; Lee & Anderson, 2005 ; Parente *et al.*, 2009.

<i>Congénères de HAP</i>	<i>Induction relative</i>	<i>Nombre de cycles</i>
Benzo[a]pyrène	Très élevée	5
7,12 diméthylbenz[a]anthracène	Très élevée	4
Pyrène	Très faible	4
Fluoranthène	Très faible	4
Phénanthrène	Nulle	3

4 Effet des polluants (PCB et HAP) sur les poissons

La toxicité des polluants dépend de leurs propriétés physico-chimiques. Cela se vérifie au niveau de l'intensité des effets mais également au niveau qualitatif (organes ou fonctions affectées). Les polluants provoquent de nombreux effets sur les organismes exposés, parmi lesquels l'altération de l'osmo-régulation et de l'iono-régulation, de la croissance, de la nutrition, de la fonction immunitaire, du système endocrinien, de la reproduction, du développement et de l'intégrité génétique (Lawrence & Hemingway, 2003).

Contrairement aux PCB, les HAP sont rapidement métabolisés par les cytochromes P450 ; ces POP produisent des métabolites toxiques. Ainsi par exemple, le DMBA produit des métabolites très génotoxiques formant des adduits à l'ADN (Jönsson *et al.*, 2009).

4.1 Répartition de l'énergie au sein d'un organisme - altération par les polluants

L'énergie acquise par un animal, *via* sa nourriture, est utilisée pour la maintenance de l'organisme (métabolisme basal, maintien de l'intégrité des structures), la croissance somatique et la reproduction. Dans le cas de la théorie DEB (Dynamic Energy Budget), les relations entre ces différents postes sont modélisées (Kooijman & Kooijman, 2009). L'énergie allouée à la maintenance est répartie entre les compartiments somatique et reproducteur et les parts d'énergie allouées au développement et à la maturation de chacun de ces 2 compartiments sont liées l'une à l'autre (Figure 11).

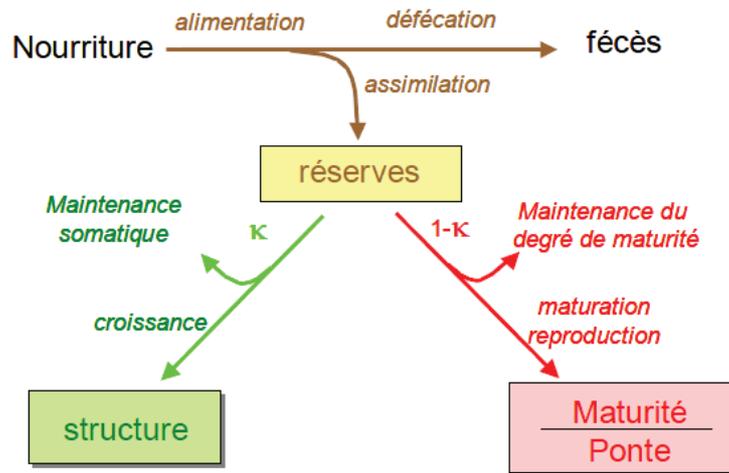


Figure 11 : Modèle dynamique du bilan énergétique

De l'énergie stockée dans les réserves, K est allouée à la croissance et à la maintenance somatique, $1-K$ à la reproduction et à la maintenance de la maturité (Zonneveld & Kooijman, 1993 ; Einarsson *et al.*, 2011 et Augustine *et al.*, 2011).

Une fois calibrée et validée, la modélisation peut être utilisée à différents niveaux. Elle permet de tester le coût d'une exposition à des polluants en termes de croissance et de reproduction, et éventuellement les déséquilibres dans la répartition énergétique entre ces deux compartiments. Une des conséquences de cet aspect intégrateur est une relative généralité des résultats obtenus qui peut faciliter le transfert d'une espèce à une autre. Enfin, le modèle DEB permet également d'établir des liens entre différents niveaux biologiques et donc d'envisager les effets d'un polluant sur les populations.

Avant d'appréhender les effets des contaminants sur la physiologie d'un organisme à travers des fonctions comme la croissance et la reproduction, il est nécessaire de calibrer et valider un modèle de croissance en condition optimale non perturbante. Pour cela, il est indispensable de collecter des données sur les variables de croissance et de reproduction dans différentes conditions. Dans le cas des polluants organiques tels que les PCB ou les HAP, ces deux processus sont affectés.

4.2 Croissance

4.2.1 Stratégie de croissance

Chez les poissons, la croissance post-larvaire est un phénomène continu extrêmement dépendant des conditions du milieu, en particulier la température, la disponibilité en nourriture et la densité des poissons. Le comportement et/ou les performances individuelles jouent également un rôle majeur dans le contrôle de la croissance. En conséquence de quoi l'âge ne peut être considéré comme un bon prédicteur des caractéristiques morphologiques et notamment de la taille car une espèce donnée n'a pas toujours la même taille au même âge. *A contrario*, il existe une relation forte entre les caractéristiques morphologiques et/ou les stades de développement/maturation et la taille (Parichy *et al.*, 2009).

La maturité sexuelle d'un poisson est déterminée par l'âge. Néanmoins, il semble y avoir une certaine plasticité de l'âge et de la taille à la maturité sexuelle en réponse aux conditions environnementales, et en particulier à la disponibilité en nourriture. Il a été établi qu'une croissance rapide favorise une maturation plus précoce à la fois en termes de taille et d'âge (Taranger *et al.*, 2010).

4.2.2 Les effets de la pollution sur la croissance

La pollution peut toucher plusieurs stades de la croissance. Waring *et al.*, (1996), ont montré que le poids des larves exposées aux effluents industriels est inférieur à celui des larves contrôles, mais que leur vitellus est plus grand, ce qui suggère un retard de développement. Plusieurs études décrivent des effets qui diffèrent selon le polluant. Par exemple, les pentachlorophénols ont tendance à augmenter la durée du stade larvaire alors que une autre étude indique que le B[a]P donne des larves plus petites sans changer l'âge de l'éclosion (Lawrence & Poulter, 2001).

Des études réalisées sur des juvéniles ou des adultes ont montré que les PCB peuvent également avoir un effet sur la croissance même si les résultats restent contrastés. Ainsi, une exposition à des PCB réduit la croissance chez l'anguille (*Anguilla anguilla*) et chez les larves de *Micropogonias undulatus* (McCarthy *et al.*, 2003 ; van Ginneken *et al.*, 2009). Cependant, dans une autre étude, seules quatre des six espèces de poisson étudiées présentent une corrélation entre la contamination aux PCB et la croissance (Ripley & Foran, 2009).

Actuellement, plusieurs études conduites sur des femelles de poisson zèbre exposées par voie trophique à des mélanges de POP (PCB, PBDE et DDT) à des doses environnementales extraites du foie de la lotte (*Lota lota*) de la Norvège pendant 5 mois. Ces études ont démontré que ces mélanges provoquaient une obésité des femelles de la première génération puis une perte significative du poids chez les générations suivantes. Ces mêmes études ont décrit une perturbation de la mise en place de la puberté, un *sex-ratio* déséquilibré et une diminution de la survie des poissons pendant deux générations (Nourizadeh-Lillabadi *et al.*, 2009). Ces perturbations ont été reliées à des modifications d'expression génique liées au système endocrinien (hormones thyroïdiens), à la croissance et à la signalisation de l'insuline (Nourizadeh-Lillabadi *et al.*, 2009 ; Lyche *et al.*, 2010 ; Berg *et al.*, 2011 ; Lyche *et al.*, 2011).

4.3 Perturbation du système endocrinien :

Les hormones sont sécrétées par les glandes endocrines comme les gonades, l'hypothalamus, ou encore la glande pituitaire. Les cellules cibles expriment des récepteurs spécifiques à ces hormones (Figure 12-A). En fonction de l'hormone et donc du récepteur, les mécanismes précis peuvent varier, cependant, en règle générale, la présence de l'hormone va entraîner la liaison du récepteur en oligomère sur ses éléments de réponses et activer la transcription des gènes cibles (Figure 12-B). Ainsi, les œstrogènes naturelles (17β -œstradiol, œstrone...) et leurs analogues (ex : 17α - ethinylœstradiol...) sont des ligands des récepteurs des œstrogènes (RE).

D'autres molécules peuvent interagir avec ces mécanismes. Plusieurs termes désignent les xénobiotiques qui miment partiellement ou totalement l'œstrogène : xœstrogène, perturbateur endocrinien, phytoœstrogène (Lawrence & Hemingway, 2003). Ils peuvent bloquer ou empêcher la liaison de l'hormone naturel et donc perturber la signalisation cellulaire (Figure 12-C), ou agoniste et donc mimer la présence de l'hormone activant les gènes cibles hors contexte ou de façon excessive (Figure 12-D). Le système endocrinien peut être perturbé par l'altération de la production des hormones naturelles ou la non production et aussi par la modification et/ou le fonctionnement des récepteurs hormonaux. Ces différents mécanismes peuvent affecter le fonctionnement normal du système endocrinien, produisant ainsi des effets sur la physiologie des organismes et en particulier la reproduction.

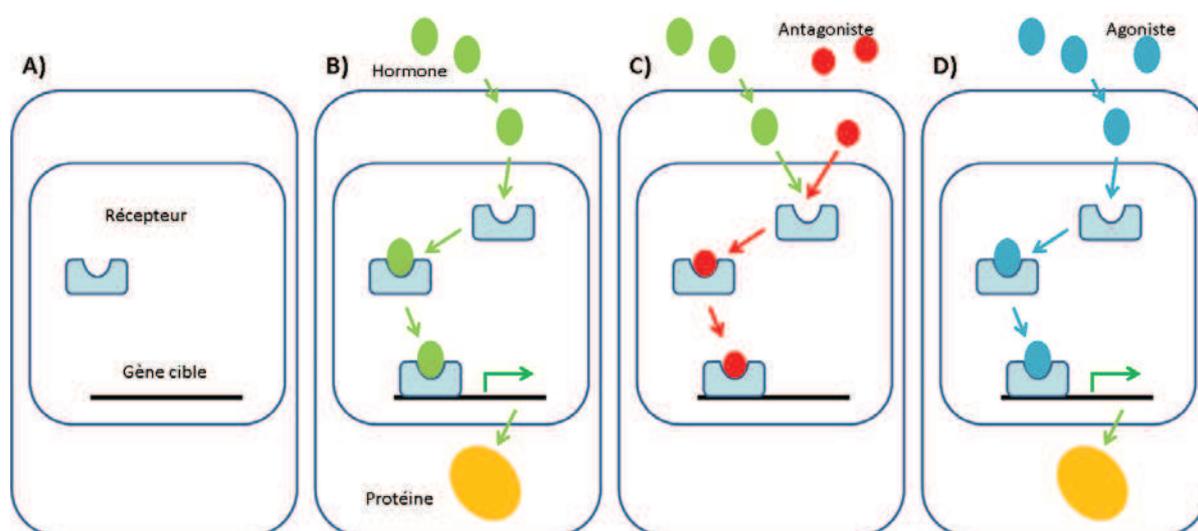


Figure 12 : Schéma général du principe de perturbation endocrinienne

A- Récepteur et gène cible dans une cellule. B- En situation normale, l'hormone se lie à son récepteur et active la transcription du gène cible et la traduction des protéines. C- Les antagonistes vont bloquer l'action de l'hormone naturelle. D- Les agonistes vont mimer l'action de l'hormone et activer le récepteur à des moments inadéquats.

Les effets œstrogéniques et antiœstrogéniques des xénobiotiques chez les poissons sont régulés par l'interaction des ligands et les récepteurs des œstrogènes (ER).

L'hypothalamus est sensible à l'environnement qui l'entoure (température, photopériode, saisons...) ; celui-ci va sécréter des hormones et stimuler la glande pituitaire qui, à son tour, va sécréter des gonadotrophines (FSH et LH). En conditions normales, les ovaires produisent de l'œstradiol (E_2), en réponse à la FSH et LH (Lawrence & Hemingway, 2003).

La vitellogénèse et la zonagénèse sont régulées par l'œstradiol-17 β (E_2) qui se fixe au niveau du foie et synthétise les protéines précurseurs des réserves vitellines : la vitellogénine (Vtg) et les protéines zona radiata (Zrp) qui forment le chorion (Figure 13). Ces deux protéines sont sécrétées et transportées dans le sang vers l'ovaire (Wallace & Selman, 1981).

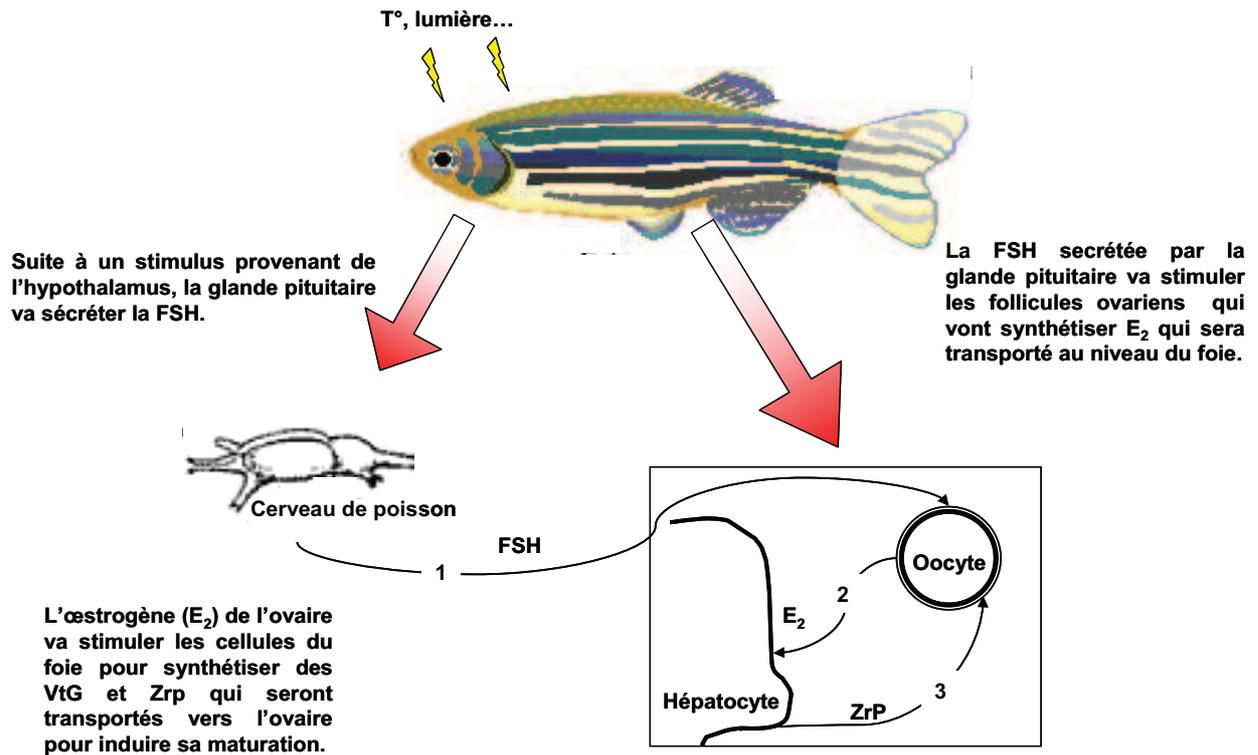


Figure 13 : Contrôle central de la synthèse de la Vtg et de la Zrp chez le poisson

Des poissons exposés aux xénœstrogènes vont avoir un taux élevé de Vtg dans le plasma et un développement ovarien réduit (Anderson *et al.*, 1996). Des études ont montré que les xénobiotiques pouvaient avoir un effet anti-oestrogénique et diminuer la synthèse de Vtg (Anderson *et al.*, 1996). Ces altérations peuvent avoir des effets sur la maturation des ovocytes et/ou la qualité des œufs et donc la capacité de l'embryon à se développer (Brion *et al.*, 2004 ; Nash *et al.*, 2004).

De plus, des effets féminisants peuvent se produire avec des anti-androgènes par l'inhibition de l'action des hormones androgéniques au niveau de leurs récepteurs (Kelce *et al.*, 1996 ; Allner *et al.*, 2010). Cela suggère qu'un même produit chimique ou métabolite peut influencer le système endocrinien de différentes façons. Pour cela, il faut comprendre le mécanisme d'action de ces polluants perturbateurs pour mieux comprendre le fonctionnement normal du système. Certains PCB comme les PCB planaires ont un effet anti-œstrogénique, d'autres ont des effets œstrogéniques, ces effets sont aussi liés au nombre de chlores dans une molécule de PCB (Plísková *et al.*, 2005).

La perturbation du système endocrinien (hormones thyroïdiennes et gonadiques) va engendrer un désordre dans le système de reproduction. Ceci a en particulier été mis en évidence pour

les composés "dioxin-like" coplanaires tels que les CB-126 ou CB-77 ainsi que pour les mélanges techniques dans lesquels ils sont abondants, tels que l'Aroclor 1254 ou le Kaneclor 400. Ces composés ou mélanges provoquent des anomalies aux niveaux des ovaires et des testicules chez le médaka (*Oryzias latipes*), le *Micropogonias undulatus*, le tilapia du Mozambique (*Oreochromis mossambicus*) ou le poisson zèbre (Örn *et al.*, 1998 ; Coimbra & Reis-Henriques, 2005 ; Khan & Thomas, 2006 ; Coimbra & Reis-Henriques, 2007 ; Nakayama *et al.*, *In press*).

De nombreuses études sur les effets des PCB et des mélanges industriels (Aroclor) sur les poissons ont été effectuées et ont démontré des modifications des taux d'hormones thyroïdiennes (T4 et T3), et donc une perturbation du système endocrinien, notamment chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), la barbotte brune (*Ameiurus nebulosus*), le médaka (*Oryzias latipes*) et des juvéniles de truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (Buckman *et al.*, 2007 ; Schnitzler *et al.*, 2008 ; Iwanowicz *et al.*, 2009 ; Brar *et al.*, 2010 ; Yum *et al.*, 2010).

4.4 Effet sur la reproduction

4.4.1 Altération/modification du taux de fécondation

Pour comprendre les effets qui mènent à l'altération d'un taux de fécondation, il faut tout d'abord connaître les stratégies de reproduction des espèces et les contraintes environnementales qui les entourent.

Deux stratégies de reproduction existent pour les différentes espèces :

- Stratégie r, qui est basée sur la production d'un grand nombre de jeunes, le plus tôt possible, et une mortalité très élevée. C'est une adaptation aux milieux instables et imprévisibles (adoptée par les bactéries, les insectes, les petits rongeurs et certains poissons).
- Stratégie K, basée sur une durée de vie très longue et une reproduction rare et tardive (chez les humains, certains oiseaux, certains poissons : les baleines et les chondrichthyens ...)

Chez certaines espèces de poisson, comme le poisson zèbre, qui adoptent la stratégie r, une énorme quantité de gamètes est émise mais, dans le milieu naturel, le taux de fécondation et la survie restent faibles par rapport au nombre d'œufs initial. Cela est représentatif au milieu, le

poisson zèbre en laboratoire dans des conditions contrôlées présentent des taux de fécondations élevés.

Des études sur des poissons d'eau douce tels que la perche (*Perca fluviatilis*), la carpe chinoise (*Ctenopharyngodon idella*) et l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) contaminés dans des bassins naturels indiquent que des polluants comme le Sélénium, ont un effet sur la fécondation (Crane *et al.*, 1992). Autres travaux indiquent aussi que des sédiments ou de la nourriture contenant des PCB et des HAP peuvent affecter le taux de fécondation ; c'est le cas chez la sole *Parophrys vetulus* (Casillas *et al.*, 1991), chez les salmonidés (Letcher *et al.*, 2010) et chez le poisson zèbre (Örn *et al.*, 1998). Kime (1995] a démontré que la motilité des spermatozoïdes diminue chez le poisson-chat après une contamination avec des polluants (métaux lourds et HAP), à des doses environnementales. Du fait de cette réduction de motilité ou d'une altération des propriétés du sperme, il se peut que les spermatozoïdes n'atteignent pas les œufs, réduisant ainsi le succès de la fécondation (Richthoff *et al.*, 2003 ; Njiwa *et al.*, 2004).

4.4.2 Atrésie folliculaire :

On désigne par atrésie folliculaire la diminution ou l'atrophie de follicules de tous les stades de développement ovarien, l'atrésie est assurés par des mécanismes d'apoptose (Andreu-Vieyra & Habibi, 2000). Les poissons peuvent développer une atrésie folliculaire suite à plusieurs facteurs comme un apport nutritionnel insuffisant ou un environnement non propice. Cela peut arriver à n'importe quel moment du développement des follicules ovariens et affecter le nombre final des oocytes et donc la fécondité.

La pollution peut augmenter l'atrésie folliculaire chez les poissons, comme cela a été mis en évidence sur des plies rouges (*Pseudopleuronectes americanus*) pêchées sur les côtes des États-Unis, avec une réduction de la masse des œufs et une augmentation d'atrésie folliculaire chez les poissons provenant de zones contaminées par des PCB (Cross & Jo Ellen, 1988 ; Johnson *et al.*, 1994), ainsi que chez le poisson zèbre nourri avec des PCB (Örn *et al.*, 1998). Ces observations démontrent l'implication des POP à la probabilité d'augmenter l'incidence de l'atrésie folliculaire.

4.4.3 Altération du sex-ratio

L'altération du sex-ratio se fait uniquement au début du stade larvaire où le sexe n'est pas encore spécifié pour l'individu. Chez le poisson zèbre la différenciation du sexe se fait après l'âge de 21-28 jours après fécondation jusqu'à 40 jours après fécondation, avant cette période toutes les larves développent des gonades "ovary-like" puis avec des mécanismes génétique inconnue on a formation des testicules et des ovaires (Takahashi, 1977 ; Brion *et al.*, 2004). L'altération se fait non sur des adultes ou des juvéniles où le sexe est déjà déterminé. Une perturbation du système endocrinien (par les œstrogènes, les androgènes) pendant la période de développement des gonades peut avoir des conséquences sur le *sex-ratio* (Sumpter & Jobling, 1995 ; Larsson *et al.*, 2000 ; Nourizadeh-Lillabadi *et al.*, 2009).

4.4.4 Intersex : changement ou inversion de sexe

Chez des poissons juvéniles et adultes (le sexe est déjà différencié anatomiquement) contaminés par des xénobiotiques ayant des effets œstrogéniques, on peut observer un changement de sexe qui peut se faire de deux façons différentes :

- Les gonades d'un poisson mâle se transforment en ovo-testicules (féminisation partielle des testicules).
- Les ovaires d'un poisson femelle se transforment en testicules.
- Un testicule se transforme en ovaire et l'autre reste normal (Örn *et al.*, 2003).

Néanmoins, la mise en place de ces systèmes est encore inconnue. La formation d'un ovo-testicule peut être induite par des contaminants à effet œstrogénique faible (Gray & Metcalfe, 1997). Allen *et al.* (1999 ; 1999), ont démontré que ce phénomène peut être observé chez 20 à 100 % des individus d'une population de poissons présents dans des estuaires contaminés par des xœstrogènes.

4.4.5 Réduction du recrutement au niveau de la population

Malgré tous les effets causés par l'exposition des poissons à des xénobiotiques, une relation directe entre toxicité individuelle (déjà démontrée) et toxicité au niveau populationnel est difficile à établir, mais a cependant déjà été observée dans le milieu naturel chez *Salmo trutta* (Kubecka & Matena, 1991), *Cottus gobio* (Bagge & Hakkari, 1992), *Oncorhynchus mykiss* (Hesthagen *et al.*, 1995) et *Morone saxatilis* (Weisberg *et al.*, 1996).

La difficulté à observer ces effets sur la population dans le milieu réside dans le fait que de multiples facteurs peuvent venir perturber l'interprétation des résultats. C'est en particulier le

cas des facteurs dépendants de la densité, qui peuvent avoir des effets confondants en conduisant, par exemple, à l'accroissement de la nourriture disponible ou à la diminution de la compétition pour des frayères. Ainsi, malgré une réduction de 30 % de la production totale des œufs produits par la sole commune (*Solea solea*), aucun effet sur l'état des stocks n'a été observé au Etats-Unis alors qu'en France au niveau de la Manche on a pu mettre en évidence la diminution des effectifs des stocks (Landahl *et al.*, 1997).

4.5 Anomalies durant les stades embryonnaires et larvaires

Outre les altérations de développement liées à la qualité des œufs ou à des défauts dans le dépôt des ARNm maternels, qui sont des conséquences de l'exposition de la mère, les embryons peuvent être contaminés par l'intermédiaire des réserves vitellines transmises par la mère, ou directement par l'eau pour les composés hydrosolubles ou par contact avec une matrice contaminée.

Il est clairement accepté que les embryons et les larves sont plus sensibles à la contamination et aux changements environnementaux que les adultes. En effet, pendant leur développement embryonnaire, avant l'apparition de la peau, leur protection mécanique n'est assurée que par le chorion. La perméabilité du chorion varie selon les espèces, mais, en règle générale, il apparaît que le chorion est plutôt perméable aux composés organiques lipophiles. En outre, les mécanismes de défense et/ou de métabolisation ne sont pas encore actifs et leur capacité d'évitement est nulle (embryon) ou faible (larve éclos). Finalement, s'agissant d'organisme en construction, toute modification de leur environnement est susceptible d'altérer les processus de développement et que un retard de développement n'est pas systématiquement rattrapé et si c'est beaucoup cela va induire des malformations au niveau de l'embryon. Signalons à cet égard que plusieurs récepteurs dont l'AhR (pour les HAP de plus que 4 cycles et d'autre(s) récepteur(s) non identifier encore pour les HAP inférieurs à 4 cycles) sont impliqués dans le contrôle de plusieurs processus développementaux (Carney *et al.*, 2006). Ceci explique les similitudes d'effets, sur les stades embryo-larvaires, des polluants qui ciblent les cibles, définis sous le terme de syndrome du sac bleu (« blue sac disease » ; BSD ; Carney *et al.*, 2006).

Le BSD inclut de nombreux phénotypes touchant à la fois la structure et le fonctionnement du cœur, du système cardio-vasculaire et sanguin, la formation du cerveau, le développement des cartilages et les processus d'osmo-régulation. Ces symptômes ont été mis en évidence chez de nombreuses espèces de poissons (Wassenberg *et al.*, 2002 ; Incardona *et al.*, 2004 ; Incardona

et al., 2005 ; Billiard *et al.*, 2006 ; Farwell *et al.*, 2006 ; Carls *et al.*, 2008 ; Matson *et al.*, 2008 ; Incardona *et al.*, 2009 ; Timme-Laragy *et al.*, 2009 ; Carls & Thedinga, 2010).

4.6 Génotoxicité et tumorigénèse

Lors de leur métabolisation, certains POP et en particulier les HAP, génèrent des métabolites électrophiles capables de se lier à l'ADN. La formation de ces adduits à l'ADN est susceptible de modifier les propriétés de l'ADN. Les métabolites peuvent également générer des espèces réactives de l'oxygène, qui à leur tour peuvent entraîner des cassures simple brins ou double brins, ainsi que des modifications au niveau des purines ou pyrimidines ou du désoxyribose (Klaunig & Kamendulis, 2004). Ces altérations définissent le caractère génotoxique de ces composés (Chen & White, 2004). Les processus de réparation de l'ADN sont normalement capables de palier à ces altérations ; néanmoins, en cas de défaut de réparation, la formation de ces dommages génotoxiques peut jouer un rôle dans la phase d'initiation du processus de cancérogénèse. Les différents types d'altérations physiques de l'ADN peuvent être mis en évidence et quantifiés par plusieurs techniques, telles que le test des comètes ou la recherche de micronoyaux (Akcha *et al.*, 2003 ; Chen *et al.*, 2004 ; Morin *et al.*, 2011).

Il a ainsi été montré que le B[a]P et le DMBA sont génotoxiques à faible dose chez l'anguille (*Anguilla anguilla*) (Nogueira *et al.*, 2009 ; He *et al.*, 2011). Une des rares études réalisées sur les larves de saumon (*Oncorhynchus kisutch*) indique une génotoxicité due au sédiment contaminé par des HAP (Barbee *et al.*, 2008). Une eau contaminée par des hydrocarbures présente des effets génotoxiques provoquant la cassure des doubles brins d'ADN chez des adultes guppys sauvages (*Gambusia affinis*) (Caliani *et al.*, 2009). Le DMBA induit la formation de tumeurs au niveau du foie chez les embryons de poisson zèbre (Spitsbergen *et al.*, 2000). De plus, il a été montré que le DMBA est provoqué des tumeurs chez la truite arc-en-ciel (Kirby *et al.*, 1990 ; Fong *et al.*, 1993).

5 Modèle biologique : le poisson zèbre (*Danio rerio*)

5.1 Phylogénie et nom commun

Le poisson zèbre est un téléostéen de l'ordre des Cypriniformes (Figure 14). La nomenclature actuelle de cette espèce, *Danio rerio*, a été proposée par Francis Buchanan-Hamilton en 1822.

5.2.2 Morphologie

Le poisson zèbre peut atteindre la taille de 5 cm (femelle adulte). Le stade adulte est atteint vers l'âge de 3 mois. Les poissons zèbres présentent un dimorphisme sexuel marqué : les femelles ont un ventre bombé et une papille urogénitale à l'arrière des nageoires pelviennes (Figure 15-A) tandis que les mâles sont plus fins et plus petits (Figure 15-B).

Ces poissons sont bleus foncés et possèdent quatre bandes blanches brillantes qui s'étirent sur tout le corps, des opercules à la nageoire caudale. La nageoire dorsale est bleue, l'anale et la caudale sont rayées comme le corps. Les nageoires pectorales et ventrales sont blanches. Cependant, chez les mâles, l'ensemble des nageoires et du corps est plus jaunâtre. La couleur du poisson varie aussi selon son environnement. Parfois, deux paires de barbillons (organes tactiles) sont insérées en arrière de la mâchoire.

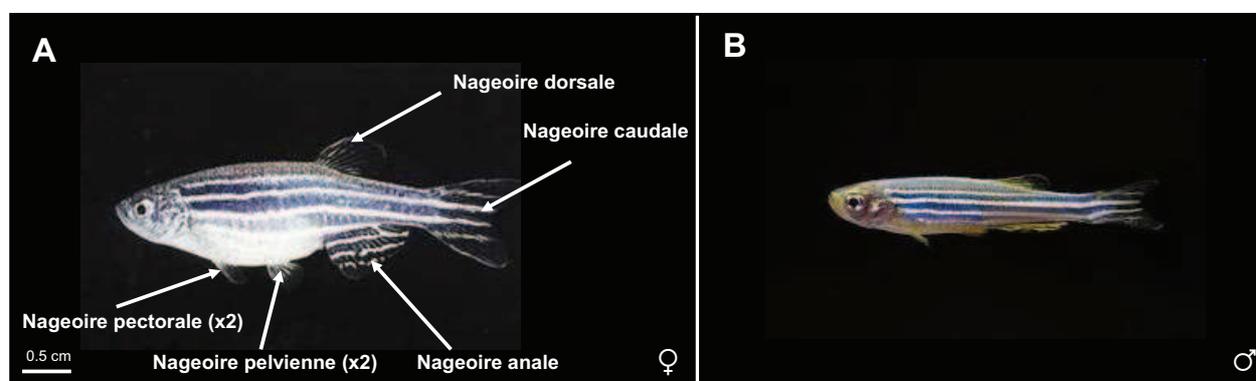


Figure 15 : Dimorphisme sexuel chez le poisson zèbre
A. poisson femelle, B. poisson mâle

5.2.3 Cycle de vie

Le cycle de vie du poisson zèbre est court ; il ne faut en effet que 3 mois environ pour obtenir un adulte fertile, capable de se reproduire en moyenne deux fois par semaine, pendant plusieurs mois. Une femelle fertile pond en moyenne entre 200 et 300 œufs par ponte. Le cycle de vie et quelques étapes de développement de ce poisson sont représentés dans la Figure 16.

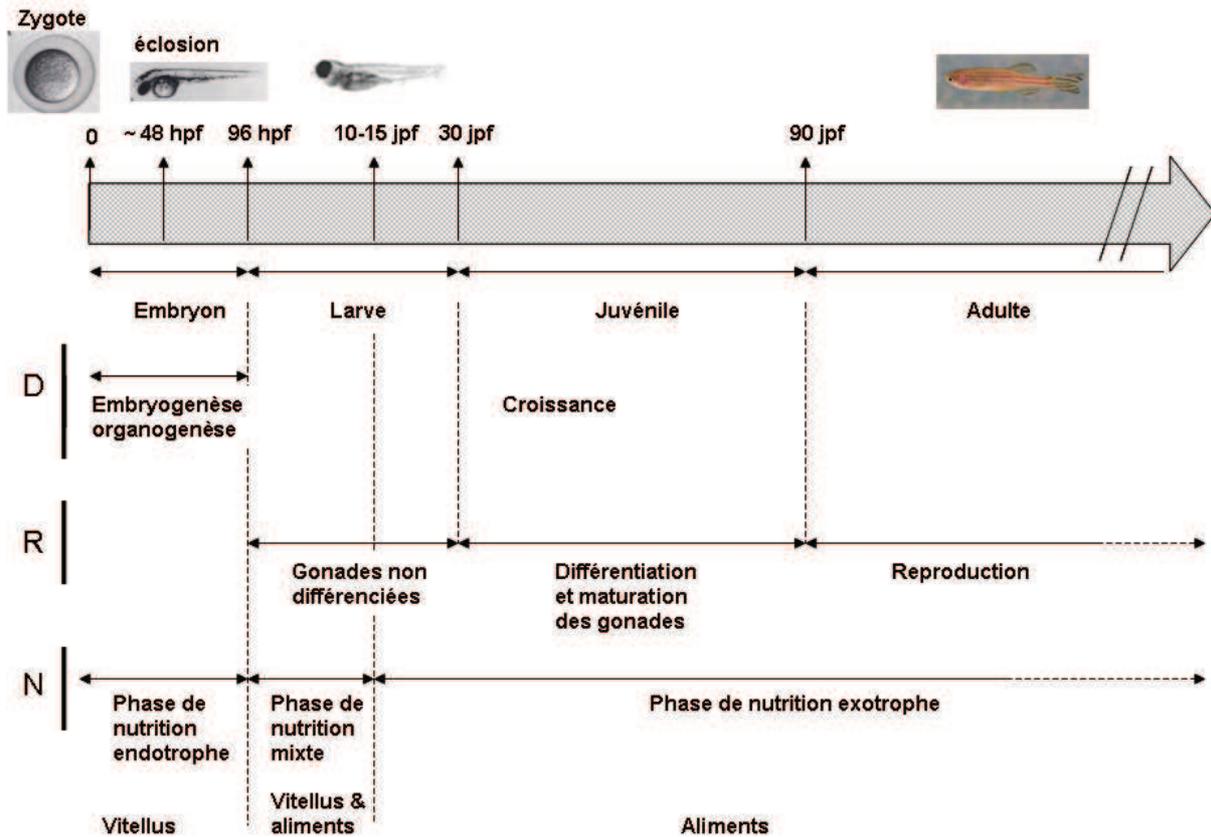


Figure 16 : Description générale du cycle de vie du poisson zèbre
 hpf = heures post fécondation, jpf = jours post fécondation

D : développement embryonnaire et mise en place des différents systèmes et organes (cardiaque, nerveux, circulatoire, musculaire, digestif etc...). R : reproduction ; le développement et la différenciation du système reproducteur se déroulent en trois étapes successives.

N : nutrition ; il existe trois phases de nutrition chez le poisson zèbre.

5.2.4 Développement embryonnaire (0 - 96 hpf)

Kimmel *et al.* (1995) ont décrit le développement embryonnaire du poisson zèbre. La mise en place des tissus et de la plupart des ébauches d'organes est quasiment terminée au bout de 24 h de développement. Chez cette espèce, le développement embryonnaire est très rapide en comparaison avec celui des autres Vertébrés. Deux jours de développement correspondent à 12 jours de développement embryonnaire de souris et à un développement de 35 jours pour un embryon humain. Les principales étapes du développement sont présentées dans les paragraphes suivants.

Stade une cellule (0 h) et période de clivage (jusqu'à 3 h) :

Au moment de la ponte, les œufs sont chargés de réserves vitellines. Juste après la fécondation, des mouvements cytoplasmiques apparaissent, puis le cytoplasme dépourvu de vitellus se forme, aboutissant ainsi à la formation du pôle animal.

La première division cellulaire a lieu 45 minutes après la fécondation (Figure 17). La fin de cette période de clivage se situe précisément entre le stade 512-cellules et le stade 1024-cellules et correspond au début de transcription du génome zygotique : c'est la transition mi-blastuléenne (MBT). Au même moment se forme la couche vitelline syncytiale (YSL : Yolk Syncytial Layer), qui est une annexe extra-embryonnaire essentielle pour la détermination des axes embryonnaires.

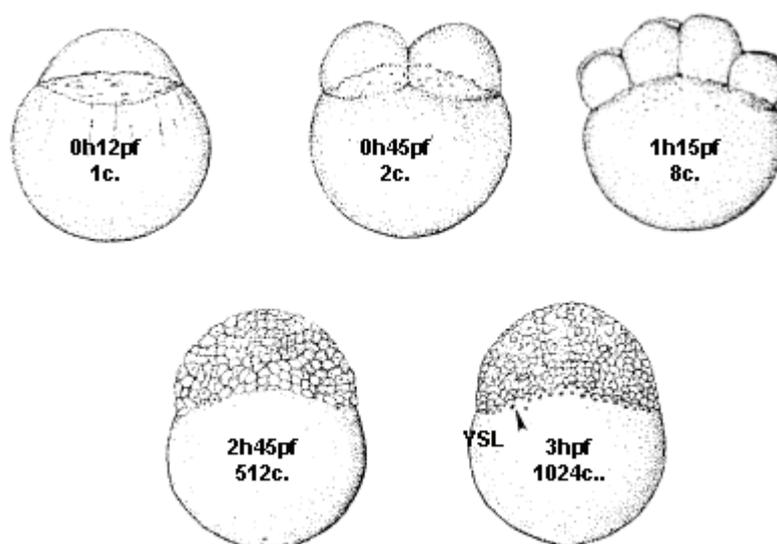


Figure 17 : Période de clivage
(hpf : heure post fécondation ; c.: cellule ; YSL : Yolk Syncytial Layer)

Pendant cette période, l'embryon se développe sur le vitellus, par divisions synchrones jusqu'au stade 1024 cellules. (Figure 17).

Période blastula (3 h - 6 h) et gastrulation (6 h -10 h) :

La période blastula s'étend du stade MBT jusqu'à la gastrulation (6 hpf). Le blastoderme commence à recouvrir le vitellus par un mouvement d'épibolie et l'embryon se creuse en son centre (Figure 18). L'axe animal-végétal est déjà reconnaissable. L'axe dorso-ventral et les feuillet embryonnaires sont déjà déterminés au niveau moléculaire.

Au stade 50% épibolie, un nouveau feuillet interne, l'hypoblaste, se forme à partir des cellules marginales. Ce feuillet va par la suite se différencier en endoderme et en mésoderme.

Après épaissement de la zone marginale par involution des cellules marginales du blastoderme, on a formation de l'anneau germinatif. Plus tard, par des phénomènes de convergence, se formera l'écusson embryonnaire (ou shield) à l'origine du mésoderme axial. Après ce stade (Shield), l'axe antéro-postérieur de l'embryon est bien défini morphologiquement. Parallèlement, les mouvements d'épibolie vont continuer, afin de recouvrir l'embryon en entier (stade 90% épibolie).

En fin de gastrulation, les principales structures de l'embryon (axe, tête, queue) sont moléculairement identifiables (Figure 18).



Figure 18 : Période d'épibolie et de gastrulation

Période de segmentation (10h-24h) :

Pendant cette période, les somites se différencient de manière séquentielle ; à 24 hpf, on aura 30 paires de somites formées.

Les axes antéro-postérieur et dorso-ventral sont bien établis et les premiers organes apparaissent. Au stade 6 somites, le primordium optique apparaît latéralement dans la tête et la rétine se différencie au stade 20 somites (19 hpf). Les premiers mouvements spontanés de l'embryon vers 17 hpf marquent le début de l'activité des systèmes nerveux et musculaire (Figure 19). Les mouvements coordonnés de l'embryon commencent à 24 hpf. La formation des yeux se fait entre 12 h et 36 hpf à partir du cerveau antérieur (télencéphale) ; à 24 hpf l'œil est bien formé morphologiquement (Schmitt & Dowling, 1994) mais la vision ne sera active que vers 70 hpf (Schmitt & Dowling, 1999).

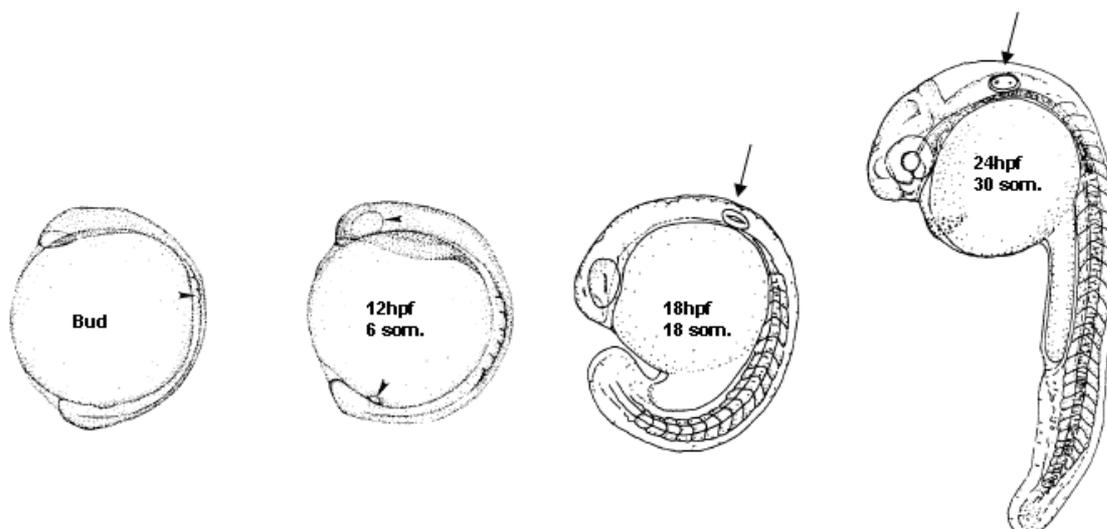


Figure 19 : Période de segmentation
Vue latérale des différents stades. som.: somite

24 h et plus :

Au bout de 24 h de développement, l'embryon est déjà proche d'un petit poisson chez lequel on peut reconnaître de nombreuses structures ou ébauches. Au niveau neural, les différentes régions du cerveau sont visibles grâce à des repères morphologiques comme l'oreille et le rhombencéphale (Figure 19). Le cœur commence à battre vers 22 h et le sang circule dans les artères et veines (McGrath & Li, 2008). Le rythme cardiaque est faible puis augmente progressivement avec le développement pour se stabiliser à l'âge adulte. Cette instabilité du rythme cardiaque à l'âge embryonnaire, surtout entre 48 h et 96 hpf, rend assez compliqué l'utilisation de ce phénotype chez le poisson zèbre et demande que toutes les mesures soient faites rigoureusement au même âge. L'éclosion se produit entre 48 h et 72 hpf.

5.2.5 Stade larvaire

Ce stade dure 2 semaines en moyenne et commence à l'ouverture de la bouche vers 96 hpf qui marque le début de l'alimentation de la larve. Au même stade, la vessie natatoire se gonfle, la nageoire médiane se met en place, la larve est légèrement pigmentée mais les différents organes restent visibles. Les organes sensoriels sont alors bien développés. Dorsalement, les différents lobes du cerveau sont facilement observables (Figure 20). Latéralement, les somites et les nageoires pectorales sont bien apparents. La bouche s'ouvre jusqu'à un pharynx segmenté et forme une série de branchies. Le système digestif, qui est dépourvu d'estomac,

s'allonge postérieurement et est composé d'un grand foie et d'un long intestin qui aboutit à l'ouverture urogénitale. Le cœur se situe entre les arcs branchiaux et les nageoires pectorales, dans la cavité péri-cardiaque et présente deux chambres : l'atrium et le ventricule.

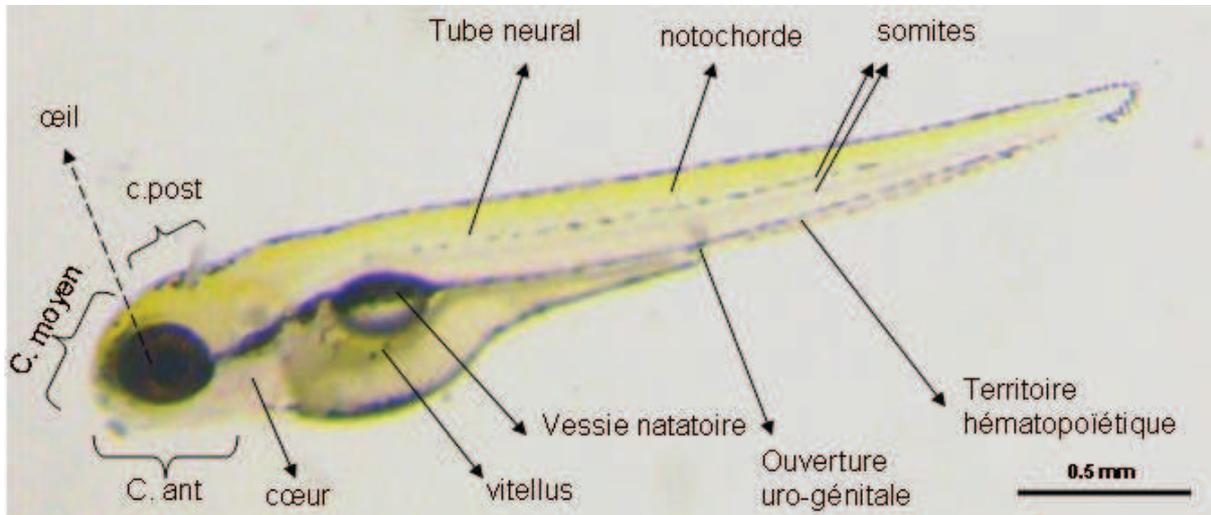


Figure 20 : Embryon de 96 h

C. ant. = Cerveau antérieur (télencéphale), C. moyen = cerveau moyen (Mésencéphale), C. post. = cerveau postérieur (Rhombencéphale).

5.2.6 Stade juvénile

Les mécanismes de détermination du sexe chez le poisson zèbre sont encore inconnus, mais il est convenu qu'ils soient déterminés génétiquement pour les mâles et les femelles. Les gonades se développent à partir des cellules germinales primordiales (PGC) qui sont présentes précocement lors de la gastrulation. Les PGC vont ensuite migrer vers le site des futures gonades ; cette migration s'achève au stade de 6 somites. Les PGC s'associent avec les cellules gonado-somatiques, qui vont proliférer et donner les gonades (Clelland & Peng, 2009). Tous les individus juvéniles vont développer des gonades de type ovaire juvénile qui vont ensuite se développer et former des ovaires matures pour les femelles, ou bien se transformer en testicules pour les mâles (Clelland & Peng, 2009). Vers 30 jours, la larve devient un juvénile, elle est en phase de croissance (Figure 16). Au bout de 21 à 40 jours, il y a détermination du sexe et la maturation des gonades se poursuit jusqu'à l'âge adulte (Brion *et al.*, 2004).

5.2.7 Stade adulte et différents organes

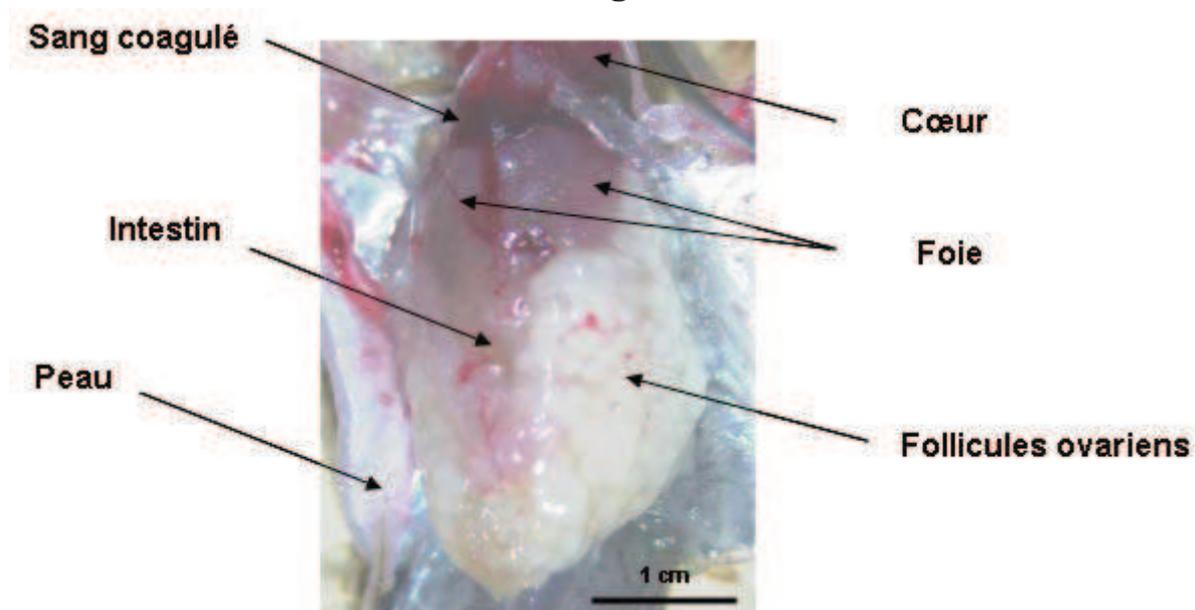


Figure 21 : Femelle adulte de poisson zèbre disséquée
Le cœur (de couleur rouge foncé) est situé antérieurement au foie (formé de deux lobes, de couleur rouge pâle), et à l'intestin.

5.3 Modèle de laboratoire

Les poissons zèbres sont faciles à entretenir en laboratoire. Ils sont élevés à 28°C toute l'année selon un cycle photopériodique de 14h de jour et de 10h de nuit, ce qui correspond à un rythme estival propice à la reproduction. La reproduction se fait facilement, toute l'année (absence de saisonnalité ; voir Annexe reproduction), les pontes obtenues pouvant être assez grandes (entre 100 et 500 œufs par couple) et régulières. Le développement des œufs est synchrone, l'embryon est transparent, ce qui facilite l'étude de l'expression des gènes et l'étude de la morphologie. Les mécanismes de développement et d'embryogenèse du poisson zèbre ont déjà été étudiés en détail. Le génome du poisson zèbre est entièrement séquencé et publié, il est composé de 25 paires de chromosomes, tous métacentriques et de tailles à peu près équivalentes. Un grand nombre d'outils (sondes, anticorps, techniques), qui permettent l'analyse *in situ* des embryons, ont été développés. Son cycle de vie court permet d'envisager des études à long terme comme des contaminations sur un cycle de vie en entier et transgénérationnelles (Vascotto *et al.*, 1997).

Le poisson zèbre est l'espèce la plus utilisée ces dix dernières années pour l'étude des effets des polluants (Hill *et al.*, 2005). Dans ce contexte, rappelons que les tests réalisés sur des embryons aux stades eleuthéro-embryons, c'est-à-dire tant que l'embryon se développe sur la

base de ses propres réserves, donc avant 96h environ pour le poisson zèbre, sont considérés comme des tests *in vitro*. A ce titre, ils sont conformes aux recommandations de la directive REACH de réduire le recours aux tests sur les animaux.

Chapitre 2 : Bioaccumulation, transfert et effets physiologiques d'une contamination par voie trophique avec des mélanges de PCB chez le poisson zèbre (Danio rerio)

1 Préambule

1.1 Contexte des expériences

L'objectif de ces expériences était d'évaluer les effets d'une exposition à des PCB pendant un cycle de vie entier de poisson zèbre, en utilisant des conditions pertinentes sur un plan environnemental. Pour se conformer à cela, nous avons réalisé des expositions chroniques, par voie trophique, à des mélanges de PCB. La constitution des mélanges a elle aussi été dictée par la volonté d'être représentatif de situations environnementales, tant au niveau du choix des congénères de PCB, que de leur concentration et de leurs proportions relatives dans le mélange. Ces conditions ont été établies selon les concentrations relevées dans les zones estuariennes européennes. Le savoir faire analytique et le coût explique en particulier l'absence des composés "dioxin-like" plans tels que les CB-77, CB-126 et CB-169, pratiquement absents de ces régions (très faibles doses). Pendant ces études on a utilisés des mélanges de PCB indicateurs qui sont présent en grande quantité dans l'aliment d'origine animal et d'autres PCB non indicateur qui sont trouvés dans la nature.

Nous avons réalisé deux séries d'expériences en 2007 et 2009 en utilisant deux mélanges de PCB, le premier est présenté dans le Tableau 6 ci-dessous et correspond à celui qui était utilisé lors de SoleBEMOL, et le second est présenté dans l'article qui suit (Chapitre 2-2, p.52). Les concentrations utilisées sont représentatives de celles relevées pour le CB-153 dans les mollusques de milieux faiblement (PCB10 - type estuaire de Vilaine), moyennement (PCB100 - type estuaire de Loire) et fortement contaminés (PCB500 - type estuaire de Seine).

1.2 Première expérience de contamination (2007)

Tableau 6 : Régimes utilisés avec la concentration de chaque congénère en ng/g PS et les spécificités des congénères choisis

Congénères	Régime PCB10	Régime PCB100	Régime PCB500	Spécificités
CB-105	2.5	25	125	Similaire à la dioxine mono-ortho substituée
CB-118	5	50	250	Similaire à la dioxine mono-ortho substituée
CB-149	5	50	250	Composé probablement métabolisable
CB-153	10	100	500	Traceur de la bioaccumulation (accumulé à 100% dans l'organisme) non métabolisable
Total	22.5	22.5	1125	Somme des quatres CB

Les principaux résultats obtenus lors de cette première série de contamination sont brièvement présentés ci-dessous sous forme de figures légendées. Ces expériences ont permis de mettre en évidence une contamination des poissons après nourrissage avec des aliments contaminés (Figure 22), ainsi qu'une bioaccumulation différentielle selon le temps, la dose et le sexe du poisson. La bioaccumulation des PCB est dosé dans des poissons en entier. Nous avons également mis en évidence un transfert vers les œufs.

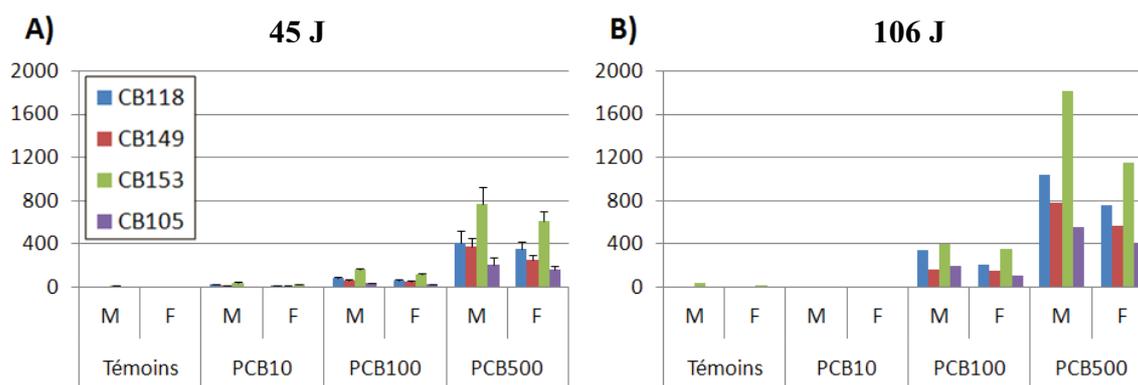


Figure 22 : Bioaccumulation des PCB en fonction de la dose et du temps

A) Mesures individuelles ou sur un pool d'individus réalisées après 45 j d'exposition (n=3). B) Mesure réalisée après 106 j d'exposition (n=1). On observe une relation positive entre la quantité de PCB dosée dans les poissons des deux sexes et le temps d'une part et la concentration dans la nourriture d'autre part.

Les mesures sont exprimées en ng/g de poids sec.

La bioaccumulation est mesurée par dosage de poisson entier par chromatographie de gaz, dans le dosage à 106 jours la condition PCB 10 n'est pas réalisés suite au manque

d'échantillons de poisson stocké. Cette accumulation est différentielle d'un congénère à un autre. Si on rapporte les concentrations relatives de chaque congénère à celle du CB-153, on observe que le CB-118 est présent à 108.5 ± 2.1 % de la concentration attendue, soit une concentration supérieure alors que les congénères CB-105 (87.1 ± 2.8 %) que CB-149 (82.3 ± 0.6 %) sont moins concentrés dans les échantillons (mesuré) et dans le mélange initial (théorique). Ceci indique que le CB-149 et le CB-105, dans une moindre mesure, sont présents en proportion inférieure à ce qui était attendu, suggérant une bioaccumulation inférieure de ces congénères et/ou l'existence d'une métabolisation. Une autre hypothèse est que les congénères 149 et 105 sont plus transférés par voie maternel et donc peut être présent dans les œufs.

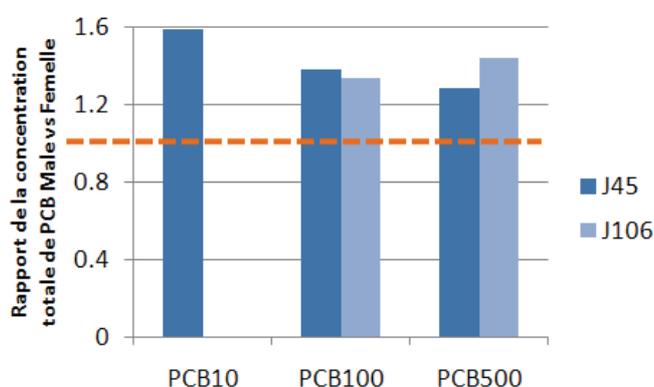


Figure 23 : Accumulation différentielle selon le sexe
Le trait pointillé orange indique le rapport de 1 qui indiquerait une concentration égale chez les femelles et les males

Le rapport de la somme des concentrations des 4 congénères mesurés chez les mâles et chez les femelles est toujours supérieur à 1 (Figure 23). Cela indique que dans ces conditions expérimentales, les mâles sont toujours plus contaminés que les femelles et ce quelle que soit la dose dans l'aliment ou le temps de contamination. Cela peut être expliqué par des différences en termes d'alimentation ou de métabolisme ou par une élimination des PCB par les femelles *via* les pontes. Cette hypothèse est confirmée par le dosage des PCB dans les œufs (Figure 24). Il est notable que les concentrations des différents congénères mesurées dans les œufs ne suit ni celles de l'aliment, ni celles mesurées dans les adultes exposés. On peut conclure qu'un transfert de PCB de la femelle vers les œufs existe.

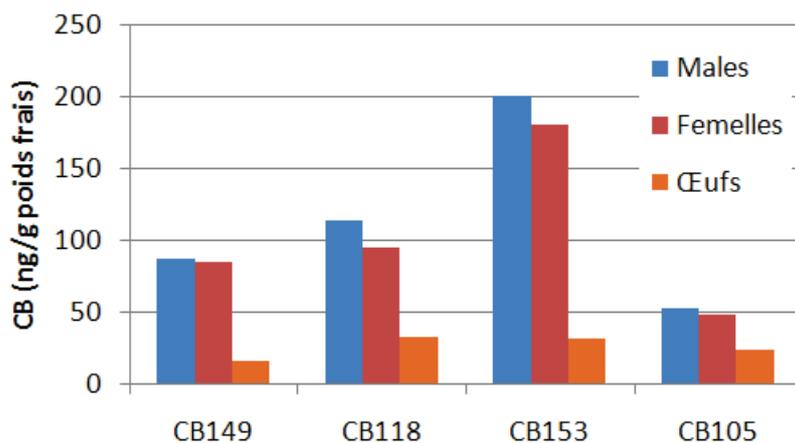


Figure 24 : Accumulation selon le sexe et transfert des PCB vers les œufs
Concentration en ng/g de poids frais mesurée

Nous avons également caractérisé plusieurs variables de la reproduction pendant les 13 semaines de contamination (nombre et taille des pontes, pourcentage de fécondation). Nous avons obtenu un total de 106 pontes 22.000 embryons ce qui fait approximativement 200 embryons par ponte en moyenne. Nous n'avons pu mettre en évidence la modification d'aucune des variables étudiées en nombre, taille des pontes et pourcentage de fécondations. L'éclosion, la morphologie et la survie des embryons provenant des géniteurs contaminés sont normales. Une centaine d'embryons ont été stockés afin d'analyser l'expression de marqueurs du développement. Le gène *myod* a été choisi pour étudier le développement des muscles chez le poisson zèbre. Actuellement, aucune information n'est connue sur l'effet des PCB sur le développement musculaire (Figure 25). Aucun défaut morphologique n'a pu être mis en évidence.

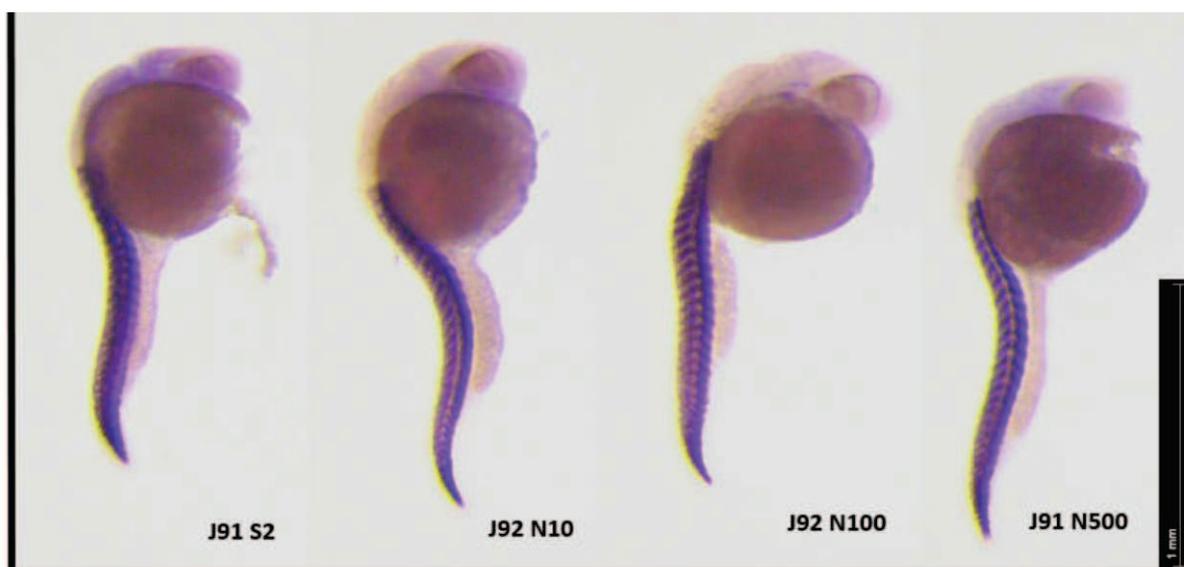


Figure 25 : Patron d'expression du gène *myod* à 24 hpf
Analyse réalisée sur des embryons après 91 ou 92 jours de contamination pour les 4 conditions (Solvant (S2), PCB10 (N10), PCB100 (N100) et PCB500 (N500)).

Cette première série d'expositions nous a permis de valider l'approche mise en œuvre. Nous avons ainsi pu vérifier que la contamination des géniteurs était efficace. Nous avons pu mettre en évidence une contamination croissante avec la dose et le temps, ainsi que des différences dans les concentrations de chaque congénère et une accumulation différentielle en fonction du sexe du poisson. A cet égard nous avons également pu montrer qu'il y avait un transfert maternel vers les œufs et que celui-ci semblait ne pas être équivalent pour tous les congénères. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence d'effet physiologique sur les poissons. Cela peut être dû à l'absence d'effet des congénères utilisés et/ou au fait que nous n'avons pas étudié les bons critères.

Nous avons entrepris une seconde série d'expositions en augmentant le nombre de congénères présents dans le mélange mais en gardant les mêmes postulats de départ en termes de concentrations et de proportions. Cette expérience s'est déroulée sur les années 2009 et 2010.

1.3 Deuxième expérience de contamination (résumé de l'article 1)

Cette seconde série d'expositions a été réalisée par voie trophique comme la précédente pour étudier un effet de mélange de PCB contenant des congénères "dioxin-like" et non "dioxin-like", à l'exception de ces trois critères :

- du mélange de congénères, qui a été élargi pour mimer plus l'état actuel des PCB dans la nature tout en conservant des concentrations et des proportions en lien avec l'environnement ;
- de l'âge des poissons qui ont été choisis plus jeunes au début de l'expérience (stade juvénile) ;
- de la durée de l'exposition qui a été portée à 300 jours alors que la première était de 91 jours (Figure 26).

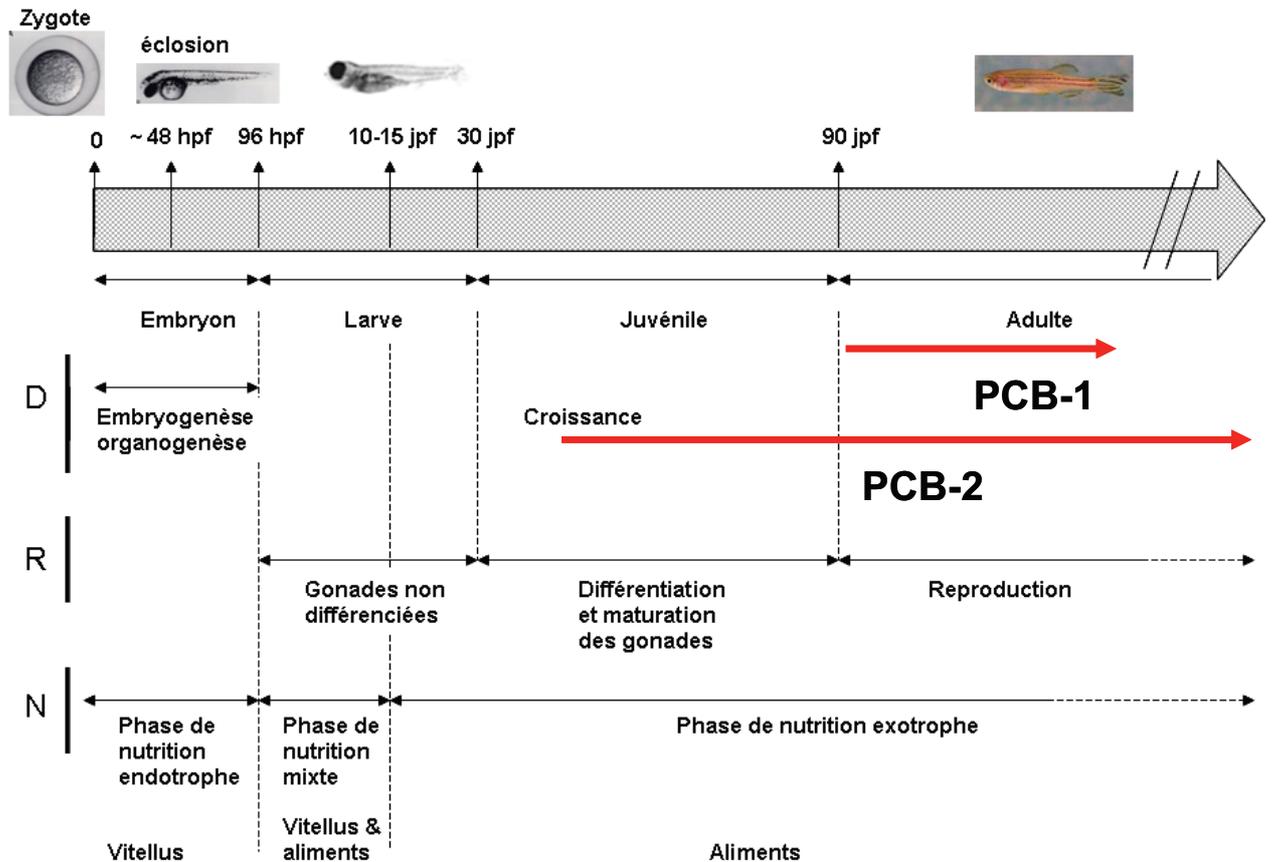


Figure 26 : Schéma expérimental pour les deux expériences de contamination au PCB.

Cette seconde série d'expositions a permis de confirmer la plupart des résultats précédemment obtenus à savoir :

- l'absence d'effet sur la survie et la croissance ;
- une bioaccumulation croissante avec la dose et le temps ;
- un transfert différentiel entre les mâles et les femelles (avec quelques nuances qui seront détaillées ci-dessous) ;
- un transfert de la femelle vers les œufs.

En ce qui concerne le transfert différentiel, nous avons identifié deux types de femelles. Certaines présentent un niveau de contamination similaire à celui des mâles alors que d'autres présentent une concentration de CB-153 cinq fois supérieure. Les femelles les moins contaminées ont été échantillonnées immédiatement après avoir pondu. Une hypothèse est proposée dans l'article pour expliquer ces différences de bioaccumulation.

Par ailleurs, nous avons pu identifier un certain nombre d'altérations de la reproduction : décalage de l'âge de la première ponte qui peut être due aux PCB qui peuvent retarder le

développement normal des poissons ; et surtout une diminution du taux de fécondation des pontes. Cette diminution est due à l'augmentation des pontes mal fécondées dont le nombre double. Nous avons cherché à établir si cette altération était liée à un sexe en réalisant des croisements entre poissons témoins et poissons exposés et, de façon surprenante, le nombre de ponte mal fécondée est augmenté quel que soit le sexe du poisson contaminé et il n'y a pas d'additivité. Les mécanismes sous-jacents restent à identifier par étude d'expression de gènes liées aux mécanismes de toxicités. Il est néanmoins probable qu'au moins une partie de ces effets soit liée au caractère de perturbateur endocrinien (dérégulation des taux des hormones thyroïdiennes et hormones sexuelles) de certains congénères de PCB. Cette perturbation des hormones sexuelles est soutenue par les analyses histologiques qui montrent une diminution du nombre de follicules vitellogéniques par apoptose cellulaire induisant à des atrésies qui peuvent être massive chez les femelles exposées au régime PCB500. Ce résultat peut être due à une toxicité directe des PCB.

Ces résultats indiquent que le succès reproducteur de poissons exposés à des concentrations environnementales de PCB peut être significativement réduit. Ceci soulève un certain nombre de questions sur les conséquences potentielles comme la réduction de recrutement, la perturbation du développement et la diminution des stocks sur les populations sauvages.

2 Article 1 : Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situation induces ovary pathology and impairs reproduction ability

Tarek DAOUK, Thibaut LARCHER, François ROUPSARD, Laura LYPHOUT, Cyril RIGAUD, Mireille LEDEVIN, Véronique LOIZEAU, Xavier COUSIN

Publié dans Aquatic Toxicology – Octobre 2011 ; 105(3-4):270-8.

Although the use of PCBs has been banned for several decades, they are still present in the environment and are occasionally mechanically released from sediment or transferred through the trophic chain. Field analyses have established correlations between exposure to PCBs and alterations in fish physiology including reproductive function. Experimental exposures were mainly performed using dioxin-like PCBs or other congeners at very high concentrations.

However, these studies are difficult to relate to real-life conditions. In the present study, we performed a life-cycle exposure using zebrafish model and mixtures representative of some environmental situation in terms of doses and composition. Exposure was performed through diet which is the main contamination route in the field. We demonstrated a bioaccumulation of PCBs in males and females as well as a maternal transfer to the eggs. Survival, growth and organ size were similar for all conditions. Several reproductive traits were altered after exposure to a PCB-contaminated diet, including a reduction of fertilized eggs per spawn as well as an increase of the number of poorly fertilized spawns. This latter observation was found irrespective of the sex of contaminated fish. This is related to modifications of ovary histology revealing a decrease of maturing follicles and an increase of atretic follicles in the ovaries of females exposed to PCBs. These results indicate that exposure to PCBs mixtures mimicking some environmental situations can lead to a dramatic reduction in the number of offspring produced by a female over a lifetime. This is of great concern for wild species living under natural conditions.

Keywords – zebrafish; PCBs; chronic exposure; physiology; reproduction; atresia

2.1 Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are synthetic chlorinated aromatic hydrocarbons that are non-flammable, hydrophobic, and chemically stable. In the 80's, when PCBs were banned, global production was estimated to be over 1.5 million tons (Breivik et al., 2002). Because of their extensive industrial use and chemical stability, PCBs have accumulated in the environment and biota. Their high lipophilicity and environmental stability has allowed them to persist in the environment for long periods resulting in a wide geographical distribution. In the environment, PCBs are buried in sediments and particles can be released by, for example, trawling, dredging or floods. This explains why biota can still be contaminated. The long biological half-life and high liposolubility of PCBs can lead to their bioaccumulation and biomagnification along food chains involving a wide range of trophic levels, with a potential risk for high trophic level predators (Borgå *et al.*, 2001 ; Fisk *et al.*, 2001 ; Nfon & Cousins, 2006). For human and fish populations, dietary intake, especially the consumption of marine organisms, is considered as one of the most important sources of exposure to PCBs (Johansen *et al.*, 1996 ; Nyman *et al.*, 2002 ; Muir *et al.*, 2003 ; Pompa *et al.*, 2003).

Data collected from fish in the field suggests that PCB could have physiological effects although the consequences of PCB exposure are difficult to ascertain. Some of these effects have been confirmed by laboratory experiments and include progressive weight loss ('wasting syndrome'), alteration of lipid metabolism, hepatotoxicity, immunotoxicity, alteration of endocrine system function and reproduction, teratogenicity and developmental toxicity, and tumor promotion (Monosson, 1999 ; Ross, 2004 ; Safe, 2005 ; Foekema *et al.*, 2008 ; van Ginneken *et al.*, 2009 ; Schell & Gallo, 2010).

The use of fish models to address ecotoxicology issues has become more prevalent in recent years. Small fish models have allowed more detailed investigations of the mechanisms that underlie the adverse effects of pollutant exposure (Spitsbergen & Kent, 2003 ; Hill *et al.*, 2005 ; Hinton *et al.*, 2005). Many publications have reported the effects of exposing zebrafish or medaka to pollutants, particularly PCBs. These studies have investigated pollutant exposure *via* different routes and at different stages of development from embryo to adult. Alteration of several physiological processes including development, reproduction, and behavior have been demonstrated (Billsson *et al.*, 1998 ; Örn *et al.*, 1998 ; Westerlund *et al.*, 2000 ; Nakayama *et al.*, 2004 ; 2005 ; 2005 ; Grimes *et al.*, 2008 ; Na *et al.*, 2009 ; Nourizadeh-Lillabadi *et al.*, 2009 ; Lyche *et al.*, 2010). However in most of these studies the exposures were performed using individual congeners and or high doses.

In the present study, we have tried to use exposure conditions that resemble as closely as possible those occurring in the wild. For this purpose, juvenile and adult zebrafish were exposed to mixtures of PCBs consistent with some environmental situations in terms of dose and composition. To further mimic naturally occurring situations, long-term exposure was performed through diet. The aim of the present study was to evaluate the physiological consequences of lifetime exposure of fish to these PCB mixtures in their diet. We monitored the bioaccumulation of PCBs in fish over time and as well as transfer to eggs. In particular, we assessed several key issues for reproduction including spawn size and number, fertilization rate, and gonad histology.

2.2 Material and methods

2.2.1 Fish, exposures, and sampling

Wild type zebrafish HB (*Danio rerio*) were bought at 6 weeks of age from a provider dedicated to breeding zebrafish especially for ecotoxicology experiments (Elevage de la grande rivière, Calluire, France). Exposure began 2 weeks later. These fish were maintained and exposed to a PCBs mixture in Ifremer research station L' Houmeau France, under standard conditions: water and room temperature were kept between 26-28°C and the photoperiod was 10 h dark and 14 h light. Water was obtained after a mix of reverse osmosis treated water and tap water, both being filtered beforehand with dust and charcoal filters, to obtain a pH of 7.5 ± 0.5 and a conductivity of $300 \pm 50 \mu\text{S}/\text{cm}$. Ammonia, nitrites, and nitrates were monitored daily for 2 months then weekly and remained within recommended ranges (Lawrence, 2007). The fish were raised in a flow-through system made of 20 identical 10L tanks in a rack. Water was automatically changed every hour leading to an exchange rate of 4L/day/tank. Contaminated water was collected and treated with activated charcoal before being discharged in a sewer. This study was conducted under the approval of the Animal Care Committee of France under the official licence of M.L. Bégout (17-010).

Commercial food (Neo supra, pellet-size 1400 μm), obtained from Le Guessant (France), consisted of a formulated feed containing 58% crude protein and 13% crude fat. Spiked food was prepared by batch to avoid deterioration and by slowly adding a solution in iso-octane of known amounts of thirteen congeners, (AccuStandard Inc., New Haven, USA, purity above 98%) to food pellets in order to prepare diets. PCBs mixtures are composed of the seven indicator PCB congeners (CB-28, CB-52, CB-101, CB-118, CB-138, CB-153, CB-180), and a few others to describe a larger range of chlorination from 3 to 8 chlorine atoms (CB-105, CB-132, CB-149, CB-156, CB-170, CB-194). The latter compounds were chosen because they can highlight any underlying mechanisms acting on the distribution of organic contaminants in biota *i.e.* bioaccumulation or biotransformation.

CB-153 is not metabolized and is used as a representative of all thirteen congeners and therefore only its concentration is reported here.

Tableau 7 : Diets composition

List of PCBs congeners used in this work along with the chlorine number. Target and measured PCBs concentrations in PCB-Medium and PCB-High diets are indicated (mean \pm SD). Reference congener CB-153 is indicated in bold.

Congeners	Chlorine number	PCB100 diet		PCB500 diet	
		Targeted concentration (ng/g)	Measured concentration (ng/g)	Targeted concentration (ng/g)	Measured concentration (ng/g)
CB-28	3	10	4.8 \pm 0.6	50	16 \pm 3.3
CB-52	4	25	20 \pm 0.8	125	82 \pm 11.5
CB-101	5	50	45 \pm 2.3	250	191 \pm 9.5
CB-149	6	50	47 \pm 4.9	250	217 \pm 11.6
CB-118	5	50	54 \pm 4.4	250	207 \pm 7.9
CB-153	6	100	106 \pm 5.5	500	420 \pm 15
CB-132	6	25	18 \pm 0.9	125	104 \pm 5
CB-105	5	25	26 \pm 5.3	125	133 \pm 19.5
CB-138	6	100	99 \pm 4.9	500	431 \pm 16.4
CB-156	6	25	17 \pm 1.5	125	113 \pm 4
CB-180	7	50	43 \pm 2.1	250	215 \pm 4.5
CB-170	7	25	26 \pm 1.6	125	126 \pm 4.5
CB-194	8	10	9 \pm 1.1	50	47 \pm 1.7
Total PCB		545		2725	

Two diets were prepared: PCB-Medium and PCB-High for which targeted concentrations of individual congeners are shown in Tableau 7. These concentrations correspond to the one monitored in respectively medium and highly contaminated sites (respectively Loire and Seine estuaries; data from French coastal chemical contamination survey network – ROCCH). Batches of spiked food were stored in amber containers in a cool, dark place throughout their use (*circa* 1.5 months). Individual PCB congener concentrations were determined in each batch of spiked food (Tableau 7). Non-spiked food was also analysed for PCB levels, and concentrations were between <0.05 ng/g dry weight (dw) and 3.0 ng/g dw (mean value calculated on 5 replicates) depending on the congener. In addition to congeners included to spike the contaminated food, CB 31 (not detected; nd), CB 77 (nd), CB110 (0.75 ng/g dw), CB126 (nd), CB128 (nd), CB187 (nd) non-added congeners and p,p'DDE (3.50 ng/g dw) were measured with the exception of other molecules. The control food exposed only to solvent is further referred as Solvent whereas the unmodified food is referred to as Plain. We used the Plain food to exemplify potential deviation from untreated situations that could be due to solvent or spiking procedures.

After 2 weeks of acclimation, 30 fish were randomly distributed in each tank respecting an equivalent biomass of 214.1 ± 2.9 mg (mean \pm SEM) within range [188.3-239.1] corresponding to a coefficient of variation of 5.9%. Diets were then assigned to each tank with all diets represented in each rack shelf with 3 tanks for Plain, 3 tanks for Solvent control, 7 tanks for PCB-Medium, and 7 tanks for PCB-High diets. Fish were fed twice (morning and

afternoon) on week days and once with a double dose on weekends. During all of the experiments, fish were fed 2 % of their wet weight per day. This ration was updated after each biometry. Contamination lasted for 300 days.

Samples were made during biometries for PCB dosage; one or more fish from each sex and condition were euthanized with a lethal dose of benzocaïne (Sigma) and then stored directly at -20°C. In some cases, newly spawned eggs were also conserved at -20°C without any water and these samples were dosed for PCB.

2.2.2 Chemical analysis

PCB analysis was performed according to the protocol described by Bodiguel *et al.* Bodiguel *et al.*, (2009). Briefly, samples were extracted in a hot Soxhlet extraction apparatus (Soxtec) over 1.5 h with a hexane: acetone mixture (80:20). The amount of extracted fat was determined by gravimetric analysis. Then, two successive clean-ups were performed on the extractable material. First, lipids and co-extractible material were destroyed by adding concentrated sulphuric acid. The cleaned extract was then purified by adsorption chromatography on a Florisil column (16% MgO + 84% SiO₂, activated for 1.5 h at 500°C, deactivated with 3% of demineralised water) and eluted with pentane. Finally, PCB congeners were analyzed by gas chromatography with an electron capture detector, on a HP 5890 series II equipped with a CP-Sil19 capillary column (60 m length, internal diameter 0.25 mm, and 0.15 µm phase film thickness) following optimized conditions described by (Jaouen-Madoulet *et al.*, 2000). The system was calibrated within quite a large range using a six-point calibration curve to define the linearity range of our detector (ECD) for all contaminants. The relative precision of the method was checked for this type of sample by analyzing five aliquots of a homogeneous-tissue preparation of fish muscle. The results showed standard deviations of less than 10% for all congeners, indicating that the method had a satisfactory reproducibility. During analysis of the real samples, analytical blanks were systematically measured for every ten samples. The blank concentrations were always less than the concentrations of the lowest standards of all congeners. Finally, 5 replicates of a reference material, BCR-CRM349 (Cod Liver Oil) were analyzed to determine the accuracy and precision of the method. PCB recoveries varied between 74 and 125%. Furthermore, the RSD values ranged from 4 to 19 %, with a mean of 10% for all PCBs. All of these results were in

agreement with certified reference values and published data (Schantz *et al.*, 1993). The laboratory regularly takes part in Quality Assurance of Information for Marine Environmental Monitoring in Europe (QUASIMEME) intercomparison exercises for PCBs in biota and our Z-scores are satisfactory, *i.e.*, between -2 and +2.

2.2.3 Phenotypic analysis

Survival was monitored each day throughout the entire duration of the experiment.

To track fish growth, total body mass and standard lengths were measured approximately every two weeks and sex was recorded when possible. Fish were anaesthetized for 5 min in benzocaïne (50mg/l) during biometric analyses then released into their tank of origin. Specific growth rates (SGR, %) were also calculated from growth data according to the equation:

$$SGR = \frac{\ln(\text{weight } D_2) - \ln(\text{weight } D_1)}{\text{time between } D_1 \text{ and } D_2 \text{ in days}} \times 100$$

At the end of the experiment, 9 females of each condition were weighed as well as their liver and gonads after dissection to calculate the Liver Somatic Index (LSI) and the Gonad Somatic Index (GSI) as a percentage of the organ weight relative to the total body weight.

Onset of spawning was determined by placing a spawning box (AquaSchwartz, Germany) within each tank from day 48 until a spawn was found in all of them (*i.e.* day 141). Fish were then regularly set into pairs in spawning boxes. Reproduction couples were obtained by setting up couples on the evening before spawning using fish coming from the same tank. In some cases, fish from Solvent and PCB 500 tanks were mixed to assess the dependence of fertilization rate on sex. Generally, spawning occurs progressively after a few minutes of light illumination. One hour later, eggs were collected, cleaned, sorted (into fertilized or none fertilized), and counted. From each spawn 100 fertilized eggs were set aside into a 10 cm diameter Petri dish filled with 30 ml of E3 solution (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl₂, 0.33mM MgSO₄) at 28° C. Embryo deaths were recorded each day to calculate the embryo-survival percentage. Embryo survival percentage was calculated in all conditions on starving larvae till their death (12-14 days) according to (Örn *et al.*, 1998).

2.2.4 Histopathology evaluation

A histopathological evaluation was performed on 109 fish (69 females and 40 males). The principles of step sectioning adult zebrafish have already been published (Spitsbergen et al., 2000). Briefly, whole fish carcasses were fixed in 4% formalin after ventral incision of the abdomen for larger individuals. 24 h later, scales and fins were carefully removed and samples were dehydrated and embedded in paraffin. Serial sagittal step sections were cut from the left side of the fish. Four step sections from each adult fish were mounted on glass slides, 1 from eye anterior chamber level, 1 from eye posterior chamber level, 1 just medial to the eye, and 1 at the midline. Sections were routinely stained with hematoxylin-eosin-safran (HES). Ovarian and testicular tissue features were quantitatively assessed in a blind manner using a digital camera (Nikon DXM 1200, Champigny, France) linked to image-analysis software (Nikon Imaging Software). For ovaries, all oocytes present on mid-level section and on sections medial to the eye were counted along their morphological stage using middle magnification (Koç *et al.*, 2008). Atretic oocytes, as assessed by their irregular shape and yolk-envelope disruption, were also counted. Individual frequencies of each type of oocyte and indexes of oocytic apoptosis were calculated using ratio of the total ovarian area. For testis, the total area occupied by differentiated E3 spermatids was measured (Schulz *et al.*, 2010) and a ratio was calculated with total observed testis area on two middle magnification fields.

2.2.5 Statistical analysis

Because data do not follow a normal distribution, continuous data, *i.e.* weight, eggs numbers, fertilization rates, atretic oocytes numbers were analyzed using the Kruskal–Wallis test with Dunn's *post hoc* test when appropriate. Proportions, *i.e.* fertilization rate categorization and follicle-stage proportions were analyzed using chi-square test. In other cases, statistical tests are indicated. Statistical analysis was performed with Statistica 9.0 (StatSoft) or Prism 5.0 (GraphPad). Unless otherwise stated, values are indicated as mean \pm SEM. Significance was set at $p < 0.05$.

2.3 Results

2.3.1 Fish contamination

The mixture designed to mimic environmental conditions with the concentration of each congener is presented in Tableau 7. In Solvent and Plain fish, CB-153 concentration ranged from 12 ng/g dw at the beginning of the experiment to 40 ng/g dw after 230 days of exposure. Since concentrations in both control groups showed no significant difference (Paired Student's t-test; $p > 0.05$ $n=4$), they were all considered together. All congeners administered in spiked food were detected in exposed fish at higher concentrations than in control fish. As shown in Figure 27, linear PCB accumulation kinetics were observed in fish during the first three months of exposure and in a similar manner for males and females. From this time point, CB-153 concentration in females became highly variable in the [351-1644] ng/g range for PCB-Medium exposed females and in the [990-9305] ng/g range for PCB-High exposed females. In most cases, females with low CB-153 concentrations were sampled immediately after having spawned (open circle in Figure 27), which suggests that females may expel PCBs through spawning. This hypothesis was confirmed as CB-153 concentration in control eggs is less than 0.1 ng/g fresh weight (fw) while for eggs produced by females exposed to PCB-Medium diet, CB-153 concentration was 16.0 ± 0.8 ng/g fw and 47.6 ± 7.8 ng/g fw for the PCB-High diet (see Figure 28 for the increases observed in PCB-Medium and PCB-High eggs *versus* control eggs).

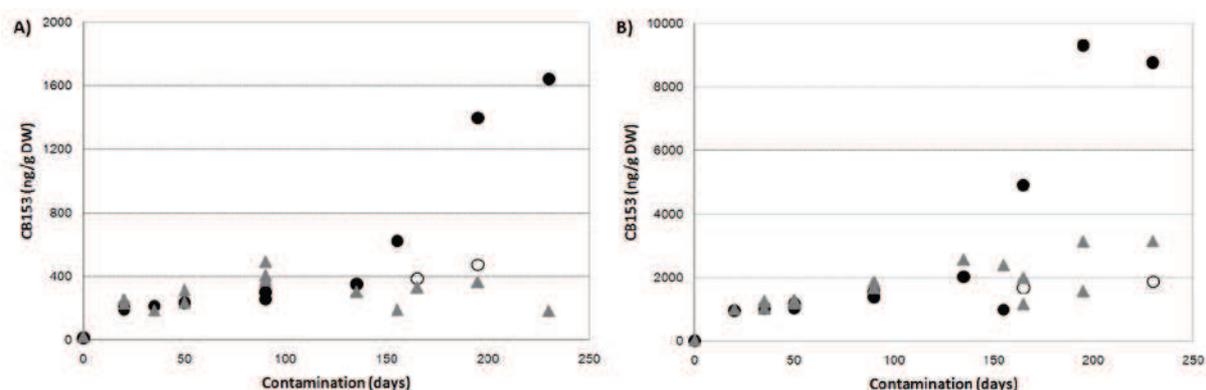


Figure 27 : PCBs concentration in fish over-time

Concentration of CB-153 as a representative of all congeners has been determined for males (triangle) and females (filled circle) after exposure to PCB-Medium (A), or PCB-High (B) diets. In both cases, concentration of PCBs has also been determined in females just after spawning (empty circle)

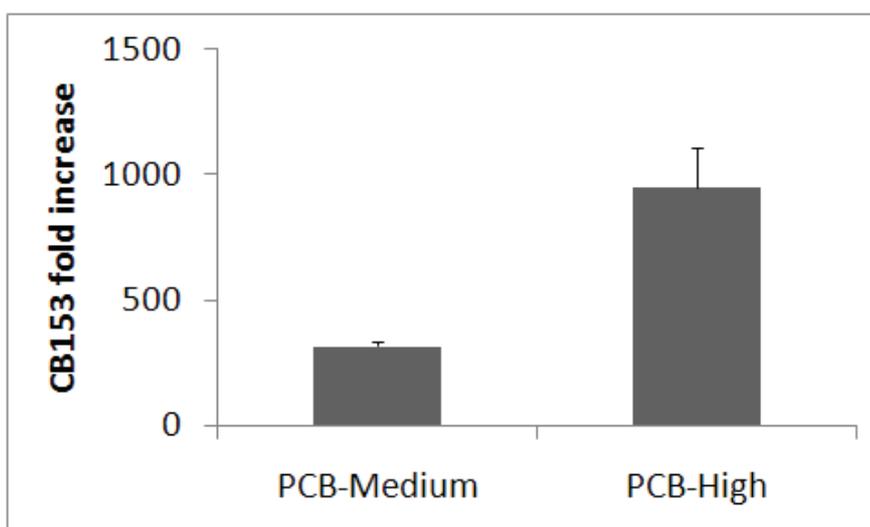


Figure 28 : PCB concentration in eggs
Fold-increase of CB-153 concentration in egg spawn by females exposed to PCB-Medium and PCB-High diets compared with Solvent diet

2.3.2 Physiological indexes

Over the 300 days of contamination, we noticed no changes in survival rate between groups (Tableau 8). During the first 52 days of contamination (3 biometries), fish of both sexes were considered together since sex could not be unequivocally determined for every fish. Afterwards, when all fish were sexed, size and weight were calculated for each sex. Whatever the diet, we observed no differences in growth between groups as ascertained by comparison of final weight, specific growth rate (SGR) or condition index (not shown), which were all unchanged (Tableau 8). Final weight and SGR displayed a very large inter individual variability.

Tableau 8 : Biometry and survival among different groups
Initial and final weight and mean SGR over the period for male and female and survival rate for both sex exposed to control feeds or PCB diets, measured after 247 days of exposure (mean \pm SD). There is no significant difference between groups

<i>Dose group</i>	<i>Initial weight</i>	<i>Final weight male (mg)</i>	<i>SGR male</i>	<i>Final weight female (mg)</i>	<i>SGR female</i>	<i>Survival rate (%)</i>
Plain	196 \pm 81	641 \pm 70	0.33 \pm 0.5	929 \pm 219	0.62 \pm 0.45	69.6 \pm 21.9
Solvent	224 \pm 75	594 \pm 94	0.42 \pm 0.2	1008 \pm 200	0.54 \pm 0.64	56.9 \pm 13.7
PCB100	215 \pm 83	623 \pm 117	0.35 \pm 0.44	1036 \pm 251	0.67 \pm 0.74	78.9 \pm 13.9
PCB500	217 \pm 82	598 \pm 136	0.42 \pm 0.6	1030 \pm 287	0.63 \pm 0.71	64.8 \pm 12.3

We determined the LSI and GSI for females in each group and observed no significant differences in any of these variables compared with Solvent fish (Tableau 9).

Tableau 9 : Organs biometry

Mean liver somatic index (LSI) and gonad somatic index (GSI) measured after 247 days of exposure for female (\pm SEM); There is no significant difference between groups

<i>Dose group</i>	<i>Fish (n)</i>	<i>LSI</i>	<i>GSI</i>
Plain	9	2.29 \pm 0.22	14.22 \pm 1.17
Solvent	8	3.16 \pm 0.27	15.39 \pm 2.24
PCB-Medium	10	3.09 \pm 0.29	17.75 \pm 1.84
PCB-High	11	2.56 \pm 0.28	14.00 \pm 1.42

2.3.3 Reproduction

Although onset of spawning appears delayed after exposure to PCBs, there were no significant differences between the different conditions ($p=0.769$). On average, Solvent fish began to spawn at day 73.7 ± 25.7 , whereas contaminated fish began to spawn at day 93.2 ± 17.5 for PCB-Medium and day 109.8 ± 14.5 for PCB-High (Tableau 10).

Tableau 10 : Spawn characteristics

Mean of spawning onset, total size of spawn, number of fertilized eggs per spawns and calculated mean fertilization rate obtained from adults exposed to control or PCB diets. The number in parenthesis after the spawning onset value indicates the number of tanks considered. (mean \pm SEM; * $p<0.05$).

	<i>Spawning onset (days)</i>	<i>Spawns (n)</i>	<i>Number of eggs</i>	<i>Number of fertilized eggs</i>	<i>Fertilization rate (%)</i>
Plain	126.7 \pm 1.2 (3)	23	408.4 \pm 43.1	317.3 \pm 38.6	80.7 \pm 6.3
Solvent	73.7 \pm 25.7 (3)	48	422.6 \pm 36.9	378.4 \pm 37.5	84.8 \pm 3.9
PCB-Medium	93.2 \pm 17.5 (6)	48	434.1 \pm 32.6	277.9 \pm 31.9	62.9 \pm 5.3 *
PCB-High	109.8 \pm 14.5 (6)	41	384.6 \pm 38.5	236.2 \pm 34.3 *	62.6 \pm 6.0 *

Embryonic development was assessed throughout the duration of this study. We observed neither modification of embryonic development nor changes in the rate of development. We observed no differences in embryo survival, which was assessed until death of all larvae in absence of feeding (data not shown).

Although there was a trend in reduction of spawn size for PCB-High couples, there is no significant difference in the number of eggs per spawn (Tableau 10). However, if we consider the numbers of fertilized eggs, we observe a trend for PCB-Medium and a significant reduction for PCB-High with approximately one third less fertilized eggs per spawn compared with control spawn. Surprisingly, the fertilization rate is similar for PCB-Medium and PCB-High around 63%, *versus* 85% for Solvent control.

Since we obtained highly fertilized spawn from PCB-High couples, we analyzed in more detail the distribution of fertilization rate for each spawn (Figure 29). In control fish, most of the spawns were highly fertilized with around 80% of spawns with a fertilization rate over 80% and less than 10% of spawns with a fertilization rate below 40%. Spawns from PCB-Medium or PCB-High couples were mainly characterized by a reduction of highly fertilized spawns (less than 50%) and an increase of poorly fertilized spawns (around 30%).

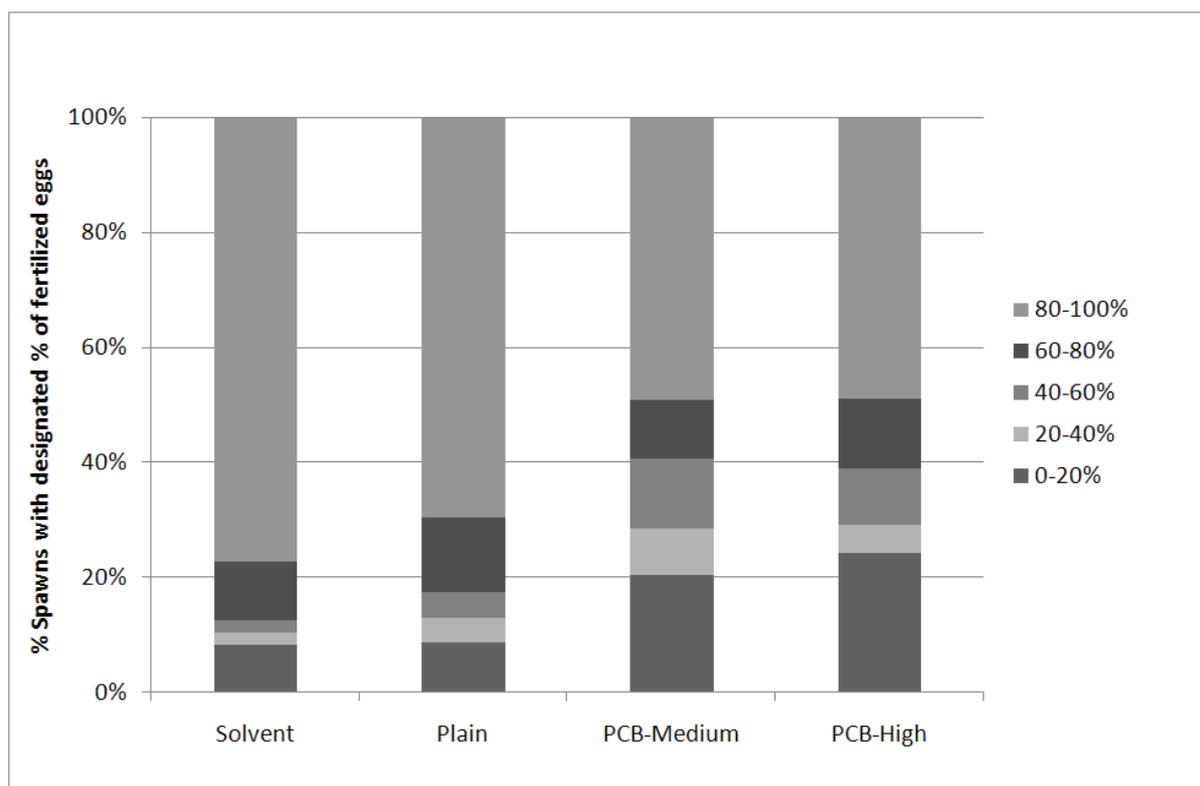


Figure 29 : Spawn quality distribution
Distribution of fertilization rate frequencies obtained from adults exposed to control or PCB diets. Chi-square test indicates that the distributions are different ($p=0.0002$)

Crosses performed using Solvent and PCB-High fish showed that the fertilization rate was impaired regardless of the sex of the contaminated fish (Figure 30-A) with the same modification of fertilization rate distribution (Figure 30-B). This indicated that the lowering of fertilization rate following PCB exposure was not due to a particular sex. Surprisingly, no additive effect was observed when two contaminated fish were crossed.

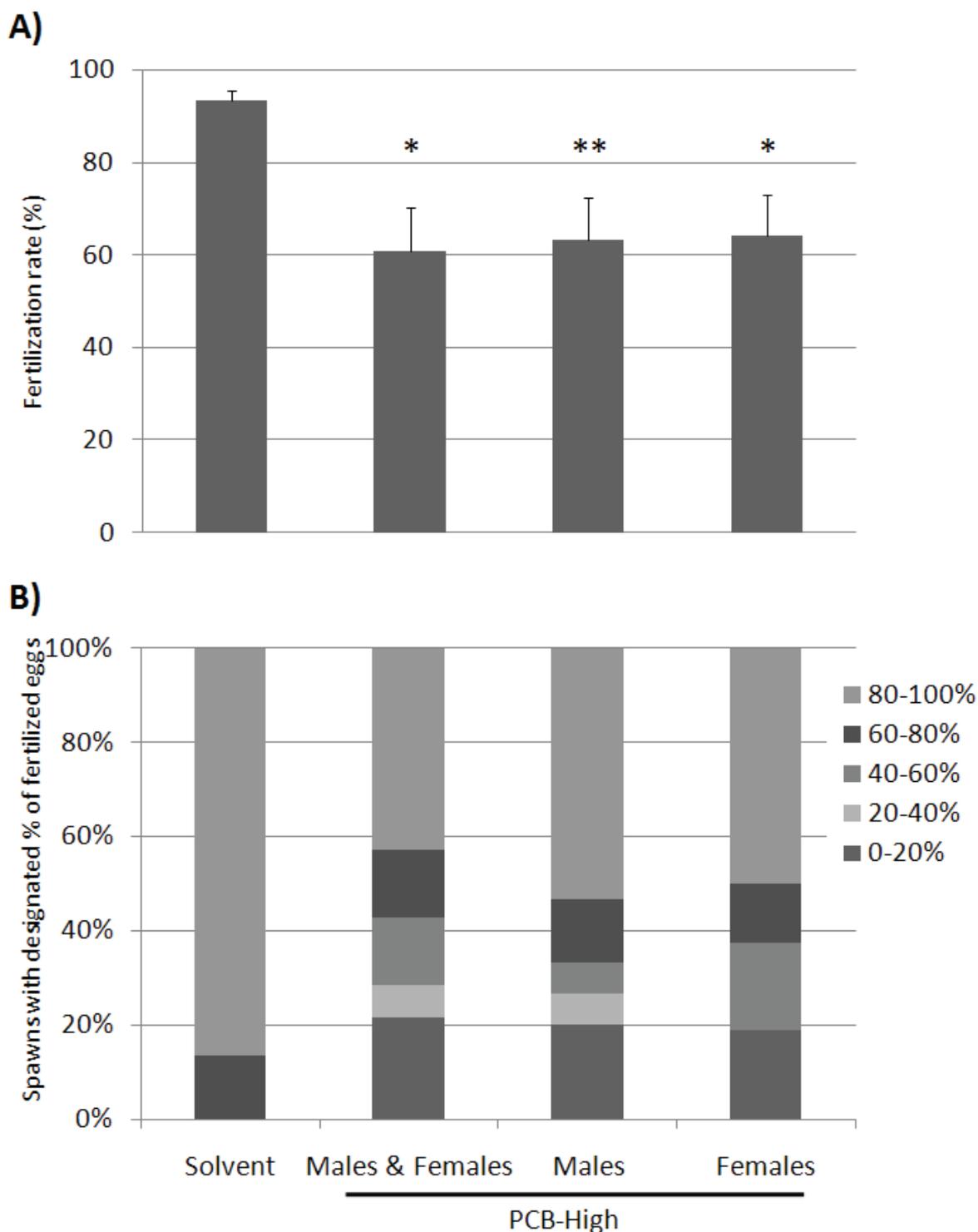


Figure 30 : Spawn quality distribution according to sex of the contaminated fish.

A) Fertilization rate obtained from adults exposed to control or PCB diets. In Solvent group both fish are from the Solvent group (n=15 spawns) while other 3 conditions the sex of fish fed PCB-high is indicated at the bottom of the figure. In the case only one fish has been fed PCB-High diet, the other fish is from Solvent group. Number of spawns are n=14 for Males & Females, n=15 for Males and n=16 for Females. (mean \pm SEM; *p<0.05; **p<0.01). B) Percentage of spawns with the designated rate for spawns described above. Chi-square test indicates that the distributions are different (p<0.0001).

2.3.4 Gonad histology and follicle atresia

Irrespective of the diet, examination of whole male gonads revealed the presence of testis with typical architecture, and normal spermatogenesis as evaluated by histology (not shown). A quantitative evaluation of the testicular areas occupied by spermatids revealed no differences between control and exposed fish. Ovaries of one-year old females displayed different features depending on diet. The main tissue alterations were then quantified. Relative frequencies of all four stages of follicles including, pre-vitellogenic stages 1 and 2, vitellogenic and post-vitellogenic, were first assessed. Both PCB-Medium and PCB-High female ovaries were characterized by a trend towards a higher proportion of pre-vitellogenic stage-1 oocytes, albeit not significant. In PCB-High females, there was a highly significant lower proportion of pre-vitellogenic stage 2, vitellogenic and post-vitellogenic stages (Figure 30).

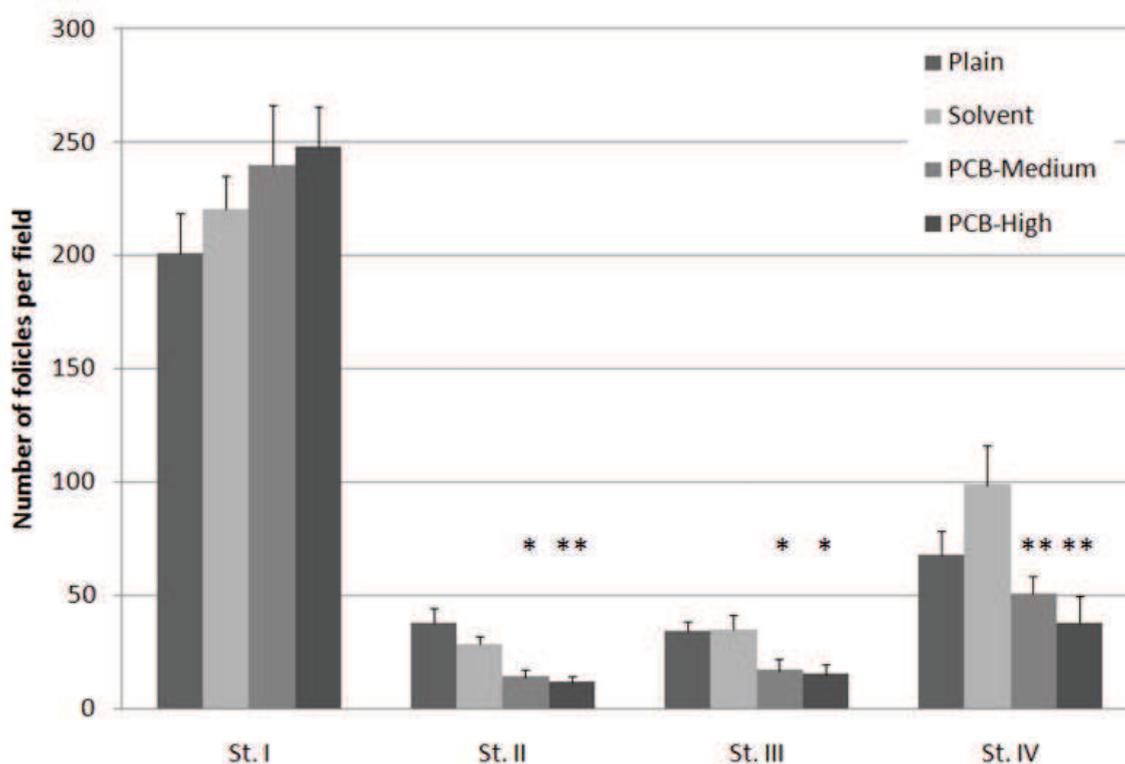


Figure 31 : Follicle stages

Number of different follicles in ovaries of females exposed to control or PCB diets according to their stage. The statistical significance of the differences was calculated for each stage between the different groups using an ANOVA and a PLSD Fisher test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)

Major alterations of oocytic maturation were observed in 4 out of 10 PCB-High fish with a complete absence of vitellogenic and post-vitellogenic stages. In these cases, ovarian tissue

was only composed of pre-vitellogenic stages and interstitial tissue was markedly infiltrated by inflammatory cells, mainly macrophages and lymphocytes (Figure 31).

Ovaries from PCBs females were also characterized by an increase in the number of atretic follicles. In control fish, the number of atretic follicles per microscopic field (mean \pm SEM) is 1.18 ± 0.28 in Nature females and 0.76 ± 0.23 in Solvent females. These numbers were tripled in PCB-exposed females to 3.19 ± 0.54 for PCB-Medium and 3.70 ± 0.45 for PCB-High (only ovaries with all four stages of follicles could be considered; $p < 0.01$). The presence of atretic follicles was often associated with a peripheral influx of some macrophages phagocytizing oocytic debris.

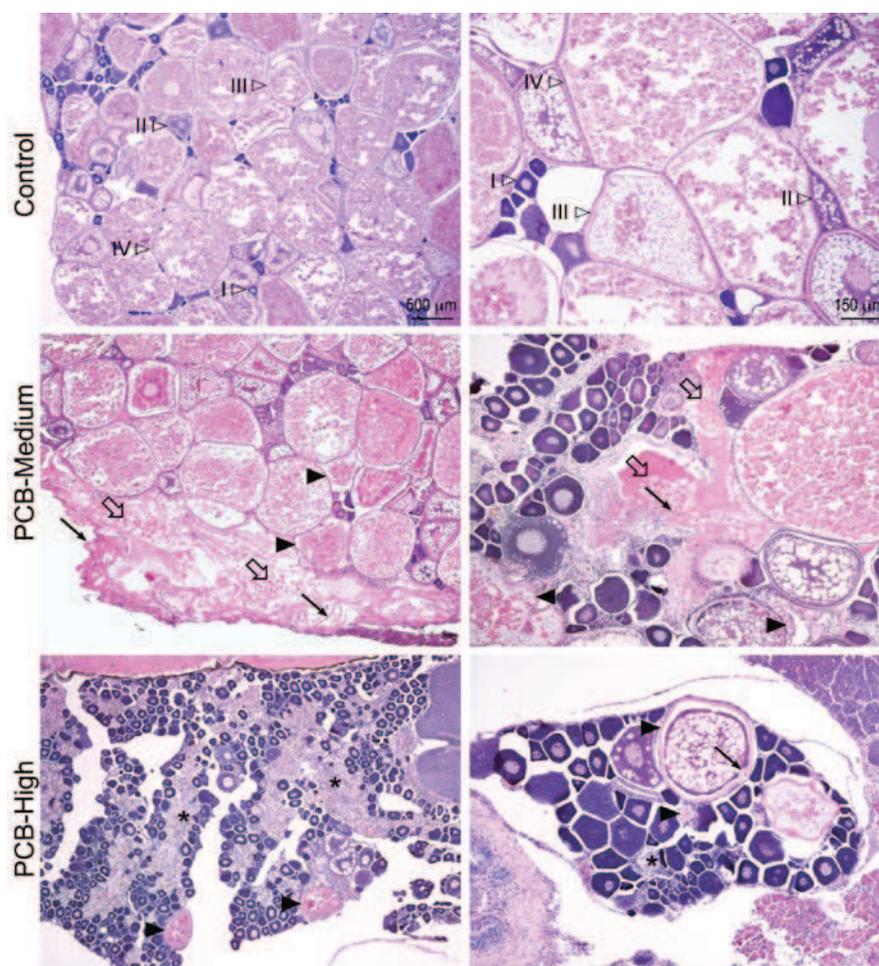


Figure 32 : Histological structure of ovaries

Zebrafish female ovaries stained with HES were photographed at low (left) and medium (right) magnification. The different stages of maturation of ovarian follicles (I-IV) can be identified in the ovary of a control fish (Solvent and Plain). The ovary from fish exposed to PCB-Medium diet (middle panel) presents a number of atretic follicles (arrow head) as well as oocyte clusters in which there are fragments of vitelline membrane (full arrow) and yolk granules (open arrow). The number of follicles at stage III (vitellogenic) and stage IV

(mature oocyte) is slightly decreased compared with the control. The ovary of fish exposed to PCB-High diet (lower panel) presents an almost complete absence of follicular stages III and IV. A few rare follicles at stage IV are atretic (arrow head) with a vitelline membrane forming characteristic folds (full arrow). Follicular depletion leaves large coalescent areas, corresponding to a granulomatous inflammatory reaction (*)

2.4 Discussion

In this study, we exposed zebrafish to mixtures of PCBs mimicking some environmental situations (as Loire or Seine estuary) through the diet over 300 days. This long period represents almost half the lifespan of zebrafish under laboratory conditions and includes approximately 200 days of reproduction.

PCBs are very persistent pollutants because of their high lipophilicity, very limited biotransformation, and slow depuration. Our findings are in agreement with these elements with a time- and dose-dependent increase in PCBs concentration in fish bodies (Andersson *et al.*, 2001).

No steady-state was achieved for any concentration during the exposure time. The uptake curves observed in this experiment were typical of those observed by other authors during bioaccumulation studies of hydrophobic contaminants in fish (Fisk *et al.*, 2001 ; Tomy *et al.*, 2004). Concentration in fish is directly related to the concentration in diets. During the first 90 days of contamination, CB-153 concentration in male and female follows a similar kinetic. After this time point, there was a clear differentiation in contamination levels between males and females. For females with the lowest CB-153 concentration (identified immediately after spawning), this level was similar to that of males whereas some females had CB-153 concentrations four- to fivefold higher than in males. Differences between females may be related to the expulsion of PCBs during spawning as we found some PCBs in eggs at a concentration that correlated with the level in females. However, the quantity of PCBs contained in a spawn cannot account for the difference between heavily contaminated females and females which have spawned. It should nevertheless be noted that in a tank, competition exists between females and dominance can greatly reduce the number of spawning females (Gerlach, 2006). It is thus possible that heavily contaminated females are dominated females with a low number of spawns and thus reduced expulsion of PCBs.

Several studies have already been performed to establish the physiological consequences of exposure of zebrafish to PCB among other fish (Thomas, 1989 ; Holm *et al.*, 1994 ; Örn *et al.*, 1998 ; Fisher *et al.*, 2003 ; McCarthy *et al.*, 2003 ; Schmidt *et al.*, 2005 ; Gillardin *et al.*, 2009). However, in many cases only one congener is studied while PCBs always occur as mixtures in the wild, in addition doses and/or exposure route may not be relevant. All of these data are very useful to understand the mechanisms underlying possible effects of exposure to PCBs but they may not reflect what happens in an environment contaminated with PCBs. The composition of the mixtures that we have used has been designed to closely mimic environmental situations in a biological matrix respecting relative proportions of each congener (Muir *et al.*, 2003 ; Antunes *et al.*, 2007 ; Bodiguel *et al.*, 2009) and concentrations have been chosen to reflect the actual concentration in medium and heavily contaminated areas (respectively Loire and Seine estuaries).

Recruitment is the ability of an embryo or a fish to participate in the production of next generation. This includes the ability of an embryo to reach adulthood, and for the adult, the ability to produce gametes suitable for reproduction in terms of quantity and quality. In the present study, we investigated several endpoints related to recruitment including survival of larvae produced by adults exposed to PCBs, egg production, and fertilization rates. For these reasons, we have monitored endpoints which may potentially account for the ability of fish to participate in recruitment using a model species.

There were no differences in the global physiological parameters that we measured including, survival, growth, and organ weight. These results clearly differ from those reported by Örn *et al.* (1998) who found an increase in mortality and a reduction of body weight, LSI, and GSI in their intermediate- and high-dose groups. As mentioned above, the authors used an equivalent dose of the twenty chosen congeners with 80ng/g food for the intermediate dose and 400ng/g of highly toxic co-planar congeners 126 and 169 (Örn *et al.*, 1998), which are absent from the mixture that we used. It has also been reported that survival is reduced following direct aqueous exposure of summer flounder larvae to CB-126 congeners (Soffientino *et al.*, 2010). Co-planar effects are thought to be mediated by AhR and therefore may elicit a dioxin wasting syndrome which includes weight loss and sometimes death (Walker, 1994). However, in some cases, exposure to PCB promote growth; this has been observed after long-term exposure to food dosed with Clophen A50 (Bengtsson, 1980). Increase of growth has also been described in zebrafish exposed to mixtures of POP including DDT and PBDEs in

addition to PCBs (Nourizadeh-Lillabadi *et al.*, 2009 ; Lyche *et al.*, 2010). Our results nevertheless agree with those demonstrating an absence of correlation between fish growth and the load of PCBs in wild fish (Bodiguel *et al.*, 2009 ; Rypel & Bayne, 2010) or experimental models (Loizeau *et al.*, in preparation). Mortality and growth alteration thus appear to be induced in fish after exposure to co-planar PCBs congeners, in particular CB-126.

PCBs have been reported to disrupt endocrine activity in fish and other vertebrates including humans (Mills & Chichester, 2005 ; Crain *et al.*, 2008 ; Mendola *et al.*, 2008). This has been demonstrated at the molecular level (e.g. hormone or genes expression levels), the cellular level, in organs (e.g. gametes properties or GSI), and individuals (e.g. spawning events, embryo development). To gain insights into the mechanisms underlying alterations in reproduction after exposure to PCBs, and to evaluate the functional consequences of this exposure, several endpoints were monitored.

No embryonic deformities or changes in larval survival rates were observed after exposure of parents to PCBs. Again, it appears that the effects depend upon the congeners studied. Several studies report alterations of fish embryonic development or survival after exposure to PCBs. This is the case of exposure to Aroclor 1254 or CB-126 which cause general embryotoxicity (McCarthy *et al.*, 2003), alterations in embryonic growth (Na *et al.*, 2009), and changes in heart development (Grimes *et al.*, 2008). Exposure to individual congeners, such as CB-126 or CB-77, can reduce fish-embryo survival (Monosson, 1999 ; Foekema *et al.*, 2008 ; Grimes *et al.*, 2008 ; Soffientino *et al.*, 2010). This has also been demonstrated after exposures to complex mixtures (Örn *et al.*, 1998). However, as mentioned above, CB-126 and CB-169 in this study were present at high levels. In contrast, exposure to PCB-48 technical mixture, which among other PCBs contains high levels of CB-77, did not alter larval survival rate at 10 days post-hatching (Nakayama *et al.*, 2005). Alterations in survival have been reported with other congeners or mixtures for zebrafish embryos after intraperitoneal injection of females with 1 µmol kg⁻¹ CB-60, CB-104, and CB-190 (Olsson *et al.*, 1999) and for minnow embryos after exposure to Clophen A50 (Bengtsson, 1980).

We conclude that the PCBs mixture that was used in the present study has no effect on egg development and viability either through egg quality or embryonic development. The

deleterious effects reported in other studies are mainly due to the use of coplanar dioxin-like congeners.

We observed alterations in ovary structure in both contaminated groups with a dose effect. Indeed, there was a decrease in the proportion of stage 2 to 4 follicles in PCB-Medium female ovaries and in a six out of ten PCB-High female ovaries. This phenotype gets worse for the remaining PCB-High females with the absence of maturing stage 3 and 4 oocytes. These phenotypes are associated with an increase of atretic follicles in females fed both contaminated diets. These observations agree with previous reports of increased in atretic follicles after exposure to PCBs (Cross & Jo Ellen, 1988) and a bias towards primary follicles (Örn *et al.*, 1998). It is to note that exposures presented here began after sex determination but overlap with differentiation of both sex gonads (Orban *et al.*, 2009). However, the present study is the first report of such ovary anomalies after exposure to a mixture of PCBs mimicking some environmental situations. Our approach is thus suitable to investigate mechanisms underlying the alterations in ovary function that occur in polluted environments.

At the functional level, we observed a significant reduction of the overall fertilization rate. This was not due to a reduction of fertilization of each spawn but instead to an increase in the number of poorly fertilized spawns at the expense of highly fertilized ones. To our knowledge, this is the first report that a mixture of PCBs mimicking some environmental situations can decrease the fertilization rate of fish spawns. Our study revealed that, irrespective of the sex of the contaminated fish, a strong decrease of fertilization rate is observed with a non-additive effect when both males and females are contaminated. Alteration of fertility has already been reported for several vertebrate species (Pocar *et al.*, 2006 ; Letcher *et al.*, 2010). Reduction of fertility has also been described for oocytes directly incubated in PCBs and then submitted to *in vitro* fertilization (Campagna *et al.*, 2001). Several mechanisms could underlie this reduction. There may be alterations in oocyte competence (Krogenaes *et al.*, 1998), or sperm quality or release. We did not observe gross alterations of testes structure, but sperm defects appear to be more related to sperm properties (Hauser *et al.*, 2003 ; Richthoff *et al.*, 2003 ; Njiwa *et al.*, 2004). Fertilization and/or sperm release defects can also be due to alterations in male reproductive behavior (Njiwa *et al.*, 2004). The absence of additive effects of female and male alterations on the fertilization rate

is puzzling. However, several reports have shown that PCBs can act as both oestrogenic and anti-oestrogenic depending on their chlorination level (Plísková *et al.*, 2005).

In summary, our study shows that PCBs mixtures representatives of some environmental situations may lead to changes in the reproduction abilities of fish that may impair recruitment and population stability. Several questions remain unanswered, in particular concerning the timing of structural damage to the ovaries and the mechanisms underlying alteration in fertilization rate for both females and males.

2.5 Conclusions

Our data indicate that exposing zebrafish to mixtures of PCBs through diet leads to contamination of fish with a clear bioaccumulation and a transfer from adult females to eggs.

In terms of physiology, we observed alterations of ovary structure with an increase of atresia which can be related to a decrease in the number of eggs per spawn and fertilization. This can be combined with a decrease in the number of spawn per female. These findings indicate that, despite starting breeding under ideal conditions for reproduction, an exposure to mixtures of PCBs mimicking can lead to a dramatic reduction in the number of offspring produced by a female over a lifetime. This is of great concern for wild species living in natural conditions. More studies are needed to identify the mechanisms underlying these observations and a new series of exposures is currently underway.

Acknowledgments

We thank Marie-Laure Bégout for valuable comments on the manuscript, and Didier Leguay for laboratory assistance. This study was supported by the Conseil Général de Charente maritime (PhD fellowship for TD) and EC2CO-Cytrix (grant GénérationPOP to XC).

Les références de cet article ont été incluses dans celles de la thèse.

3 Travaux complémentaires

En plus de la caractérisation des effets physiologiques d'une contamination par les PCB, les expositions qui viennent d'être décrites ont également permis de réaliser un certain nombre d'autres objectifs du projet GénérationPOP. Un des objectifs du thèse était de mettre en place un modèle DEB pour le poisson zèbre pour pouvoir ébaucher un modèle générique des effets d'une exposition à des PCB sur la physiologie des poissons et de leur bioaccumulation, en particulier par comparaison avec les modèles déjà mis en place sur ce sujet pour la sole (Eichinger *et al.*, 2010) et le merlu (Bodiguel *et al.*, 2009). La mise en place de ce modèle pourra aussi permettre de mettre en place les bases d'un transfert au niveau des populations.

A ce titre, je suis associé aux articles suivants qui sont en cours de rédaction :

1) Bioaccumulation des PCB après contamination par voie trophique de poissons zèbres juvéniles et adultes. Mise en évidence d'une bioaccumulation et d'un transfert différentiels vers les œufs. Une partie des principaux résultats sont présentés ci-après sous la forme de figures légendées.

2) Pour mettre en place un modèle de type DEB, il a été nécessaire de disposer de données individuelles de croissance et de reproduction pour chacune des conditions étudiées. J'ai participé au développement d'une approche de marquage individuel de poisson zèbre au sein du laboratoire. Cette technique n'a jamais été décrite et un article est en cours de rédaction. Le résumé de cet article est présenté dans les pages suivantes.

3.1 Article en cours de rédaction : Bioaccumulation des PCB après contamination par voie trophique de poissons zèbres juvéniles et adultes. Mise en évidence d'une bioaccumulation et d'un transfert différentiels vers les œufs

Tarek Daouk, François Rroupsard, Laura Lyphout, Anne-Marie Le Guellec, Xavier Cousin & Véronique Loizeau

L'analyse des données est toujours en cours ; néanmoins, certains résultats permettent déjà de confirmer et d'enrichir les observations préliminaires réalisées lors de la première exposition.

➔ La bioaccumulation varie en fonction des congénères (Figure 33-A) mais semble indépendante du nombre de substitutions (Figure 33-B). On observe, comme cela a été suggéré par les résultats de la première exposition, que les congénères CB-105 et CB-149 sont

faiblement bioaccumulés par rapport au CB-153. Il n'y a pas de corrélation forte entre la bioaccumulation et le nombre de substitutions ; cependant, il est possible que ce nombre de substitution ou l'encombrement de la molécule interviennent pour les congénères faiblement substitués tels que le CB-28 et le CB-52. Il semble que la bioaccumulation différentielle ne soit influencée ni par le temps, ni par la dose ni par le sexe. Ces résultats devront être confirmés.

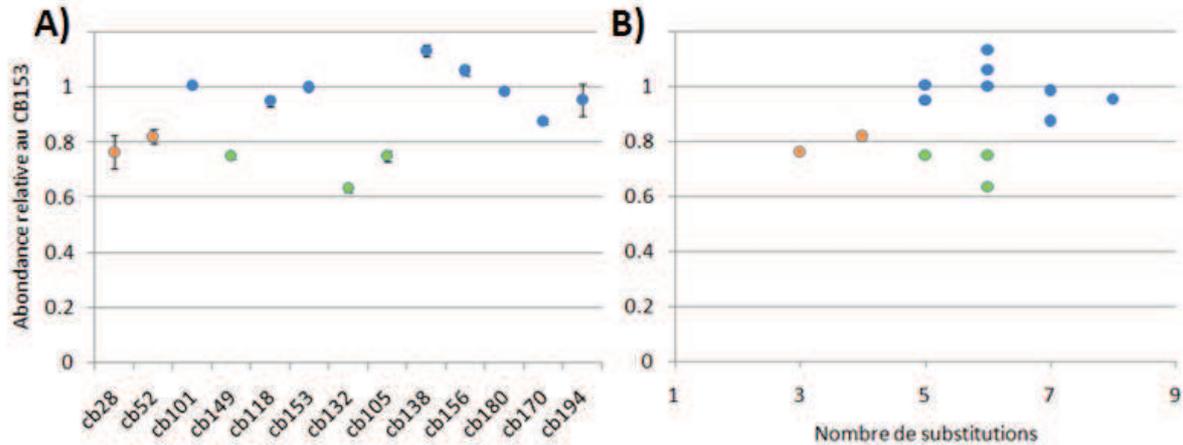


Figure 33 : Bioaccumulation des PCB

La bioaccumulation varie selon les congénères mais semble indépendante du nombre de substitutions. La concentration de chaque congénère mesurée dans les géniteurs a été rapportée à celle du CB-153, en fonction des concentrations de chaque congénère dans la nourriture. Une valeur de 1 indique une accumulation identique à celle du CB-153. Les niveaux de bioaccumulation sont indiqués en fonction des congénères (A) ou du nombre de substitutions (B). Les congénères indiqués en vert sont probablement métabolisés et/ou moins bien assimilés. Pour ceux indiqués en orange, il est difficile de conclure ; en effet, il est possible que pour ces congénères le faible nombre de substitutions intervienne.

→ Il apparaissait après les premières expositions que le transfert vers les œufs n'était pas identique pour tous les congénères. Cela est confirmé (Figure 34-A) puisque il y a un facteur 3 à 4 entre le congénère le moins transféré (CB-194) et le congénère le plus transféré (CB-28). Il est possible que la moindre bioaccumulation des congénères (CB-28, CB-52) observée dans les géniteurs soit liée à un transfert plus actif. Cette hypothèse devra être vérifiée. Contrairement à ce qui est observé pour la concentration dans les adultes, il existe une corrélation négative claire ($r^2 > 0.8$) entre le nombre de substitutions et le niveau de transfert vers les œufs (Figure 33-B).

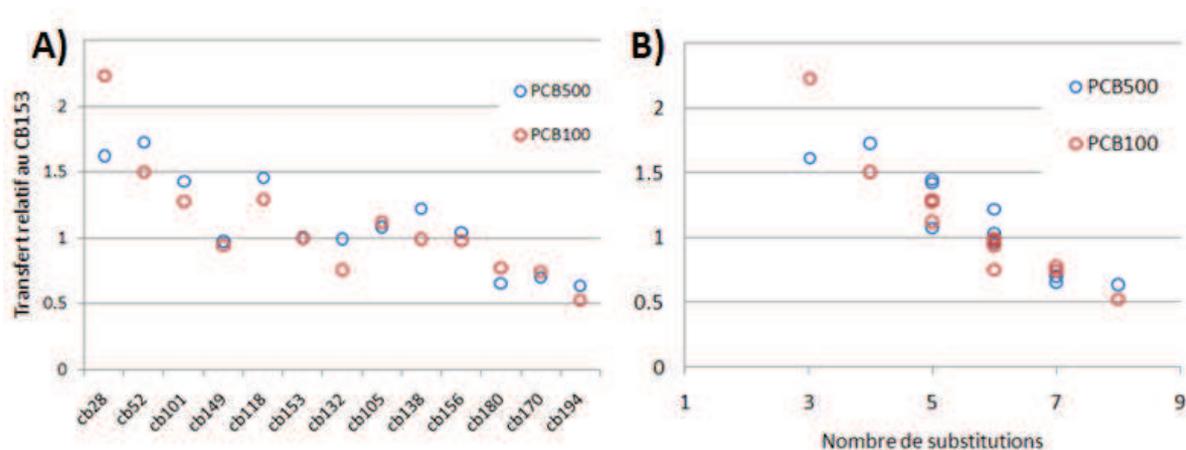


Figure 34 : Transfert des PCB dans les œufs

Le transfert vers les œufs varie selon les congénères et est négativement corrélé au nombre de substitutions. La concentration de chaque congénère mesurée dans les oeufs a été rapportée à celle du CB-153 en fonction des concentrations de chaque congénère dans l'aliment. Une valeur de 1 indique un transfert identique à celle du CB-153. Les niveaux de transfert sont indiqués en fonction des congénères (A) ou du nombre de substitutions (B).

Un certain nombre d'analyses sont toujours en cours de réalisation, en particulier pour mieux établir les corrélations existant entre les concentrations dans les adultes, notamment en fonction du sexe et dans les œufs. Sur le plan mécanistique, ces observations seront également considérées en fonction du taux de lipides et de leur nature.

3.2 Electronic individual identification of zebrafish using Nonatec® RFID tags - J Exp Biol. 2012 Aug 15;215(Pt 16):2729-34.

Xavier Cousin, Tarek Daouk, Samuel Péan, Laura Lyphout, Marie-Élise Schwartz & Marie-Laure Bégout

Identification is required when individual life history is sought-for within a situation of mixed specific lines (mutants, transgenic...) or when multiple challenges are planned on individuals bred in groups. Electronic individual tagging exists since long but mainly for fish > 40-55 mm and becomes challenging when it comes to zebrafish (<30 mm). RFID micro-tags (NONATEC®) were used for the first time to individually identify juvenile zebrafish (size 16-42 mm, mass 138-776 mg) and the effects of intracoelomic implantation on survival and tag loss, growth, exploratory behavior and spawning were studied. With the best practices, good success was achieved including high survival (97%) and low tag loss (13%). The smallest surviving fish was 178 mg in mass and 90% survival rate was achieved for fish above 326 mg (26 mm) in mass. No negative effects on growth and no significant differences in behavioral responses could be identified and spawning occurred in tagged fish.

Ce travail a également été présenté à l'oral lors du Workshop international :

Laura Lyphout, Samuel Péan, Marie-Elise Schwartz, Tarek Daouk, Marie-Laure Bégout, Xavier Cousin – Individual identification of zebrafish using Nonatec RFID tags. First meeting on emerging technologies in zebrafish. 25-26 novembre 2009, Bilbao.

Chapitre 3 : Etude des effets des HAP sur le développement des embryons de poisson zèbre en validant un test de sédiment-contact adapté aux molécules hydrophobes

Manuscrit en préparation

*Comparative sensitivity for several PAHs of early life stages of zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) by a sediment-contact fish embryo test*

Ludovic Vicquelin*, Tarek Daouk*, Jérôme Cachot, Farida Achka, Hélène Budzinski, Julien Filatreau, Julie Grasset, Laura Lyphout, Karyn Le Menach, Joëlle Leray, Xavier Cousin

**co-premiers auteurs*

1 Contexte expérimental

L'objectif de ce travail était de démontrer l'efficacité de l'approche sédiment-contact à rendre compte de la toxicité d'un sédiment, évaluée selon une large gamme d'indicateurs reconnus en écotoxicologie, en utilisant les embryons de deux espèces de poissons modèles, le poisson zèbre et le médaka japonais (*Oryzias latipes*). Les expositions avec le médaka ont été réalisées par Ludovic Vicquelin (doctorant de l'Université du Havre). Seules les expériences réalisées à L'Houmeau sur poisson zèbre seront présentées ici.

Plusieurs questions se posaient quant au choix de la procédure à utiliser. Était-il possible d'utiliser directement des sédiments contaminés ? Sinon quel type de sédiment utiliser ?

Les deux sites de référence du projet Génération POP, Yville et Oissel, se situent en Normandie (Figure 36). Yville est un site où le sédiment est sableux, fin et non contaminé. Le sédiment Oissel est vaseux et fortement contaminé aux HAP (une caractérisation chimique a été réalisée pour les deux sédiments) (Cachot *et al.*, 2006).

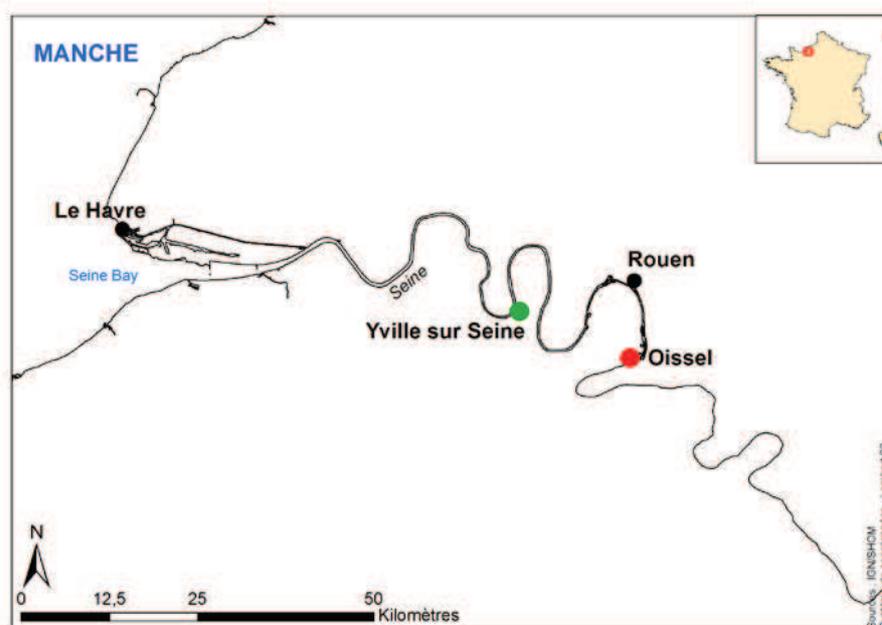


Figure 35 : Cartographie des deux sites Yville et Oissel

Pour répondre à la première question, à savoir "Est-il possible d'utiliser un sédiment natif ?", nous avons exposé des embryons de poisson zèbre à plusieurs sédiments naturels, incluant des sédiments vaseux ou sableux et des sédiments connus ou supposés être contaminés. Nous avons observé une baisse significative de la survie pour le sédiment d'Oissel et l'analyse de la morphologie des larves suggère que le développement est rapidement arrêté ou très ralenti

pendant l'exposition. Ces observations laissent alors penser à l'effet d'un déficit en oxygène pendant le développement au contact du sédiment, plutôt qu'à une toxicité intrinsèque du sédiment. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré la saturation en oxygène dissous dans l'eau, à l'interface eau-sédiment, grâce à des microélectrodes (sonde TX3.V6.02 reliée au logiciel OXYVIEW). La Figure 37 présente un exemple de saturation en oxygène dissous dans l'eau, à l'interface eau-sédiment, grâce à des microélectrodes, obtenu avec deux types de sédiments représentatifs. Les résultats indiquent une diminution très rapide de la saturation en oxygène à l'interface eau-sédiment pour les sédiments de type vaseux. On observe que ce niveau passe en moins de 4h en dessous de la limite établie comme anoxique (Küster & Altenburger, 2008) pour le développement des embryons de poisson zèbre, ce qui confirme l'hypothèse d'une mortalité liée à un défaut d'oxygénation des embryons. L'évaluation directe de la toxicité des sédiments de type vaseux n'est donc pas possible, en particulier en utilisant une exposition statique sans renouvellement d'eau. Nous avons donc choisi d'utiliser un sédiment de référence compatible avec la survie des embryons et de l'enrober avec les fractions à tester, extraites à partir de sédiments naturels.

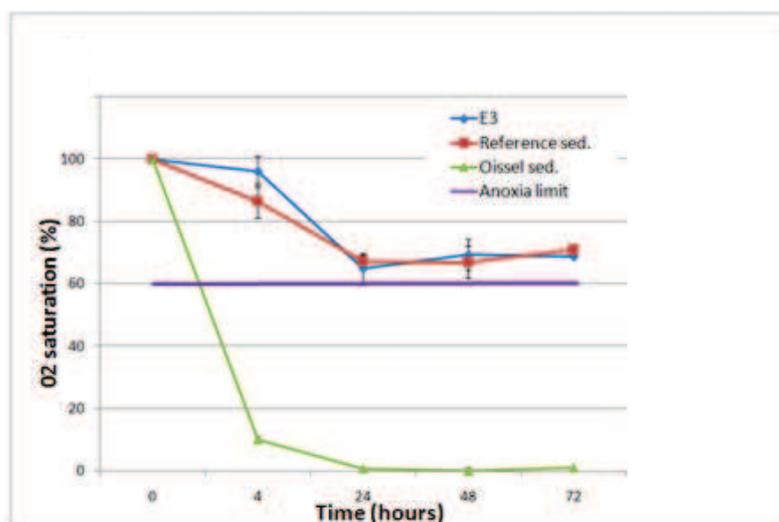


Figure 36 : Taux de saturation en oxygène d'embryons exposés à différents sédiments Mesuré à l'interface eau-sédiment pour le sédiment d'Oïssel et le sédiment de référence (Yville).

Plusieurs options étaient possibles, en particulier le choix d'une matrice artificielle versus un sédiment naturel ne présentant aucune toxicité intrinsèque. L'avantage d'une matrice artificielle réside en particulier dans l'homogénéité de la matrice et dans la possibilité de généralisation à d'autres laboratoires. Cependant, dans le milieu naturel, les contaminants organiques sont associés à la matière organique présente dans le sédiment (Schorer & Eisele, 1997), impliquant d'inclure de la matière organique à cette matrice artificielle pour permettre

son enrobage, ce qui réintroduit une part d'hétérogénéité dans la procédure. Enfin, contrairement à un sédiment de référence naturel, une matrice artificielle n'est pas représentative de situations environnementales. En utilisant un sédiment naturel, il est possible de s'affranchir de la nécessité d'ajouter de la matière organique et d'être représentatif de situations rencontrées dans l'environnement. Nous avons donc choisi d'utiliser comme matrice de référence le sédiment sableux collecté dans la gravière d'Yville-sur-Seine.

Pour valider la faisabilité de cette procédure, nous avons utilisé des HAP individuels respectant un profil environnemental présentant un spectre varié de toxicités : benzo[a]pyrène (B[a]P), pyrène (Pyr), fluoranthène (Flu) et 7,12-diméthylbenzo(a)anthracène (DMBA). Les concentrations visées pour l'enrobage étaient 0.5X, 1X, 5X, 25X et 100X. La concentration 1x respectant un profil environnemental moyenne relevée dans les sédiments d'Oissel et qui varie, selon les composés, de 500 à 1000 ng/g de sédiment (Figure 38).

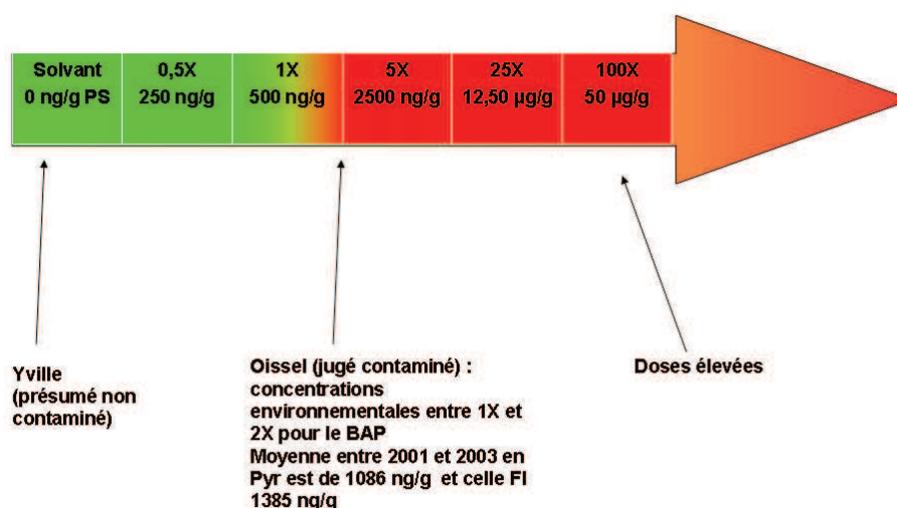


Figure 37 : Présentation de la gamme de concentration utilisée dans ce projet

2 Expositions

Les expositions se sont déroulées de 2008 à 2010. Nous avons exposé les embryons issus de géniteurs sauvages non contaminés. A partir d'un minimum de 3 pontes présentant un pourcentage de fécondation supérieur à 70% (90% dans la pratique), nous avons exposé, à partir du stade 2 hpf, 30 embryons en boîte de Petri contenant 3g de sédiment de référence ou

de sédiment de référence enrobé et 3 mL de E3 solution physiologique nécessaire pour le développement normal des embryons (voir Annexe 2, p.124). Les embryons puis les larves ont ensuite été analysés selon le planning décrit Figure 39.

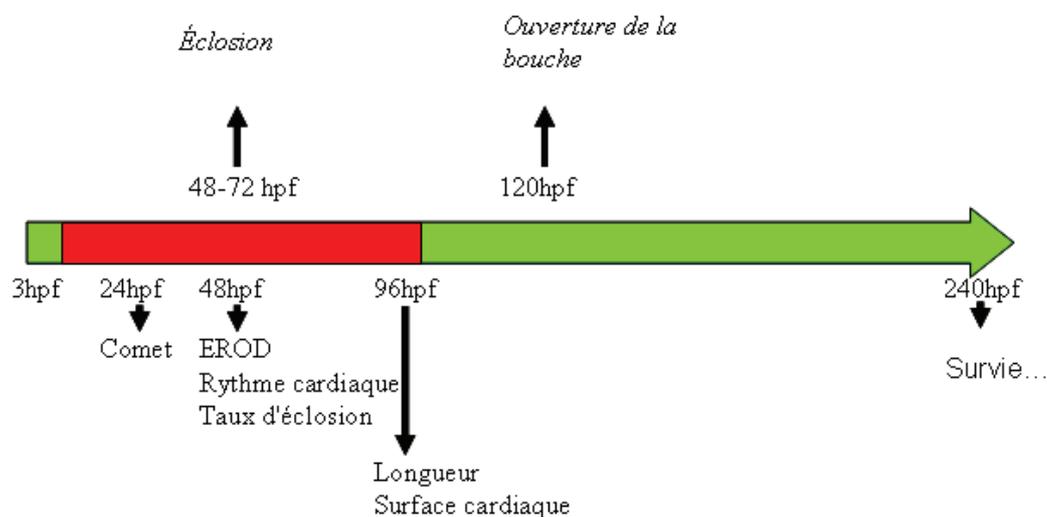


Figure 38 : Schéma résumant les différentes analyses réalisées lors de nos expériences de contamination par les 4 HAP

La partie rouge indique la période pendant laquelle les embryons sont exposés au sédiment. A 96h, ils sont transférés en milieu d'élevage (E3).

3 Résultats

Durant cette série d'expériences réalisées en *triplicata*, plusieurs paramètres ont été évalués. Les principaux résultats sont présentés ci-dessous.

Le suivi de la mortalité est réalisé du premier au dixième jour. Les larves ne sont pas nourries pendant la durée de l'expérience. L'incubation dans ces conditions n'entraîne pas de mortalité chez les embryons ou larves exposés au sédiment de référence (Yville), non enrobé ou enrobé avec le solvant (dichlorométhane) ayant servi aux enrobages de HAP. Sans alimentation, les larves survivent environ 14 jours (336h) de leurs réserves vitellines.

Les résultats d'exposition à des HAP individuels sont présentés dans le Tableau 11 ci-dessous.

Tableau 11 : Médiane du temps de survie

	Solvant	0.5X	1X	5X	25X	100X
DMBA	-	120h	48h	72h	48h	24h
Pyr	-	72h	72h	24h	48h	72h
Fl	-	-	-	72h	48h	24h
B[a]P	-	-	-	-	240h	216h

Ce paramètre est déduit des graphes de survie des embryons. Le tiret correspond aux conditions pour lesquelles la viabilité dépassait les 50% en fin d'expérience.

On observe que le DMBA est le plus embryotoxique des congénères utilisés, suivi par le pyrène. Ces 2 composés entraînent une mortalité significative à des doses environnementales avant l'éclosion (<96 hpf). Le fluoranthène est légèrement moins toxique ; néanmoins, une mortalité est observée au cours du développement embryonnaire avec un effet-dose. De façon surprenante, la mortalité induite par une exposition au B[a]P n'est pas élevée sachant que c'est un des HAP les plus toxique (Benford *et al.*, 2010). La mortalité ne survient que pour les doses très élevées, mais avec un décalage important dans le temps, plus de 5 jours après la fin de l'exposition ; le dosage rétrospectif des sédiments contaminés n'est pas réalisé à la fin de l'expérience ce qui limite les hypothèses expliquant ces résultats.

Nous avons ensuite évalué la génotoxicité à 24 hpf avec le test des comètes, en utilisant 3 embryons de chaque réplicat. Ce test permet d'identifier les cassures de brins d'ADN. Des congénères utilisés, seuls le B[a]P et le fluoranthène ont induit de la génotoxicité (Figure 40).

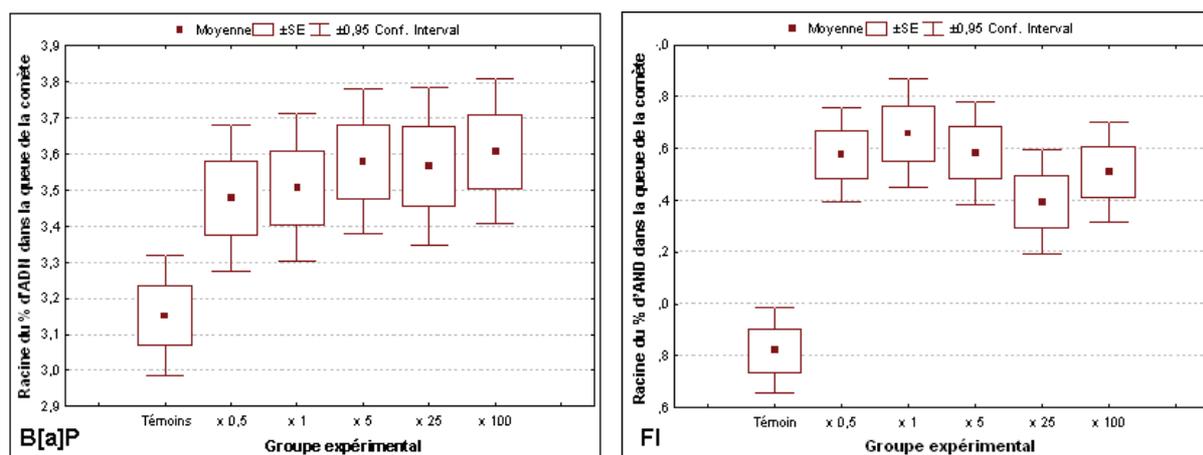


Figure 39: Test des comètes à 24 hpf

Les graphes représentent la proportion d'ADN dans la queue de la comète, soit l'altération de l'intégrité des noyaux pour le B[a]P en A, et le fluoranthène en B. Des témoins solvant pour chaque série sont réalisés comparaison impossible entre les expériences.

La génotoxicité du DMBA n'a pu être analysée de façon fiable en raison de la forte mortalité observée avec ce congénère.

A 48 hpf, nous souhaitons mesurer l'induction du cytochrome P450 en suivant l'activité EROD, selon le protocole développé par Noury *et al.*, (2006). Le protocole est détaillé en Annexe 4.6 (p. 143). Les inductions observées étaient vraiment minimales, laissant penser à un problème technique. Le protocole est en cours de modification.

Le rythme cardiaque a été mesuré à 48 hpf sur 5 embryons de chaque réplicat sans anesthésie. Le comptage est fait en temps réel à la loupe binoculaire, pendant trois fois 15 secondes. Comme on l'a vu en introduction, le rythme cardiaque évolue très rapidement entre 48 et 96 h. Les mesures sont donc réalisées en effectuant un roulement des conditions de façon à limiter le biais lié à la durée de la mesure (Figure 41).

Il apparaît que le pyrène provoque une bradycardie pour toutes les doses, même les doses environnementales (0.5X et 1X). *A contrario*, le DMBA provoque une tachycardie dès les plus faibles doses. On observe cependant un rythme maximum pour la dose 1X, et une diminution du rythme par la suite, de telle sorte que le rythme des embryons exposés à la dose 100X ne sont pas différents des contrôles. Il faut toutefois se rappeler que l'embryotoxicité de cette dose est très élevée. Le fluoranthène entraîne une légère tachycardie pour la dose 25X. La dose 100X n'a pu être analysée en raison du trop petit nombre de larves. Enfin, le B[a]P n'entraîne pas de différence significative du rythme cardiaque.

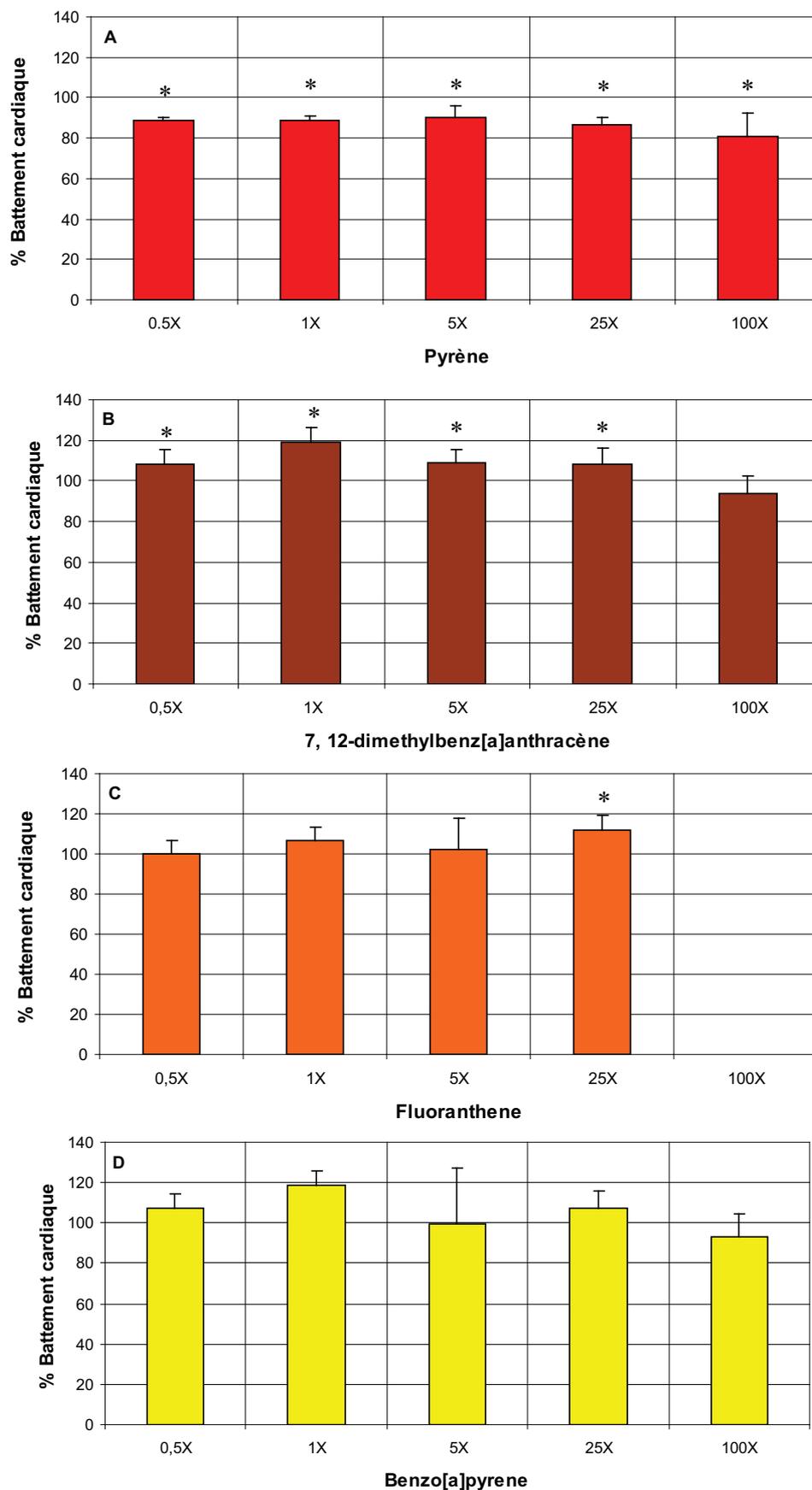


Figure 40 : Rythme cardiaque

Le rythme cardiaque est exprimé en pourcentage par rapport au rythme du témoin. Les différences significatives par rapport aux contrôles sont indiquées (* $p < 0.0001$).

A 96 hpf, les embryons vivants sont photographiés dans le but de caractériser d'éventuels défauts morphologiques. La surface cardiaque et la taille des embryons sont mesurées (Figure 42).

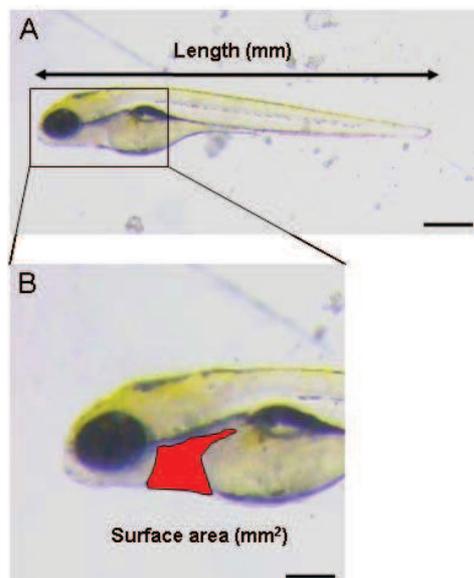


Figure 41 : Mesure de la longueur et de la chambre cardiaque

A) La ligne noire est utilisée pour mesurer la longueur des embryon en mm à 96 hpf (échelle-1 mm). B) Surface cardiaque en rouge $\text{mm}^2 \cdot 10^{-2}$ (échelle-0.5 mm).

Les résultats obtenus pour ces deux mesures sont indiqués dans les deux tableaux suivants.

Tableau 12 : Surface de la chambre cardiaque

La surface est en $\text{mm}^2 \cdot 10^{-2}$ (moyenne \pm écartype). Aucune des données contaminais n'est significativement différente de leur control respectif (chaque congénère de HAP constitue une série de contamination donc possède sont propre solvant).

	<i>Solvant</i>	<i>0.5X</i>	<i>1X</i>	<i>5X</i>	<i>25X</i>	<i>100X</i>
DMBA	2.99 \pm 0.72	3.29 \pm 0.93	3.36 \pm 0.73	3.06 \pm 0.81	2.94 \pm 0.68	3.18 \pm 0.87
Pyr	4.24 \pm 2.72	3.12 \pm 1.04	3.55 \pm 1.44	3.57 \pm 1.15	3.58 \pm 1.18	3.86 \pm 1.16
Fl	4.19 \pm 1.27	4.39 \pm 1.19	5.18 \pm 2.09	4.26 \pm 1.22	5.52 \pm 2.77	
B[a]P	3.83 \pm 0.96	4.08 \pm 1.06	4.24 \pm 1.09	4.12 \pm 0.96	3.91 \pm 1.39	3.52 \pm 0.77

Tableau 13 : Longueur des larves

La longueur moyenne est en mm (\pm écartype). Les différences significatives sont indiquées par un astérisque (Kruskal-Wallis, * $p < 0.05$).

	<i>Solvant</i>	<i>0.5X</i>	<i>1X</i>	<i>5X</i>	<i>25X</i>	<i>100X</i>
DMBA	3.698 \pm 0.104	3.699 \pm 0.095	3.768 \pm 0.122*	3.708 \pm 0.118	3.655 \pm 0.144	3.565 \pm 0.109
Pyr	2.812 \pm 0.195	2.736 \pm 0.153	2.733 \pm 0.209*	2.784 \pm 0.162	2.685 \pm 0.156*	2.775 \pm 0.130
Fl	2.797 \pm 0.124	2.928 \pm 0.153	2.899 \pm 0.143	2.845 \pm 0.233	2.915 \pm 0.176	-
B[a]P	3.653 \pm 0.113	3.716 \pm 0.117*	3.715 \pm 0.117*	3.784 \pm 0.363*	3.702 \pm 0.105	3.714 \pm 0.136*

La méthode utilisée pour évaluer les œdèmes cardiaques ne semble pas être adaptée ; en effet, un nombre significatif d'embryons exposés au B[a]P, au DMBA et au Fl montrait un œdème cardiaque (Figure 43). Ces altérations sont comptabilisées sous la forme de pourcentage de malformation présentées dans le Tableau 14.



Figure 42 : Malformations induites par le B[a]P sur des embryons de 96 hpf

- A) Larve contrôle. B) Larve exposée à la dose 100X présentant une courbure anormale du tronc et un œdème cardiaque (flèche). C) Larve 100X présentant une accumulation de cellules sanguines au niveau du vitellus. D) Larve 100X qui présentant un œdème vitellin. L'échelle des photos A, B et D est 3 μ m et celle de la figure C est de 1 μ m.

Tableau 14 : Pourcentage de malformation induit par les différentes contaminations à 96hpf. Les valeurs manquantes indiquées par un tiret sont les séries qui sont mortes, le nombre zéro indique aucune malformation est à lieu pendant la contamination.

% de malformation	Solvant	0.5X	1X	5X	25X	100X
B[a]P	21.74	8.16	9.43	33.34	25	42.56
DMBA	25	100	50	100	-	-
Flu	29.41	33.34	20	50	38.47	-
Pyr	8.33	0	100	16.66	-	66.66

4 Conclusion

L'objectif de ce projet était de valider une approche d'exposition d'embryons de poissons zèbres à des sédiments enrobés avec des HAP individuels car la présence d'un mélange de HAP peuvent induire des effets toxiques agonistes ou antagonistes (Billiard *et al.*, 2006). Pour cela, nous avons utilisé des indicateurs de toxicité classiques en écotoxicologie. Les résultats obtenus sont synthétisés dans le Tableau 15 ci-dessous.

Tableau 15 : Synthèse des résultats obtenus après expositions directes d'embryons à des sédiments enrobés avec des HAP individuels

Les valeurs indiquent les concentrations à partir desquelles les défauts sont observés (valeurs environnementales indiquées en rouge). Les heures dans la colonne *Survie* indiquent le moment où les contaminés deviennent significativement différents des contrôles. N : pas de différence significative par rapport à la condition témoin. N/A : données manquantes.

	<i>Ecllosion</i>	<i>Survie</i>	<i>Comet (24h)</i>	<i>Rythme card. (48h)</i>	<i>Morphologie (24-96h)</i>	<i>Taille (96h)</i>
B[a]P	N	25x (216h)	0.5x	N/A	≤25x	N
Pyr	N	1-5x (48h)	N	↓ 0.5x	N	N
Fl	N	25x (24h)	0.5x	N	25x	N
DMBA	N/A	1x (24h)	N/A	N/A	1-5x	N/A

Les phénotypes observés sont conformes à ceux obtenus après exposition de poissons à des HAP selon différentes modalités (exposition directe dans l'eau ou *via* l'alimentation). C'est le cas de la génotoxicité induite par le B[a]P et le Fl (Woo *et al.*, 2006 ; Wessel *et al.*, 2010) mais pas par le Pyr (Hawkins *et al.*, 1990) et de l'embryotoxicité du B[a]P, du Pyr et du DMBA (Hawkins *et al.*, 1990 ; Wassenberg & Di Giulio, 2004 ; Matson *et al.*, 2008). Enfin, le pyrène induit une légère bradycardie, ce qui a également été mis en évidence après exposition par voie aqueuse d'embryons de poissons zèbres (Incardona *et al.*, 2004 ; Incardona *et al.*, 2005). Dans la mesure où les modes d'exposition utilisés dans ces expériences sont différents, il est difficile de comparer les concentrations effectives. Cependant, le fait de retrouver l'ensemble du panel de phénotypes décrits correspondants aux différents HAP permet de conclure à la pertinence de la stratégie d'exposition présentée ici.

Nous pensons que ce test pourrait être utilisé dans le cadre de la Directive "Cadre sur l'Eau" (2000/60/CE) pour évaluer la toxicité de sédiments naturels après extraction puisque, nous l'avons montré, un test direct du sédiment pourrait conduire à un résultat biaisé en raison de facteurs intrinsèques au sédiment comme la saturation en oxygène. Nous pensons également que cette procédure pourrait être généralisée à l'évaluation de la toxicité de toute molécule hydrophobe pour lesquelles les tests réalisés par voie aqueuse pourraient conduire à une sous-estimation de leur toxicité. Ce test est donc probablement à considérer dans le cadre de la directive REACH (2006/1907/CE), à terme, qui imposera d'évaluer la toxicité de toute molécule chimique produite ou utilisée en Europe, à partir d'une tonne par an. De plus, dans le cadre de ces deux directives, il est recommandé de réduire l'utilisation de test *in vivo*, et/ou de développer des tests alternatifs. Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les tests

réalisés sur des stades embryonnaires de poissons "non protégés" sont considérés comme des tests *in vitro* et que l'événement marquant la fin de cette période est le début de l'alimentation exogène (Embry *et al.*, 2010). Des travaux récents montrent que, chez le poisson zèbre, ce stade est atteint autour de 96 hpf (Belanger *et al.*, 2010). La méthode et les indicateurs que nous avons utilisés sont, à ce titre, conformes pour être considérés comme test *in vitro*.

En l'état actuel des connaissances, il n'est toutefois pas possible de prédire des effets toxiques à long terme engendrés par un tel test réalisé uniquement sur des stades précoces. Il est donc indispensable d'établir des liens entre les phénotypes obtenus dans le cadre d'expositions courtes, telles que celles présentées ici, et des phénotypes susceptibles de survenir plus tardivement. En l'absence de telles informations, l'innocuité d'une molécule ou d'un milieu pourrait être établie à tort.

L'approche que j'ai développée dans le cadre de ce projet est actuellement utilisée dans le cadre d'un projet de plus grande ampleur, ConPhyPoP (ANR CESA 09-002 – Contamination et Physiologie des Poissons exposés aux Polluants), dont les objectifs sont d'évaluer les effets à long-terme d'une exposition précoce sur plusieurs fonctions et/ou processus physiologiques incluant, par exemple le comportement ou la reproduction, et de tenter d'identifier des indicateurs précoces – compatibles avec la réalisation de test *in vitro* – d'altérations tardives.

Chapitre 4 : Conclusion générale et perspectives

1 Conclusion générale

Dans l'environnement, les organismes sont exposés à des pollutions multiples en termes de nature et d'origine. Cela est particulièrement vrai dans les milieux aquatiques qui constituent souvent le réservoir ultime pour les polluants. Les POP regroupent un nombre important de polluants, parmi lesquels on trouve les PCB et les HAP. Ces deux familles de polluants organiques partagent un certain nombre de propriétés (accumulation dans les matrices, activation de la voie AhR, activités de perturbateur endocrinien pour certains d'entre eux) et présentent des différences significatives en termes de bioaccumulation et de métabolisation. Une autre différence majeure réside dans le fait qu'il y a moins d'émission de PCB dans le milieu, depuis l'interdiction de leur production il y a une trentaine d'années, alors que les émissions de HAP sont en constante augmentation en raison de l'activité humaine.

Ces composés présentent un large spectre de réponses toxicologiques, incluant une immunotoxicité, des déficits de reproduction, une perturbation des systèmes endocriniens, une génotoxicité et une cancérogénicité chez les animaux, y compris chez l'Homme. Au-delà des questions de santé publique liées aux effets des PCB chez l'Homme, se pose celles de la santé des écosystèmes et des possibles répercussions sur les populations.

Dans ces travaux de thèse, nous avons tenté d'aborder ces questions sous des angles différents avec des modalités d'exposition susceptibles de se produire dans l'environnement : les expositions se sont ainsi faites par voie trophique pour les PCB, qui sont bioaccumulables et bioamplifiables dans les organismes, et par contact avec un sédiment pour les HAP. Ces modalités ne sont pas exclusives des modalités existant dans l'environnement, en particulier en ce qui concerne les HAP, qui peuvent être bioaccumulés par exemple dans les algues, les oligochètes et les mollusques. La voie trophique est donc également une voie à considérer pour la contamination des poissons par les HAP.

Ces expériences ont été réalisées en tirant parti des avantages liés à l'utilisation de l'espèce modèle poisson zèbre. Ceci inclut les facilités d'élevage et de reproduction, et notamment la possibilité d'obtenir un grand nombre d'œufs sans saisonnalité, ainsi que le cycle de vie court de cette espèce, qui atteint la maturité sexuelle vers 3 mois environ.

2 PCB - Conclusions particulières et perspectives

Nous avons utilisé un mélange de congénères représentatif des contaminations rencontrées dans les zones estuariennes européennes, aussi bien en termes de concentrations que de proportions des différents congénères, afin de réaliser une contamination par voie trophique. Cette contamination a été réalisée pendant plus de 300 jours.

Nous avons ainsi mis en évidence :

- Dans le cas des PCB on observe une bioaccumulation différentielle selon les congénères, probablement en partie liée à la métabolisation de certains d'entre eux.
- un transfert des PCB vers les œufs qui est lui aussi différentiel selon les congénères. Cette différence semble en revanche liée au niveau de substitution et au log K_{ow} de chaque PCB, les congénères les moins chlorés étant plus activement transférés que les plus chlorés. Ce transport n'est pas "actif" car la concentration dans les œufs est notamment plus inférieure (10 fois moindre) que dans le reste du corps.

L'existence d'une bioaccumulation différentielle selon les sexes a déjà été démontrée pour d'autres poissons ainsi que le transfert vers les œufs. Ceci renforce l'idée que l'utilisation du poisson zèbre est appropriée pour ce type d'étude. Les facilités d'expérimentation procurent la possibilité d'aborder les questions plus mécanistiques concernant la métabolisation de certains congénères et le transfert des PCB vers les œufs, en particulier le rôle joué par les lipides. Les relations entre la nature des lipides et le transfert des congénères seront caractérisées prochainement. Il serait également intéressant d'étudier le rôle joué par les lipoprotéines, en particulier la vitellogénine, dans ce transfert.

Nous avons analysé plusieurs fonctions physiologiques et mis en évidence :

- l'absence d'effet sur la survie ou la croissance des poissons exposés, quel que soit le niveau de contamination de l'aliment dans nos conditions.
- une réduction du taux de fécondation des pontes pour les poissons exposés aux PCB. Cet effet est observé quel que soit le sexe du poisson contaminé et il n'y a pas d'additivité des effets lorsque les deux géniteurs ont été contaminés (ces observations devront être reconfirmés par des expériences similaires contenant plus de données).
- une augmentation de l'index d'atrésie folliculaire, voire une déplétion sévère des ovocytes des stades III et IV, selon la concentration de PCB contenus dans l'aliment, mais pas de lésion histologique significative des testicules.

L'absence d'effet sur la survie et la croissance est là aussi conforme avec la plupart des résultats déjà rapportés. L'utilisation des outils de modélisation comme le modèle DEB devrait nous permettre d'approfondir ce point ; en effet, il a été rapporté que, chez la sole, une exposition à des PCB ne modifiait pas la croissance, mais qu'il y avait une discordance entre la quantité d'aliment effectivement assimilée (estimée par la concentration de CB-153) et la croissance, celle-ci étant inférieure à ce qui était attendu. Les résultats obtenus chez la sole indique une grande variabilité de taux de croissance au sein d'un même bassin donc il faut développer une autre approche différente de la quantité de nourriture manger. L'approche utilisée est de doser la concentration du CB153, cela a été réalisé la 1^{ère} année d'exposition mais après le modèle sous estime la concentration en CB153, cela veut dire que le poisson à manger plus que ce que prédit le model mis en place. Le développement du modèle DEB pour le poisson zèbre et le suivi de la bioaccumulation permettra d'évaluer si le même phénomène est observé.

L'altération de la reproduction par les PCB a déjà été mise en évidence ; néanmoins, dans la plupart des cas, les congénères utilisés sont les congénères "dioxin-like" plans (CB-77 et CB-126) qui, en outre, sont utilisés à des concentrations élevées, à des doses peu réaliste non existantes dans des conditions environnementale. Ces approches sont indispensables pour comprendre les mécanismes d'action des PCB mais peuvent s'avérer peu pertinentes sur le plan environnemental. A notre connaissance, c'est la première fois qu'une telle altération de la reproduction est rapportée après exposition à des mélanges environnementaux sans "dioxin-like". Une activité perturbateur endocrinien des PCB est suspectée depuis longtemps, même si la démonstration formelle n'a, semble-t-il, pas été définitivement faite. Il semblerait en particulier que les PCB faiblement chlorés aient un effet œstrogénique et les plus fortement chlorés un effet anti-œstrogénique. Il se pourrait donc que nous observions une association d'effets opposés sur les mâles et les femelles. En effet, l'absence d'additivité des effets observés avec les mâles et les femelles est troublante et demande des analyses supplémentaires. L'atrésie folliculaire massive observée après exposition aux PCB pourrait également être due à un effet direct des PCB accumulés dans les follicules en cours de vitellogenèse. Il apparaît également indispensable de caractériser les mécanismes moléculaires sous-jacents. Une approche de type analyse de transcriptome par séquençage systématique serait probablement à même d'aborder cette question. Elle pourrait nous informer des gènes potentiellement perturbés par la contamination aux PCB. Cette analyse

étant très large, il faudrait en premier réaliser une analyse transcriptomique tissu spécifique (foie, ovaire, branchies) et se concentrer sur des gènes cibles connus qui ont une relation avec la croissance, la reproduction ou d'autres fonctions. Ensuite, d'autres gènes non identifiés dont l'expression est perturbée par les PCB pourraient être mis en évidence par homologie de séquence et leur fonction pourrait être par la suite étudiée.

Le recrutement au sein d'une population est défini par la capacité d'un individu à atteindre l'âge de la maturité sexuelle et à se reproduire. Plusieurs facteurs déterminent la capacité d'un poisson à participer au recrutement, cela inclut notamment le développement embryo-larvaire, la croissance, la différenciation et la maturation sexuelle et la survie à tous les stades. Le développement et la croissance ne semblent pas être affectés. Il faut cependant noter que, hormis la présence de PCB, ces expériences ont été réalisées dans des conditions optimales. Il est possible que dans ces conditions, un effet délétère ait été masqué. La modélisation pourra nous informer sur un éventuel surcoût énergétique associé à la contamination, qui viendrait soutenir que, dans des conditions sub-optimales, un effet sur la croissance et la survie pourrait être observé. Cette hypothèse pourrait également être testée en soumettant les poissons à des restrictions alimentaires en plus de la contamination. Il est également possible que d'autres variables de la reproduction, telles que le nombre de pontes par femelle, la taille des pontes ou l'âge de la première ponte, soient altérées. Indépendamment de cela, il apparaît clairement qu'une exposition chronique à des mélanges de PCB du type de ceux rencontrés en estuaire de Loire ou de Seine, conduit à une diminution du taux de fécondation. Ces mêmes polluants présentent des effets comportementaux sur le modèle poisson zèbre utilisé dans cette thèse il nous reste à identifier leur effet

3 HAP – Conclusions particulières et perspectives

L'objectif de ce projet était d'évaluer la toxicité des POP contenus dans un sédiment. Nous avons d'abord utilisé directement des sédiments pour voir s'il était possible d'en évaluer la toxicité. Nous avons observé une toxicité dans certains cas (sédiment vaseux) qui n'était pas due à la présence de toxique, mais plutôt aux propriétés physico-chimiques du sédiment. Il est donc apparu nécessaire de mettre en place une approche alternative, en extrayant la fraction aromatique du sédiment à tester pour enrober un sédiment adéquat. Nous avons donc mis en place une procédure adaptée et utilisé des HAP comme composés modèles. Nous avons choisi des HAP pour lesquels les effets étaient connus et présentant une variété d'effets. Les

phénotypes observés se sont avérés être conformes à ceux décrits dans la littérature, ce qui nous permet de conclure à la pertinence de la stratégie d'exposition.

Nous pensons que cette approche pourrait être utilisée dans le cadre de la caractérisation de la toxicité de sédiments naturels. Cela reste à démontrer puis ensuite ceci pourrait être réalisé dans le cadre de la DCE.

Dans le cadre de la directive REACH, il est demandé d'évaluer la toxicité de nombreux produits chimiques. Les approches utilisées classiquement par exposition semi-statique en solution sont adaptées pour les composés hydrosolubles, mais en aucun cas pour les composés hydrophobes. Cette stratégie d'exposition pourrait être généralisée à la caractérisation de la toxicité de molécules hydrophobes. Précisons en outre que des expositions telles que celles décrites ici, qui sont réalisées avant l'ouverture de la bouche et donc limitées aux stades éléuthéroembryons, sont considérés comme des tests *in vitro* et sont conformes aux recommandations de REACH de réduire le recours aux tests *in vivo*.

Dans un cas comme dans l'autre, si on souhaite pouvoir prédire correctement la toxicité d'un sédiment ou d'un composé en se limitant à une analyse pendant 96 h, il apparaît indispensable de disposer d'un nombre d'indicateurs suffisant, et en particulier d'indicateurs précoces qui soient prédictifs d'effets tardifs. Outre la poursuite de la caractérisation des effets physiologiques d'une exposition à des HAP, en particulier par la voie trophique, l'identification d'indicateurs précoces est un des objectifs du projet ANR ConPhyPoP.

Références bibliographiques

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B. & Andersen, O. K. (2000). "PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod." Aquatic Toxicology **51**(2): 241-258.
- Akcha, F., Vincent Hubert, F. & Pfol-Leszkowicz, A. (2003). "Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds." Mutation Research **534**(1-2): 21-32.
- Allen, Y., Matthiessen, P., Scott, A. P., Haworth, S., Feist, S. & Thain, J. E. (1999). "The extent of oestrogenic contamination in the UK estuarine and marine environments - further surveys of flounder." Science of the Total Environment **233**(1-3): 5-20.
- Allen, Y., Scott, A. P., Matthiessen, P., Haworth, S., Thain, J. E. & Feist, S. (1999). "Survey of estrogenic activity in United Kingdom estuarine and coastal waters and its effects on gonadal development of the flounder *Platichthys flesus*." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(8): 1791-1800.
- Allner, B., von der Gönna, S., Griebeler, E.-M., Nikutowski, N., Weltin, A. & Stahlschmidt-Allner, P. (2010). "Reproductive functions of wild fish as bioindicators of reproductive toxicants in the aquatic environment." Environmental Science and Pollution Research International **17**(2): 505-518.
- Anderson, M. J., Olsen, H., Matsumura, F. & Hinton, D. E. (1996). "In vivo modulation of 17[beta]-estradiol-induced vitellogenin synthesis and estrogen receptor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver cells by [beta]-naphthoflavone." Toxicology and Applied Pharmacology **137**(2): 210-218.
- Andersson, P. L., Berg, A. H., Bjerselius, R., Norrgren, L., Olsén, H., Olsson, P. E., Orn, S. & Tysklind, M. (2001). "Bioaccumulation of selected PCBs in zebrafish, three-spined stickleback, and Arctic char after three different routes of exposure." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **40**(4): 519-530.
- Andreu-Vieyra, C. V. & Habibi, H. R. (2000). "Factors controlling ovarian apoptosis." Canadian Journal of Physiology and Pharmacology **78**(12): 1003-1012.
- Antunes, P., Amado, J., Vale, C. & Gil, O. (2007). "Influence of the chemical structure on mobility of PCB congeners in female and male sardine (*Sardina pilchardus*) from Portuguese coast." Chemosphere **69**(3): 395-402.
- Augustine, S., Gagnaire, B., Floriani, M., Adam-Guillermin, C. & Kooijman, S. A. L. M. (2011). "Developmental energetics of zebrafish, *Danio rerio*." Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology **159**(3): 275-283.
- Bagge, P. & Hakkari, L. (1992). "Effects of paper mill effluents on the fish fauna of stony shores of Lake Päijänne." Hydrobiologia **243-244**(1): 413-420.
- Barbee, G. C., Barich, J., Duncan, B., Bickham, J. W., Matson, C. W., Hintze, C. J., Autenrieth, R. L., Zhou, G.-D., McDonald, T. J., Cizmas, L., Norton, D. & Donnelly, K. C. (2008). "In situ biomonitoring of PAH-contaminated sediments using juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)." Ecotoxicology and Environmental Safety **71**(2): 454-464.
- Barron, M. G., Heintz, R. & Rice, S. D. (2004). "Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish." Marine Environmental Research **58**(2-5): 95-100.
- Belanger, S. E., Balon, E. K. & Rawlings, J. M. (2010). "Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests." Aquatic Toxicology **97**(2): 88-95.
- Belpaire, C., Geeraerts, C., Roosens, L., Neels, H. & Covaci, A. (2010). "What can we learn from monitoring PCBs in the European eel? A Belgian experience." Environment International: 354-364.

- Benford, D., DiNovi, M. & Setzer, R. W. (2010). "Application of the margin-of-exposure (MoE) approach to substances in food that are genotoxic and carcinogenic e.g.: Benzo[a]pyrene and polycyclic aromatic hydrocarbons." Food and Chemical Toxicology **48**(Supplement 1): S42-S48.
- Bengtsson, B.-E. (1980). "Long-term effects of PCB (Clophen A50) on growth, reproduction and swimming performance in the minnow, *Phoxinus phoxinus*." Water Research **14**(6): 681-687.
- Berg, V., Lyche, J. L., Karlsson, C., Stavik, B., Nourizadeh-Lillabadi, R., Hårdnes, N., Skaare, J. U., Alestrøm, P., Lie, E. & Ropstad, E. (2011). "Accumulation and effects of natural mixtures of persistent organic pollutants (POP) in zebrafish after two generations of exposure." Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A **74**(7): 407-423.
- Bergen, B. J., Rahn, K. A. & Nelson, W. G. (1998). "Remediation at a marine superfund site: surficial sediment PCB congener concentration, composition, and redistribution." Environmental Science & Technology **32**(22): 3496-3501.
- Billiard, S. M., Timme-Laragy, A. R., Wassenberg, D. M., Cockman, C. & Di Giulio, R. T. (2006). "The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish." Toxicological Sciences **92**(2): 526-536.
- Billsson, K., Westerlund, L., Tysklind, M. & Olsson, P.-e. (1998). "Developmental disturbances caused by polychlorinated biphenyls in zebrafish (*Brachydanio rerio*)." Marine Environmental Research **46**(1-5): 461-464.
- Bodiguel, X., Loizeau, V., Le Guellec, A.-M., Rouspard, F., Philippon, X. & Mellon-Duval, C. (2009). "Influence of sex, maturity and reproduction on PCB and p,p'DDE concentrations and repartitions in the European hake (*Merluccius merluccius*, L.) from the Gulf of Lions (N.W. Mediterranean)." Science of the Total Environment **408**(2): 304-311.
- Bols, N. C., Schirmer, K., Joyce, E. M., Dixon, D. G., Greenberg, B. M. & Whyte, J. J. (1999). "Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line." Ecotoxicology and Environmental Safety **44**(1): 118-128.
- Borgå, K., Gabrielsen, G. W. & Skaare, J. U. (2001). "Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain." Environmental Pollution **113**(2): 187-198.
- Brar, N. K., Waggoner, C., Reyes, J. A., Fairey, R. & Kelley, K. M. (2010). "Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures." Aquatic Toxicology **96**(3): 203-215.
- Brion, F., Tyler, C. R., Palazzi, X., Laillet, B., Porcher, J. M., Garric, J. & Flammarion, P. (2004). "Impacts of 17beta-estradiol, including environmentally relevant concentrations, on reproduction after exposure during embryo-larval-, juvenile- and adult-life stages in zebrafish (*Danio rerio*)." Aquatic Toxicology **68**(3): 193-217.
- Buckman, A. H., Fisk, A. T., Parrott, J. L., Solomon, K. R. & Brown, S. B. (2007). "PCBs can diminish the influence of temperature on thyroid indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Aquatic Toxicology **84**(3): 366-378.
- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M. H., Pottier, D. & Budzinski, H. (2006). "Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France)." Aquatic Toxicology **79**(3): 257-267.
- Caliani, I., Porcelloni, S., Mori, G., Frenzilli, G., Ferraro, M., Marsili, L., Casini, S. & Fossi, M. C. (2009). "Genotoxic effects of produced waters in mosquito fish (*Gambusia affinis*)." Ecotoxicology **18**(1): 75-80.

- Campagna, C., Sirard, M.-A., Ayotte, P. & Bailey, J. L. (2001). "Impaired maturation, fertilization, and embryonic development of porcine oocytes following exposure to an environmentally relevant organochlorine mixture." Biology of Reproduction **65**(2): 554-560.
- Carls, M. G., Holland, L., Larsen, M., Collier, T. K., Scholz, N. L. & Incardona, J. P. (2008). "Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles." Aquatic Toxicology **88**(2): 121-127.
- Carls, M. G. & Thedinga, J. F. (2010). "Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage." Marine Environmental Research **69**(5): 318-325.
- Carney, M. W., Erwin, K., Hardman, R., Yuen, B., Volz, D. C., Hinton, D. E. & Kullman, S. W. (2008). "Differential developmental toxicity of naphthoic acid isomers in medaka (*Oryzias latipes*) embryos." Marine Pollution Bulletin **57**(6-12): 255-266.
- Carney, S. A., Prasch, A. L., Heideman, W. & Peterson, R. E. (2006). "Understanding dioxin developmental toxicity using the zebrafish model." Birth Defects Research. Part A, Clinical and Molecular Teratology **76**(1): 7-18.
- Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L. L., Rhodes, L. D., Collier, T. K., Stein, J. E., McCain, B. B. & Varanasi, U. (1991). "Inducibility of spawning and reproductive success of female english sole (*Praphrys vetulus*) from urban and nonurban areas of puget sound, Washington." Marine Environmental Research **31**(2): 99-122.
- Chen, G. & White, P. A. (2004). "The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review." Mutation Research **567**(2-3): 151-225.
- Chen, W.-J., Ortí, G. & Meyer, A. (2004). "Novel evolutionary relationship among four fish model systems." Trends in Genetics: TIG **20**(9): 424-431.
- Clelland, E. & Peng, C. (2009). "Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development." Molecular and Cellular Endocrinology **312**(1-2): 42-52.
- Coimbra, A. M. & Reis-Henriques, M. A. (2005). "Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., reproduction inhibition by dietary exposure to Aroclor 1254." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **75**(2): 407-412.
- Coimbra, A. M. & Reis-Henriques, M. A. (2007). "Tilapia larvae Aroclor 1254 exposure: Effects on gonads and circulating thyroid hormones during adulthood." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **79**(5): 488-493.
- Crain, D. A., Janssen, S. J., Edwards, T. M., Heindel, J., Ho, S.-m., Hunt, P., Iguchi, T., Juul, A., McLachlan, J. A., Schwartz, J., Skakkebaek, N., Soto, A. M., Swan, S., Walker, C., Woodruff, T. K., Woodruff, T. J., Giudice, L. C. & Guillette, L. J., Jr. (2008). "Female reproductive disorders: the roles of endocrine-disrupting compounds and developmental timing." Fertility and Sterility **90**(4): 911-940.
- Crinnion, W. J. (2011). "Polychlorinated biphenyls: persistent pollutants with immunological, neurological, and endocrinological consequences." Alternative Medicine Review: A Journal of Clinical Therapeutic **16**(1): 5-13.
- Cross, J. N. & Jo Ellen, H. (1988). "Evidence for impaired reproduction in white croaker (*Genyonemus lineatus*) from contaminated areas off Southern California." Marine Environmental Research **24**(1-4): 185-188.
- Curtis, L. R., Hemmer, M. J. & Courtney, L. A. (2000). "Dieldrin induces cytosolic [3H]7, 12-dimethylbenz[a]anthracene binding but not multidrug resistance proteins in rainbow trout liver." Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A **60**(4): 275-289.
- Daley, J. M., Leadley, T. A. & Drouillard, K. G. (2009). "Evidence for bioamplification of nine polychlorinated biphenyl (PCB) congeners in yellow perch (*Perca flavescens*) eggs during incubation." Chemosphere **75**(11): 1500-1505.

- de Mora, S., Tolosa, I., Fowler, S. W., Villeneuve, J.-P., Cassi, R. & Cattini, C. (2010). "Distribution of petroleum hydrocarbons and organochlorinated contaminants in marine biota and coastal sediments from the ROPME Sea Area during 2005." Marine Pollution Bulletin **60**(12): 2323-2349.
- Duffy-Whritenour, J. E., Kurtzman, R. Z., Kennedy, S. & Zelikoff, J. T. (2010). "Non-coplanar polychlorinated biphenyl (PCB)-induced immunotoxicity is coincident with alterations in the serotonergic system." Journal of Immunotoxicology **7**(4): 318-326.
- Eichinger, M., Loizeau, V., Rounsard, F., Le Guellec, A. M. & Bacher, C. (2010). "Modelling growth and bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in common sole (*Solea solea*)." Journal of Sea Research **64**(3): 373-385.
- Einarsson, B., Birnir, B. & Sigursson, S. (2011). "A dynamic energy budget (DEB) model for the energy usage and reproduction of the Icelandic capelin (*Mallotus villosus*)." Journal of Theoretical Biology **281**(1): 1-8.
- Eisler, R. (1987). "Polycyclic aromatic hydrocarbons hazards to fish, wildlife, and invertebrates: A synoptic review." U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. Biological Report **85**: 1-11.
- Embry, M. R., Belanger, S. E., Braunbeck, T. A., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D. E., Léonard, M. A., Lillicrap, A., Norberg-King, T. & Whale, G. (2010). "The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research." Aquatic Toxicology **97**(2): 79-87.
- Farwell, A., Nero, V., Croft, M., Bal, P. & Dixon, D. G. (2006). "Modified japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **51**(4): 600-607.
- Fent, K. & Bätischer, R. (2000). "Cytochrome P4501A induction potencies of polycyclic aromatic hydrocarbons in a fish hepatoma cell line: Demonstration of additive interactions." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(8): 2047-2058.
- Finn, R. N. (2007). "The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria." Aquatic Toxicology **81**(4): 337-354.
- Fisher, M. A., Jelaso, A. M., Predenkiewicz, A., Schuster, L., Means, J. & Ide, C. F. (2003). "Exposure to the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254 alters melanocyte and tail muscle morphology in developing *Xenopus laevis* tadpoles." Environmental Toxicology and Chemistry **22**(2): 321-328.
- Fisk, A. T., Hobson, K. A. & Norstrom, R. J. (2001). "Influence of chemical and biological factors on trophic transfer of persistent organic pollutants in the northwater polynya marine food web." Environmental Science & Technology **35**(4): 732-738.
- Foekema, E. M., Deerenberg, C. M. & Murk, A. J. (2008). "Prolonged ELS test with the marine flatfish sole (*Solea solea*) shows delayed toxic effects of previous exposure to PCB 126." Aquatic Toxicology **90**(3): 197-203.
- Fong, A. T., Dashwood, R. H., Cheng, R., Mathews, C., Ford, B., Hendricks, J. D. & Bailey, G. S. (1993). "Carcinogenicity, metabolism and Ki-ras proto-oncogene activation by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in rainbow trout embryos." Carcinogenesis **14**(4): 629-635.
- Fu, C., Wilson, J. M., Rombough, P. J. & Brauner, C. J. (2010). "Ions first: Na⁺ uptake shifts from the skin to the gills before O₂ uptake in developing rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **277**(1687): 1553-1560.
- Gerlach, G. (2006). "Pheromonal regulation of reproductive success in female zebrafish: female suppression and male enhancement." Animal Behaviour **72**(5): 1119-1124.

- Gillardin, V., Silvestre, F., Divoy, C., Thomé, J.-P. & Kestemont, P. (2009). "Effects of Aroclor 1254 on oxidative stress in developing *Xenopus laevis* tadpoles." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(2): 546-551.
- Giulio, R. T. D. & Hinton, D. E. (2008). The toxicology of fishes, CRC Press.
- Gray, J. S. (2002). "Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist." Marine Pollution Bulletin **45**(1-12): 46-52.
- Gray, M. A. & Metcalfe, C. D. (1997). "Induction of testis-ova in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to p-nonylphenol." Environmental Toxicology and Chemistry **16**(5): 1082-1086.
- Grimes, A. C., Erwin, K. N., Stadt, H. A., Hunter, G. L., Gefroh, H. A., Tsai, H.-J. & Kirby, M. L. (2008). "PCB126 exposure disrupts zebrafish ventricular and branchial but not early Neural crest development." Toxicological Sciences **106**(1): 193-205.
- Hahn, M. E. & Karchner, S. I. (1995). "Evolutionary conservation of the vertebrate Ah (dioxin) receptor: amplification and sequencing of the PAS domain of a teleost Ah receptor cDNA." Biochemical Journal **310**(Pt 2): 383-387.
- Hardell, S., Tilander, H., Welfinger-Smith, G., Burger, J. & Carpenter, D. O. (2010). "Levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and three organochlorine pesticides in fish from the Aleutian Islands of Alaska." PloS One **5**(8): e12396-e12396.
- Haritash, A. K. & Kaushik, C. P. (2009). "Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review." Journal of Hazardous Materials **169**(1-3): 1-15.
- Harrad, S. J., Sewart, A. P., Alcock, R., Boumphrey, R., Burnett, V., Duarte-Davidson, R., Halsall, C., Sanders, G., Waterhouse, K., Wild, S. R. & Jones, K. C. (1994). "Polychlorinated biphenyls (PCBs) in the British environment: sinks, sources and temporal trends." Environmental Pollution **85**(2): 131-146.
- Hauser, R., Chen, Z., Pothier, L., Ryan, L. & Altshul, L. (2003). "The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE." Environmental Health Perspectives **111**(12): 1505-1511.
- Hawkins, W. E., Walker, W. W., Overstreet, R. M., Lytle, J. S. & Lytle, T. F. (1990). "Carcinogenic effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons on the Japanese medaka and guppy in waterborne exposures." Science of the Total Environment **94**(1-2): 155-167.
- He, C., Zuo, Z., Shi, X., Li, R., Chen, D., Huang, X., Chen, Y. & Wang, C. (2011). "Effects of benzo(a)pyrene on the skeletal development of *Sebastiscus marmoratus* embryos and the molecular mechanism involved." Aquatic Toxicology **101**(2): 335-341.
- Heilmann, L. J., Sheen, Y. Y., Bigelow, S. W. & Nebert, D. W. (1988). "Trout P450IA1: cDNA and deduced protein sequence, expression in liver, and evolutionary significance." DNA **7**(6): 379-387.
- Hesthagen, T., Berger, H. M., Larsen, B. M. & Saksgård, R. (1995). "Monitoring fish stocks in relation to acidification in Norwegian watersheds." Water, Air, & Soil Pollution **85**(2): 641-646.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W. & Peterson, R. E. (2005). "Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity." Toxicological Sciences **86**(1): 6-19.
- Hinton, D. E., Kullman, S. W., Hardman, R. C., Volz, D. C., Chen, P.-J., Carney, M. & Bencic, D. C. (2005). "Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance?" Marine Pollution Bulletin **51**(8-12): 635-648.
- Hoffman, D. J., Melancon, M. J., Klein, P. N., Rice, C. P., Eisemann, J. D., Hines, R. K., Spann, J. W. & Pendleton, G. W. (1996). "Developmental toxicity of PCB 126 (3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl) in nestling American kestrels (*Falco sparverius*)." Fundamental and Applied Toxicology: Official Journal of the Society of Toxicology **34**(2): 188-200.

- Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Jr, G. A. B. & Jr, J. C. (2002). Handbook of ecotoxicology - Second edition, CRC Press.
- Holm, G., Lundström, J., Andersson, T. & Norrgren, L. (1994). "Influences of halogenated organic substances on ovarian development and hepatic EROD activity in the three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus*, and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*." Aquatic Toxicology **29**(3-4): 241-256.
- Honkanen, R. E., Rigler, M. W. & Patton, J. S. (1985). "Dietary fat assimilation and bile salt absorption in the killifish intestine." The American Journal of Physiology **249**(3 Pt 1): G399-407-G399-407.
- Hwang, P.-P. (2009). "Ion uptake and acid secretion in zebrafish (*Danio rerio*)." Journal of Experimental Biology **212**(11): 1745-1752.
- Hylland, K. (2006). "Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems." Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A **69**(1-2): 109-123.
- Incardona, J. P., Carls, M. G., Day, H. L., Sloan, C. A., Bolton, J. L., Collier, T. K. & Scholz, N. L. (2009). "Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific herring (*Clupea pallasii*) exposed to crude oil during weathering." Environmental Science & Technology **43**(1): 201-207.
- Incardona, J. P., Carls, M. G., Teraoka, H., Sloan, C. A., Collier, T. K. & Scholz, N. L. (2005). "Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development." Environmental Health Perspectives **113**(12): 1755-1762.
- Incardona, J. P., Collier, T. K. & Scholz, N. L. (2004). "Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons." Toxicology and Applied Pharmacology **196**(2): 191-205.
- Iwanowicz, L. R., Blazer, V. S., McCormick, S. D., VanVeld, P. A. & Ottinger, C. A. (2009). "Aroclor 1248 exposure leads to immunomodulation, decreased disease resistance and endocrine disruption in the brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*." Aquatic Toxicology **93**(1): 70-82.
- Jaouen-Madoulet, A., Abarnou, A., Le Guellec, A. M., Loizeau, V. & Leboulenger, F. (2000). "Validation of an analytical procedure for polychlorinated biphenyls, coplanar polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples." Journal of Chromatography A **886**(1-2): 153-173.
- Johansen, H. R., Alexander, J., Rosslund, O. J., Planting, S., Løvik, M., Gaarder, P. I., Gdynia, W., Bjerve, K. S. & Becher, G. (1996). "PCDDs, PCDFs, and PCBs in human blood in relation to consumption of crabs from a contaminated Fjord area in Norway." Environmental Health Perspectives **104**(7): 756-764.
- Johnson, L. L., Stein, J. E., Collier, T. K., Casillas, E. & Varanasi, U. (1994). "Indicators of reproductive development in prespawning female winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from urban and non-urban estuaries in the northeast United States." Science of the Total Environment **141**(1-3): 241-260.
- Jönsson, M. E., Brunström, B. & Brandt, I. (2009). "The zebrafish gill model: induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation." Aquatic Toxicology **91**(1): 62-70.
- Kelce, W. R., Stone, C. R., Laws, S. C., Gray, E. L., Kempainen, J. A. & Wilson, E. M. (1996). "Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist." Obstetrical & Gynecological Survey **51**(2): 111-114.
- Khan, I. A. & Thomas, P. (2006). "PCB congener-specific disruption of reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker." Marine Environmental Research **62** **Suppl**: S25-S28.
- Kime, D. E. (1995). "The effects of pollution on reproduction in fish." Reviews in Fish Biology and Fisheries **5**(1): 52-95.

- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. (1995). "Stages of embryonic development of the zebrafish." Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists **203**(3): 253-310.
- Kimmel, C. B., Warga, R. M. & Schilling, T. F. (1990). "Origin and organization of the zebrafish fate map." Development **108**(4): 581-594.
- Kirby, G. M., Stalker, M., Metcalfe, C., Kocal, T., Ferguson, H. & Hayes, M. A. (1990). "Expression of immunoreactive glutathione S-transferases in hepatic neoplasms induced by aflatoxin B1 or 1,2-dimethylbenzanthracene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)." Carcinogenesis **11**(12): 2255-2257.
- Klaunig, J. E. & Kamendulis, L. M. (2004). "The role of oxidative stress in carcinogenesis." Annual Review of Pharmacology and Toxicology **44**: 239-267.
- Kleinow, K. M., Doi, A. M. & Smith, A. A. (2000). "Distribution and inducibility of P-glycoprotein in the catfish: immunohistochemical detection using the mammalian C-219 monoclonal." Marine Environmental Research **50**(1-5): 313-317.
- Koç , N. D., Aytakin, Y. & Yüce, R. (2008). "Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the zebrafish (*Danio rerio*)." Brazilian Archives of Biology and Technology **51**: 513-522.
- Kodavanti, P. R. S. (2005). "Neurotoxicity of persistent organic pollutants: possible mode(s) of action and further considerations." Dose-Response: A Publication of International Hormesis Society **3**(3): 273-305.
- Kooijman, B. & Kooijman, S. A. L. M. (2009). Dynamic energy budget theory for metabolic organisation, Cambridge University Press.
- Kožul, D., Herceg Romanić, S., Kljaković-Gašpić, Z. & Veža, J. (*In press*). "Distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in wild mussels from two different sites in central Croatian Adriatic coast." Environmental Monitoring and Assessment.
- Krogenaes, A. K., Nafstad, I., Skåre, J. U., Farstad, W. & Hafne, A. L. (1998). "In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126." Reproductive Toxicology **12**(6): 575-580.
- Kubecka, J. & Matena, J. (1991). "Downstream regeneration of the fish populations of 3 polluted trout streams in Southern Bohemia." Ekologia (ČSFR) **10**: 389-404.
- Küster, E. & Altenburger, R. (2008). "Oxygen decline in biotesting of environmental samples--is there a need for consideration in the acute zebrafish embryo assay?" Environmental Toxicology **23**(6): 745-750.
- La Rocca, C. & Mantovani, A. (2006). "From environment to food: the case of PCB." Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità **42**(4): 410-416.
- Lagadic, L. (1997). Biomarqueurs en écotoxicologie: Aspects fondamentaux, Masson.
- Landahl, J. T., Johnson, L. L., Stein, J. E., Collier, T. K. & Varanasi, U. (1997). "Marine pollution and fish population parameters: English sole (*Pleuronectes vetulus*) in Puget Sound WA." Transactions of the American Fisheries Society **126**: 519-535.-519-535.
- Larsson, D. G. J., Hällman, H. & Förlin, L. (2000). "More male fish embryos near a pulp mill." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(12): 2911-2917.
- Lawrence, A. J. & Hemingway, K. (2003). Effects of pollution on fish: Molecular effects and population responses, Wiley-Blackwell.
- Lawrence, A. J. & Poulter, C. (2001). "Impact of copper, pentachlorophenol and benzo[a]pyrene on the swimming efficiency and embryogenesis of the amphipod *Chaetogammarus marinus*." from <http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsid=14132468>.
- Lawrence, C. (2007). "The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review." Aquaculture **269**(1-4): 1-20.

- Lee, R. F. & Anderson, J. W. (2005). "Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills." Marine Pollution Bulletin **50**(7): 705-723.
- Letcher, R. J., Bustnes, J. O., Dietz, R., Jenssen, B. M., Jørgensen, E. H., Sonne, C., Verreault, J., Vijayan, M. M. & Gabrielsen, G. W. (2010). "Exposure and effects assessment of persistent organohalogen contaminants in arctic wildlife and fish." Science of the Total Environment **408**(15): 2995-3043.
- Lien, G. J. & McKim, J. M. (1993). "Predicting branchial and cutaneous uptake of 2,2',5,5'-tetrachlorobiphenyl in fathead minnows (*Pimephales promelas*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Rate limiting factors." Aquatic Toxicology **27**(1-2): 15-31.
- Lyche, J. L., Nourizadeh-Lillabadi, R., Almaas, C., Stavik, B., Berg, V., Skåre, J. U., Alestrøm, P. & Ropstad, E. (2010). "Natural mixtures of persistent organic pollutants (POP) increase weight gain, advance puberty, and induce changes in gene expression associated with steroid hormones and obesity in female zebrafish." Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A **73**(15): 1032-1057.
- Lyche, J. L., Nourizadeh-Lillabadi, R., Karlsson, C., Stavik, B., Berg, V., Skåre, J. U., Alestrøm, P. & Ropstad, E. (2011). "Natural mixtures of POPs affected body weight gain and induced transcription of genes involved in weight regulation and insulin signaling." Aquatic Toxicology **102**(3-4): 197-204.
- Matson, C. W., Timme-Laragy, A. R. & Di Giulio, R. T. (2008). "Fluoranthene, but not benzo[a]pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish." Chemosphere **74**(1): 149-154.
- McCarthy, I. D., Fuiman, L. A. & Alvarez, M. C. (2003). "Aroclor 1254 affects growth and survival skills of Atlantic croaker *Micropogonias undulatus* larvae." Marine Ecology Progress Series **252**: 295-301.
- McFarland, V. A. & Clarke, J. U. (1989). "Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: considerations for a congener-specific analysis." Environmental Health Perspectives **81**: 225-239.
- McGrath, P. & Li, C.-Q. (2008). "Zebrafish: a predictive model for assessing drug-induced toxicity." Drug Discovery Today **13**(9-10): 394-401.
- McKinney, J. D. & Waller, C. L. (1994). "Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues." Environmental Health Perspectives **102**(3): 290-297.
- McLean, E. & Donaldson, E. M. (1990). "Absorption of bioactive proteins by the gastrointestinal tract of fish: A review." Journal of Aquatic Animal Health **2**(1): 1-11.
- Meeker, J. D. & Hauser, R. (2010). "Exposure to Polychlorinated Biphenyls (PCBs) and Male Reproduction." Systems Biology in Reproductive Medicine **56**(2): 122-131.
- Mendola, P., Messer, L. C. & Rappazzo, K. (2008). "Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female." Fertility and Sterility **89**(2-Suppl): e81-e94.
- Mills, L. J. & Chichester, C. (2005). "Review of evidence: are endocrine-disrupting chemicals in the aquatic environment impacting fish populations?" Science of the Total Environment **343**(1-3): 1-34.
- Monod, G., Saucier, D., Perdu-Durand, E., Diallo, M., Cravedi, J. P. & Astic, L. (1994). "Biotransformation enzyme activities in the olfactory organ of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Immunocytochemical localization of cytochrome P4501A1 and its induction by β -naphthoflavone." Fish Physiology and Biochemistry **13**(6): 433-444.
- Monosson, E. (1999). "Reproductive and developmental effects of PCBs in fish: a synthesis of laboratory and field studies." Reviews in Toxicology **Vol. 3**(1-4): 25-75.

- Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J. & Cachot, J. (2011). "Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay." Analytical and Bioanalytical Chemistry **399**(6): 2235-2242.
- Morrison, D. E., Robertson, B. K. & Alexander, M. (2000). "Bioavailability to Earthworms of Aged DDT, DDE, DDD, and Dieldrin in Soil." Environmental Science & Technology **34**(4): 709-713.
- Muir, D., Savinova, T., Savinov, V., Alexeeva, L., Potelov, V. & Svetochev, V. (2003). "Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia." Science of the Total Environment **306**(1-3): 111-131.
- Na, Y.-R., Seok, S.-H., Baek, M.-W., Lee, H.-Y., Kim, D.-J., Park, S.-H., Lee, H.-K. & Park, J.-H. (2009). "Protective effects of vitamin E against 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB126) induced toxicity in zebrafish embryos." Ecotoxicology and Environmental Safety **72**(3): 714-719.
- Nakayama, K., Oshima, Y., Hiramatsu, K. & Honjo, T. (2004). "Alteration of general behavior of male medaka, *Oryzias latipes*, exposed to tributyltin and/or polychlorinated biphenyls." Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University **49**(1): 85-92.
- Nakayama, K., Oshima, Y., Hiramatsu, K., Shimasaki, Y. & Honjo, T. (2005). "Effects of polychlorinated biphenyls on the schooling behavior of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(10): 2588-2593.
- Nakayama, K., Oshima, Y., Nagafuchi, K., Hano, T., Shimasaki, Y. & Honjo, T. (2005). "Early-life-stage toxicity in offspring from exposed parent medaka, *Oryzias latipes*, to mixtures of tributyltin and polychlorinated biphenyls." Environmental Toxicology and Chemistry **24**(3): 591-596.
- Nakayama, K., Sei, N., Handoh, I. C., Shimasaki, Y., Honjo, T. & Oshima, Y. (*In press*). "Effects of polychlorinated biphenyls on liver function and sexual characteristics in Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." Marine Pollution Bulletin.
- Nash, J. P., Kime, D. E., Van der Ven, L. T. M., Wester, P. W., Brion, F., Maack, G., Stahlschmidt-Allner, P. & Tyler, C. R. (2004). "Long-term exposure to environmental concentrations of the pharmaceutical ethynylestradiol causes reproductive failure in fish." Environmental Health Perspectives **112**(17): 1725-1733.
- Neale, J. C. C., Kenny, T. P., Tjeerdema, R. S. & Gershwin, M. E. (2005). "PAH- and PCB-induced Alterations of Protein Tyrosine Kinase and Cytokine Gene Transcription in Harbor Seal (*Phoca Vitulina*) PBMC." Clinical and Developmental Immunology **12**(2): 91-97.
- Newman, J. W., Becker, J. S., Blondina, G. & Tjeerdema, R. S. (1998). "Quantitation of Aroclors using congener-specific results." Environmental Toxicology and Chemistry **17**(11): 2159-2167.
- Nfon, E. & Cousins, I. T. (2006). "Interpreting time trends and biomagnification of PCBs in the Baltic region using the equilibrium lipid partitioning approach." Environmental Pollution **144**(3): 994-1000.
- Njiwa, J. R. K., Müller, P. & Klein, R. (2004). "Binary mixture of DDT and Arochlor1254: effects on sperm release by *Danio rerio*." Ecotoxicology and Environmental Safety **58**(2): 211-219.
- Nogueira, P., Lourenço, J., Rodriguez, E., Pacheco, M., Santos, C., Rotchell, J. M. & Mendo, S. (2009). "Transcript profiling and DNA damage in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene." Aquatic Toxicology **94**(2): 123-130.

- Nourizadeh-Lillabadi, R., Lyche, J. L., Almaas, C., Stavik, B., Moe, S. J., Aleksandersen, M., Berg, V., Jakobsen, K. S., Stenseth, N. C., Skåre, J. U., Alestrøm, P. & Ropstad, E. (2009). "Transcriptional regulation in liver and testis associated with developmental and reproductive effects in male zebrafish exposed to natural mixtures of persistent organic pollutants (POP)." Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A **72**(3-4): 112-130.
- Noury, P., Geffard, O., Tutundjian, R. & Garric, J. (2006). "Non destructive *in vivo* measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: development and application." Environmental Toxicology **21**(4): 324-331.
- Nyman, M., Koistinen, J., Fant, M. L., Vartiainen, T. & Helle, E. (2002). "Current levels of DDT, PCB and trace elements in the Baltic ringed seals (*Phoca hispida baltica*) and grey seals (*Halichoerus grypus*)." Environmental Pollution **119**(3): 399-412.
- Olsson, P.-E., Westerlund, L., Teh, S. J., Billsson, K., Berg, A. H., Tysklind, M., Nilsson, J., Eriksson, L.-O. & Hinton, D. E. (1999). "Effects of maternal exposure to estrogen and PCB on different life stages of zebrafish (*Danio rerio*)." Ambio **28**(1): 100-106.
- Omicinski, C. J., Vanden Heuvel, J. P., Perdew, G. H. & Peters, J. M. (2010). "Xenobiotic metabolism, disposition and regulation by receptors: From biochemical phenomenon to predictors of major toxicities." Toxicological Sciences.
- Orban, L., Sreenivasan, R. & Olsson, P.-E. (2009). "Long and winding roads: Testis differentiation in zebrafish." Molecular and Cellular Endocrinology **312**(1-2): 35-41.
- Örn, S., Andersson, P. L., Förlin, L., Tysklind, M. & Norrgren, L. (1998). "The impact on reproduction of an orally administered mixture of selected PCBs in zebrafish (*Danio rerio*)." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **35**(1): 52-57.
- Örn, S., Holbech, H., Madsen, T. H., Norrgren, L. & Petersen, G. I. (2003). "Gonad development and vitellogenin production in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to ethinylestradiol and methyltestosterone." Aquatic Toxicology **65**(4): 397-411.
- Pack, M., Solnica-Krezel, L., Malicki, J., Neuhauss, S. C., Schier, A. F., Stemple, D. L., Driever, W. & Fishman, M. C. (1996). "Mutations affecting development of zebrafish digestive organs." Development **123**: 321-328.
- Parente, T. E. M., De-Oliveira, A. C. A. X., Beghini, D. G., Chapeaurouge, D. A., Perales, J. & Paumgarten, F. J. R. (2009). "Lack of constitutive and inducible ethoxyresorufin-O-deethylase activity in the liver of suckermouth armored catfish (*Hypostomus affinis* and *Hypostomus auroguttatus*, *Loricariidae*)." Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP **150**(2): 252-260.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N. & Engeszer, R. E. (2009). "Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish." Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists **238**(12): 2975-3015.
- Plísková, M., Vondráček, J., Canton, R. F., Nera, J., Kocan, A., Petřík, J., Trnovec, T., Sanderson, T., van den Berg, M. & Machala, M. (2005). "Impact of polychlorinated biphenyls contamination on estrogenic activity in human male serum." Environmental Health Perspectives **113**(10): 1277-1284.
- Pocar, P., Brevini, T. A. L., Antonini, S. & Gandolfi, F. (2006). "Cellular and molecular mechanisms mediating the effect of polychlorinated biphenyls on oocyte *in vitro* maturation." Reproductive Toxicology **22**(2): 242-249.
- Pompa, G., Caloni, F. & Fracchiolla, M. L. (2003). "Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: assessment of human exposure. Review of the international situation." Veterinary Research Communications **27 Suppl 1**: 159-167.
- Ramade, F. (1992). Précis d'écotoxicologie, Masson.

- Richthoff, J., Rylander, L., Jönsson, B. A. G., Akesson, H., Hagmar, L., Nilsson-Ehle, P., Stridsberg, M. & Giwercman, A. (2003). "Serum levels of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (CB-153) in relation to markers of reproductive function in young males from the general Swedish population." Environmental Health Perspectives **111**(4): 409-413.
- Ripley, J. L. & Foran, C. M. (2009). "Elevated whole brain arginine vasotocin with Aroclor 1254 exposure in two syngnathus pipefishes." Fish Physiology and Biochemistry **36**(4): 917-921.
- Rombough, P. (2002). "Gills are needed for ionoregulation before they are needed for O₂ uptake in developing zebrafish, *Danio rerio*." Journal of Experimental Biology **205**(12): 1787-1794.
- Rombough, P. & Moroz, B. (1997). "The scaling and potential importance of cutaneous and branchial surfaces in respiratory gas exchange in larval and juvenile walleye." Journal of Experimental Biology **200**(18): 2459-2468.
- Rombough, P. J. (1988). Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life. The Physiology of Developing Fish - Eggs and Larvae. W. S. Hoar and D. J. Randall, Academic Press. **Volume 11, Part 1**: 59-161.
- Ross, G. (2004). "The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment." Ecotoxicology and Environmental Safety **59**(3): 275-291.
- Rowe, A. A., Totten, L. A., Xie, M., Fikslin, T. J. & Eisenreich, S. J. (2007). "Air-water exchange of polychlorinated biphenyls in the Delaware River." Environmental Science & Technology **41**(4): 1152-1158.
- Rypel, A. L. & Bayne, D. R. (2010). "Do fish growth rates correlate with PCB body burdens?" Environmental Pollution **158**(8): 2533-2536.
- Sable, H. J. K., Powers, B. E., Wang, V. C., Widholm, J. J. & Schantz, S. L. (2006). "Alterations in DRH and DRL performance in rats developmentally exposed to an environmental PCB mixture." Neurotoxicology and Teratology **28**(5): 548-556.
- Sadler, K. C., Krahn, K. N., Gaur, N. A. & Ukomadu, C. (2007). "Liver growth in the embryo and during liver regeneration in zebrafish requires the cell cycle regulator, uhrf1." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(5): 1570-1575.
- Safe, S. (2005). "Clinical correlates of environmental endocrine disruptors." Trends in Endocrinology and Metabolism **16**(4): 139-144.
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A. N. & Sarker, S. (2006). "Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring." Ecotoxicology **15**(4): 333-340.
- Schantz, M. M., Parris, R. M., Kurz, J., Ballschmiter, K. & Wise, S. A. (1993). "Comparison of methods for the gas-chromatographic determination of PCB congeners and chlorinated pesticides in marine reference materials." Fresenius' Journal of Analytical Chemistry **346**(6-9): 766-778.
- Schell, L. M. & Gallo, M. V. (2010). "Relationships of putative endocrine disruptors to human sexual maturation and thyroid activity in youth." Physiology & Behavior **99**(2): 246-253.
- Schmidt, K., Staaks, G. B. O., Pflugmacher, S. & Steinberg, C. E. W. (2005). "Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture of both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*)." Aquatic Toxicology **71**(1): 49-59.
- Schmitt, E. A. & Dowling, J. E. (1994). "Early-eye morphogenesis in the zebrafish, *Brachydanio rerio*." The Journal of Comparative Neurology **344**(4): 532-542.

- Schmitt, E. A. & Dowling, J. E. (1999). "Early retinal development in the zebrafish, *Danio rerio*: light and electron microscopic analyses." The Journal of Comparative Neurology **404**(4): 515-536.
- Schnitzler, J. G., Koutrakis, E., Siebert, U., Thomé, J. P. & Das, K. (2008). "Effects of persistent organic pollutants on the thyroid function of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) from the Aegean sea, is it an endocrine disruption?" Marine Pollution Bulletin **56**(10): 1755-1764.
- Schorer, M. & Eisele, M. (1997). "Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment." Water, Air, & Soil Pollution **99**(1-4): 651-659.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J.-J., Le Gac, F., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H. & Miura, T. (2010). "Spermatogenesis in fish." General and Comparative Endocrinology **165**(3): 390-411.
- Schwarz, M. & Appel, K. E. (2005). "Carcinogenic risks of dioxin: Mechanistic considerations." Regulatory Toxicology and Pharmacology **43**(1): 19-34.
- Simonich, S. L. M., Motorykin, O. & Jariyasopit, N. (2011). "PAH intermediates: Links between the atmosphere and biological systems." Chemico-Biological Interactions **192**(1-2): 26-29.
- Soffientino, B., Nacci, D. E. & Specker, J. L. (2010). "Effects of the dioxin-like PCB 126 on larval summer flounder (*Paralichthys dentatus*)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **152**(1): 9-17.
- Someya, M., Ohtake, M., Kunisue, T., Subramanian, A., Takahashi, S., Chakraborty, P., Ramachandran, R. & Tanabe, S. (2010). "Persistent organic pollutants in breast milk of mothers residing around an open dumping site in Kolkata, India: specific dioxin-like PCB levels and fish as a potential source." Environment International **36**(1): 27-35.
- Spitsbergen, J. M. & Kent, M. L. (2003). "The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research - Advantages and current limitations." Toxicologic Pathology **31**(Suppl): 62-87.
- Spitsbergen, J. M., Tsai, H.-W., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J. D. & Bailey, G. S. (2000). "Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-diniethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages." Toxicologic Pathology **28**(5): 705-715.
- Stoilov, I., Jansson, I., Sarfarazi, M. & Schenkman, J. B. (2001). "Roles of cytochrome p450 in development." Drug Metabolism and Drug Interactions **18**(1): 33-55.
- Sumpter, J. P. & Jobling, S. (1995). "Vitellogenesis as a biomarker for estrogenic contamination of the aquatic environment." Environmental Health Perspectives **103**(Suppl 7): 173-178.
- Takahashi, H. (1977). "Juvenile hermaphroditism in the zebrafish (*Brachydanio rerio*)." Bull. Fac. Fish., Hokkaido Univ. **28**: 57-65.
- Taranger, G. L., Carrillo, M., Schulz, R. W., Fontaine, P., Zanuy, S., Felip, A., Weltzien, F.-A., Dufour, S., Karlsen, O., Norberg, B., Andersson, E. & Hansen, T. (2010). "Control of puberty in farmed fish." General and Comparative Endocrinology **165**(3): 483-515.
- Teraoka, H., Dong, W., Tsujimoto, Y., Iwasa, H., Endoh, D., Ueno, N., Stegeman, J. J., Peterson, R. E. & Hiraga, T. (2003). "Induction of cytochrome P450 1A is required for circulation failure and edema by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish." Biochemical and Biophysical Research Communications **304**(2): 223-228.
- Thomas, P. (1989). "Effects of Aroclor 1254 and cadmium on reproductive endocrine function and ovarian growth in atlantic croaker." Marine Environmental Research **28**(1-4): 499-503.

- Timme-Laragy, A. R., Van Tiem, L. A., Linney, E. A. & Di Giulio, R. T. (2009). "Antioxidant responses and NRF2 in synergistic developmental toxicity of PAHs in zebrafish." Toxicological Sciences **109**(2): 217-227.
- Tomy, G. T., Palace, V. P., Halldorson, T., Braekevelt, E., Danell, R., Wautier, K., Evans, B., Brinkworth, L. & Fisk, A. T. (2004). "Bioaccumulation, biotransformation, and biochemical effects of brominated diphenyl ethers in juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush*)." Environmental Science & Technology **38**(5): 1496-1504.
- Tracey & Hansen (1996). "Use of biota-sediment accumulation factors to assess similarity of nonionic organic chemical exposure to benthically-coupled organisms of differing trophic mode." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **30**(4): 467-475.
- Urbaniak, M. (2007). "Polychlorinated biphenyls: Sources, distribution and transformation in the environment - A literature review." Acta Toxicologica **15**(2): 83-93.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L., Bosveld, A. T., Brunstrom, B., Cook, P., Feeley, M., Giesy, J. P., Hanberg, A., Hasegawa, R., Kennedy, S. W., Kubiak, T., Larsen, J. C., van Leeuwen, F. X., Liem, A. K., Nolt, C., Peterson, R. E., Poellinger, L., Safe, S., Schrenk, D., Tillitt, D., Tysklind, M., Younes, M., Waern, F. & Zacharewski, T. (1998). "Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife." Environmental Health Perspectives **106**(12): 775-792.
- Van Der Weiden, M. E. J., Hanegraaf, F. H. M., Seinen, W., Van Den Berg, M., Eggen, M. L. & Celander, M. (1994). "Temporal induction of cytochrome p450 1a in the mirror carp (*Cyprinus carpio*) after administration of several polycyclic aromatic hydrocarbons." Environmental Toxicology and Chemistry **13**(5): 797-802.
- van Ginneken, V., Palstra, A., Leonards, P., Nieveen, M., van den Berg, H., Flik, G., Spanings, T., Niemantsverdriet, P., van den Thillart, G. & Murk, A. (2009). "PCBs and the energy cost of migration in the European eel (*Anguilla anguilla* L.)." Aquatic Toxicology **92**(4): 213-220.
- Vascotto, S. G., Beckham, Y. & Kelly, G. M. (1997). "The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology." Biochemistry and Cell Biology **75**(5): 479-485.
- W. Kördel, M. D., J. Lintelmann and S. Padberg (1997). "The importance of natural organic material for environmental processes in waters and soils (Technical Report)." Pure Applied Chemistry **Volume 69**(No. 7): pp. 1571-1600.
- Walker, M. K., Peterson, R.E. (1994). Aquatic toxicity of dioxins and related chemicals. New York, Plenum Press.
- Wallace, K. N. & Pack, M. (2003). "Unique and conserved aspects of gut development in zebrafish." Developmental Biology **255**(1): 12-29.
- Wallace, R. A. & Selman, K. (1981). "Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts." American Zoologist **21**(2): 325-343.
- Waring, C. P., Stagg, R. M., Fretwell, K., McLay, H. A. & Costello, M. J. (1996). "The impact of sewage sludge exposure on the reproduction of the sand goby, *Pomatoschistus minutus*." Environmental Pollution **93**(1): 17-25.
- Wassenberg, D. M. & Di Giulio, R. T. (2004). "Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*." Environmental Health Perspectives **112**(17): 1658-1664.
- Wassenberg, D. M., Swails, E. E. & Di Giulio, R. T. (2002). "Effects of single and combined exposures to benzo(a)pyrene and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl on EROD activity and development in *Fundulus heteroclitus*." Marine Environmental Research **54**(3-5): 279-283.

- Weisberg, S. B., Himchak, P., Baum, T., Wilson, H. T. & Allen, R. (1996). "Temporal trends in abundance of fish in the tidal Delaware river." Estuaries **19**(3): 723-729.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H. & Akcha, F. (2010). "Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*)." Marine Environmental Research **69**(Supplement 1): S71-S73.
- Westerlund, L., Billsson, K., Andersson, P. L., Tysklind, M. & Olsson, P.-E. (2000). "Early life-stage mortality in zebrafish (*Danio rerio*) following maternal exposure to polychlorinated biphenyls and estrogen." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(6): 1582-1588.
- Woo, S., Kim, S., Yum, S., Yim, U. H. & Lee, T. K. (2006). "Comet assay for the detection of genotoxicity in blood cells of flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to sediments and polycyclic aromatic hydrocarbons." Marine Pollution Bulletin **52**(12): 1768-1775.
- Yang, F., Zhang, Q., Guo, H. & Zhang, S. (2010). "Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and teratogenicity of marine sediments from Qingdao coastal areas using *in vitro* fish cell assay, comet assay and zebrafish embryo test." Toxicology In Vitro **24**(7): 2003-2011.
- Yum, S., Woo, S., Kagami, Y., Park, H.-S. & Ryu, J.-C. (2010). "Changes in gene expression profile of medaka with acute toxicity of Arochlor 1260, a polychlorinated biphenyl mixture." Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP **151**(1): 51-56.
- Zhang, Y. & Tao, S. (2009). "Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004." Atmospheric Environment **43**(4): 812-819.
- Zhou, H., Wu, H., Liao, C., Diao, X., Zhen, J., Chen, L. & Xue, Q. (2010). "Toxicology mechanism of the persistent organic pollutants (POPs) in fish through AhR pathway." Toxicology Mechanisms and Methods **20**(6): 279-286.
- Zonneveld, C. & Kooijman, S. (1993). "Comparative kinetics of embryo development." Bulletin of Mathematical Biology **55**(3): 609-635.

Annexes

1 Expériences avec les PCB

1.1 Contamination des géniteurs avec les PCB

Deux expériences de contamination aux PCB de longue durée ont été effectuées. La première expérience, en 2007, a duré 13 semaines et consistait à contaminer deux cents poissons adultes de 6 mois d'âge et de 3 cm en moyenne de taille avec un mélange de 4 congénères de PCB. La deuxième expérience a débuté le 23 mai 2009 et a pris fin le 13 mai 2010, soit 355 jours de contamination avec un mélange de 13 congénères de PCB (Figure 44).

La contamination a été faite par la voie alimentaire, grâce à de la nourriture contaminée avec un mélange de PCB existant dans l'environnement.

La concentration de référence des PCB se base sur celle du CB-153, qu'on retrouve dans les moules (*Mytilus edulis*) de la baie de Seine à une concentration de 320 ng/g PS. La concentration souhaitée de ce congénère dans le mélange alimentaire était de 500 ng/g ; la contamination a donc été réalisée à des doses environnementales. Le mélange PCB 500 contenait 500 ng/g du congénère CB-153, tandis que le mélange PCB 100 en contenait 100 ng/g. Les mélanges ont été préparés à Ifremer Brest par Véronique Loizeau (Laboratoire de Biogéochimie des Contaminants Organiques).

Les congénères de PCB utilisés ne sont pas classés parmi les plus toxiques. Quelques congénères mono ortho-substitués (ex : 105, 118 et 156) sont présents dans les mélanges mais ceux-ci perdent un peu de leur toxicité par rapport aux "dioxin-like" coplanaires qui sont fortement toxiques, mais peu présents dans l'environnement.

Les CB-28 et CB-52 présentent respectivement 3 et 4 atomes de Cl (MW=257,5 et 295 g/mol) ; les CB-101, CB-105 et CB-118 ont 5 substitutions de Cl (MW=326,5 g/mol) ; les CB-132, CB-138, CB-149, CB-153 et CB-156 ont tous 6 atomes de Cl (MW= 361 g/mol) ; les CB-170 et CB-180 ont 7 atomes de Cl (MW= 361 g/mol) ; les CB-170 et CB-180 ont 8 substitutions (MW= 430 g/mol) et le CB-194 en a 9 (MW= 464,5 g/mol).

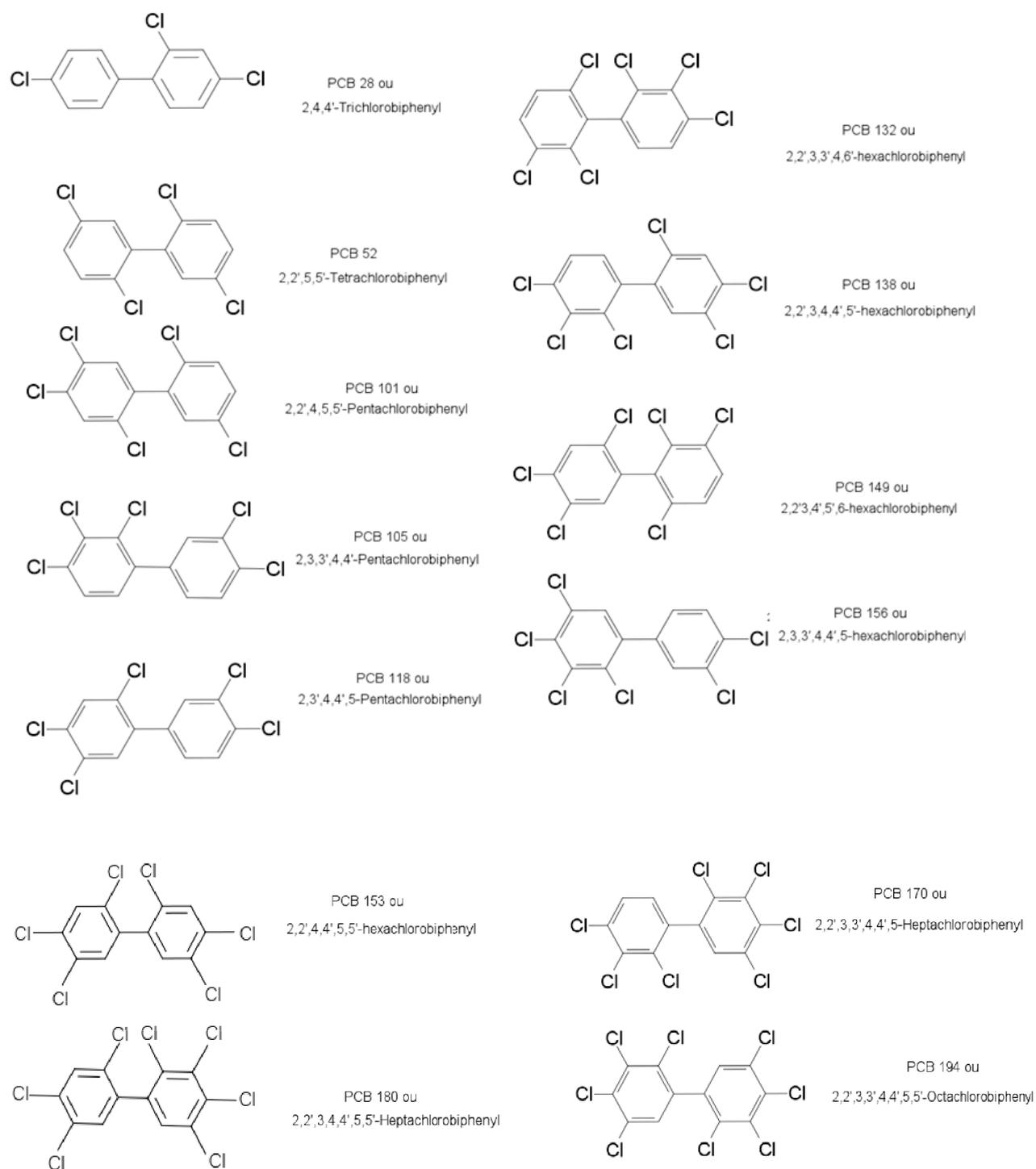


Figure 43 : Structure des PCB utilisés lors de la deuxième expérience

1.2 Doses théoriques des différents congénères utilisés

Les congénères les plus retrouvés dans les tissus des êtres vivants sont présents en plus grande quantité que les autres PCB dans notre mélange (CB-138 et CB-153). Le CB-153 est pris comme référence car il est extrêmement bioaccumulé dans les tissus du fait de sa faible

métabolisation. Pour nos expériences, la nourriture a été enrobée avec deux mélanges de PCB (Tableau 16, Tableau 17).

Tableau 16 : Concentrations théoriques des 4 CB mélangés à la nourriture pour la première expérience

	<i>CB-105</i>	<i>CB-118</i>	<i>CB-149</i>	<i>CB-153</i>	Σ <i>CB ng/g</i>
Na/S	0	0	0	0	0
[PCB] 10 ng/g	2.5	5	5	10	22.5
[PCB] 100 ng/g	25	50	50	100	225
[PCB] 500 ng/g	125	250	250	500	1125

Tableau 17 : Concentrations théoriques des 13 CB mélangés à la nourriture pour la seconde expérience

	<i>CB-28</i>	<i>CB-52</i>	<i>CB-101</i>	<i>CB-105</i>	<i>CB-118</i>	<i>CB-132</i>	<i>CB138</i>
# de substitution	3	4	5	5	5	5	6
% dans le mélange	0.1	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	1
[PCB] 100 ng/g	10	25	50	25	50	25	100
[PCB] 500 ng/g	50	125	250	125	250	125	500
	<i>CB-149</i>	<i>CB-153</i>	<i>CB-156</i>	<i>CB-170</i>	<i>CB-180</i>	<i>CB-194</i>	Σ <i>CB ng/g</i>
# de substitution	6	6	6	7	7	8	
% dans le mélange	0.5	1	0.25	0.25	0.5	0.1	
[PCB] 100 ng/g	50	100	25	25	50	10	545
[PCB] 500 ng/g	250	500	125	125	250	50	2725

1.3 Expériences réalisées pendant la contamination

1.3.1 Biométrie

Durant toutes nos expériences, les poissons zèbres sont suivis régulièrement à partir du début du stade juvénile pour étudier leur croissance ou les anomalies de développement.

Ces poissons sont anesthésiés avec de la benzocaïne (50µl/100 ml) à faible dose puis pesés et mesurés. Ces manipulations ont été réalisées tous les dix ou quinze jours, afin d'étudier la cinétique de croissance et l'effet du régime alimentaire contaminé. La quantité alimentaire est recalculée après chaque biométrie, pour que les poissons mangent 2 % de leur poids par jour.

Des prélèvements de poisson entier et d'œufs des différentes conditions ont été faits et envoyés à IFREMER Brest pour l'analyse de la concentration de PCB. Ils ont été stockés directement à -20°C dans du papier aluminium.

1.3.2 Fixation et stockage des embryons

Les embryons sont fixés avec du PFA 4% pendant deux heures à température ambiante, ou la nuit à 4°C. Puis ils sont déshydratés par des lavages successifs de 5 minutes, avec du méthanol/PBT 25%, 50%, 70% et enfin méthanol 100%. A ce stade de déshydratation, les

embryons sont stockés à -20°C. Le stock est utilisé après une réhydratation progressive en PBT pour des hybridations *in situ* ou des immunohistomarquages.

Les stades de fixation utilisés sont 24 hpf, 48 hpf, 72 hpf et 96 hpf, (stades clés de mise en place de plusieurs structures) afin d'analyser l'état de développement des muscles, du système nerveux, du cœur et d'autres systèmes.

1.3.3 Dépigmentation des embryons

Les embryons de poissons zèbres sont pigmentés à partir de 60 hpf. Cette pigmentation peut poser problème et gêner l'observation lors d'immunohistomarquage ou d'hybridation *in situ*. Deux méthodes sont utilisées pour dépigmenter les embryons :

1^{ère} méthode :

Tableau 18 : Dosages utilisés pour la première méthode de dépigmentation des embryons

<i>Produit</i>	<i>Volume</i>
eau DEPC	5,95 ml
20X SSC	0,25 ml
formamide	0,5 ml
30% H ₂ O ₂	3,3 ml
Total	10 ml

Placer les embryons dans ce mélange (Tableau 18) sur la plaque U.V., puis attendre la décoloration. La décoloration se fait en 3 à 5 minutes généralement. L'arrêt de la réaction se fait par un lavage au PBT.

2^{ème} méthode¹ :

Incuber les embryons dans une solution de 3 % H₂O₂ / 0.5% KOH. La dépigmentation peut prendre entre 30 min et 1 heure selon les stades, puis un lavage est appliqué afin d'éliminer l'H₂O₂, qui peut abîmer les tissus. La dépigmentation est observée sous la loupe binoculaire.

1.3.4 Marquage

1.3.4.1 Hybridation *in situ* (HIS)

¹ Thisse, C. & Thisse, B. (2008) *High-resolution in situ hybridization to whole-mount zebrafish embryos*. Nat Protoc 3, 59-69.

Pendant ma thèse, des hybridations *in situ* ont été réalisées grâce à un robot Biolane HTI 2*48 puits, sur des embryons provenant des géniteurs contaminés aux PCB par voie orale et des géniteurs contrôles. Les embryons de la première exposition ont été analysés avec les sondes *myod* (Figure 46) et *myogénine*, mais aucune modification d'expression de ces gènes n'a été observée. Ces deux gènes appartiennent aux MRF (facteurs de régulation myogénique), qui régulent la mise en place des muscles. Le protocole utilisé est issu de "*Zebrafish, a practical approach*"² et adapté pour le robot Biolane HTI.

Les embryons provenant de la deuxième expérience de contamination ont été stockés à 3 stades différents : 24, 48 et 96 hpf. Ces embryons n'ont pas encore été analysés.

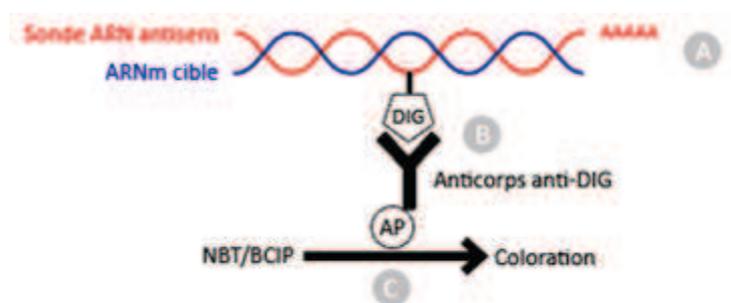


Figure 44 : Principe général de l'hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* permet le marquage spécifique d'un ARNm. Un ARN anti-sens est synthétisé à partir d'une matrice ADN (Figure 45-A). Cet ARN anti-sens est synthétisé avec de la digoxigénine et s'hybride à l'ARNm cible (dont il est complémentaire) présent dans les cellules. Il y a ensuite reconnaissance avec un anticorps anti-digoxigénine (Figure 45-B), qui est couplé à la phosphatase alcaline (AP). L'AP réagit avec le NBT/BCIP (Figure 45-C).

² Nüsslein-Volhard, Christiane, and Ralf Dahm. 2002. *Zebrafish: a practical approach*. Oxford University Press, September 15.

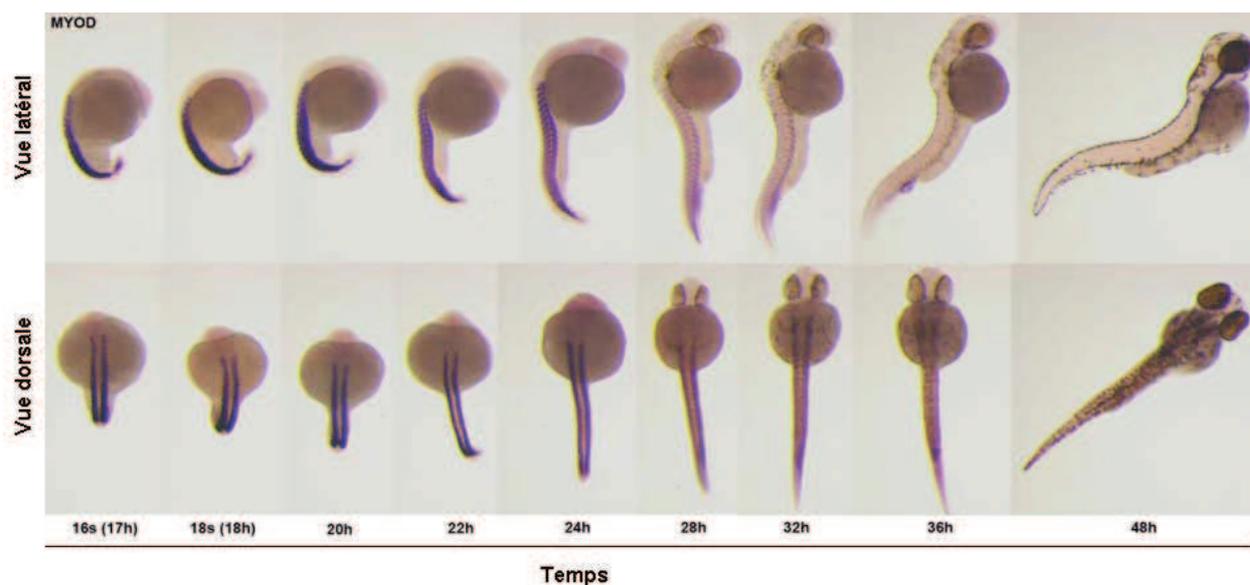


Figure 45 : Patron d'expression du gène *myoD*

La Figure 45 présente le profil d'expression spatio-temporel contrôle du gène *myoD*, réalisé sur des embryons non contaminés et issus d'une même ponte entre les stades 16 somites (17 heures environ) et 48 hpf.

1.3.4.2 Synthèse de sonde

Les sondes utilisées lors des hybridations *in situ* sont des sondes ribonucléiques marquées à l'UTP-digoxigenine, synthétisées grâce à des produits Roche. La synthèse se fait en deux étapes. Tout d'abord, une PCR ("Polymerase Chain Reaction"), dont le but est d'amplifier l'ADN complémentaire (ADNc) qui servira de matrice lors de la synthèse de sonde est réalisée. Après avoir vérifié l'amplification de l'ADNc par migration sur gel d'agarose, le produit de PCR sera purifié grâce au kit NucleoSpin Extract (Macherey-Nagel). Puis on procède à la synthèse de sonde, avec l'ARN polymérase appropriée à 37°C.

1.3.4.3 Immunohistochimie (IHC)

Le principe de cette expérience est le marquage des protéines dans une cellule, afin de les localiser, en utilisant la propriété des anticorps à se lier à un antigène spécifique.

Dans cette expérience, des anticorps primaires sont utilisés (Tableau 19) pour marquer des structures morphologiques comme les fibres musculaires (F310, MF20), le système nerveux (Zn12, Zn8, Znp1) et le cœur (MF20, S46). Ce marquage spécifique nous permet de voir l'état des structures, leur développement et l'absence ou la présence d'une protéine.

L'anticorps primaire est ensuite reconnu par un anticorps secondaire conjugué à un fluorophore (Alexa-fluor) (voir Annexe 4.2 p.138). Ces marquages ont été réalisés pour la première expérience mais aucune différence entre les embryons issus de géniteurs contaminés et les embryons issus de géniteurs contrôles n'a été observée.

Tableau 19 : Tableau des anticorps primaires

<i>Non de l'AC</i>	<i>Dilution</i>	<i>Structure marquée</i>
Zm-1	1/100	Muscle
Zn-1	1/50	Système nerveux
F310	1/300	Muscle rapide
F59	1/10	Muscle lent
Pax-7	1/20	Muscle
Znp-1	1/100	Système nerveux
Mf20	1/10	Muscle/cœur
Zn8	1/20	Système nerveux
S46	1/10	Cœur
Zn12	1/20	Système nerveux

1.3.4.4 Visualisation des embryons

Après un marquage, les embryons sont mis sur des lames creuses et visualisés grâce à une loupe binoculaire Olympus équipée d'une caméra Sony SX910. Les embryons provenant de l'HIS sont conservés et visualisés avec du glycérol 100 % ; les embryons avec un marquage IHC sont conservés dans du glycérol 100 %, mais la visualisation se fait dans une goutte de VectaShield. Les prises de vue sont réalisées à l'aide du logiciel Visilog 6.

2 Hydrocarbures polycycliques aromatiques : B[a]P / DMBA / Pyr / Fl : expériences.

2.1 Concentrations réelles

Toutes les expériences d'expositions aux HAP sont réalisées en triplicats et répétées plusieurs fois. Le sédiment est toujours issu de la même source et l'enrobage toujours effectué par le même laboratoire. Quatre fioles en verre contiennent 5 g de sédiment chacune, servant pour les trois réplicats et une pour le dosage (Tableau 20).

Tableau 20 : Concentrations théoriques et réelles du sédiment enrichi et rendement pour le B[a]P, DMBA, Fl et Pyr
(*nd* : non déterminé)

<i>Échantillon</i>	<i>B[a]P SOLVANT</i>	<i>B[a]P 0,5X</i>	<i>B[a]P 1X</i>	<i>B[a]P 5X</i>	<i>B[a]P 25X</i>	<i>B[a]P 100X</i>
Concentration théorique (ng/g sédiment sec)	<i>nd</i>	250	500	2500	12500	50000
Concentration dosée (ng/g sédiment sec)	<i>nd</i>	59	123	741	4909	22052
Rendement (%)	83	85	88	70	96	100
<i>Échantillon</i>	<i>DMBA solvant</i>	<i>DMBA 0,5X</i>	<i>DMBA 1X</i>	<i>DMBA 5X</i>	<i>DMBA 25X</i>	<i>DMBA 100X</i>
Concentration théorique (ng/g sédiment sec)	<i>nd</i>	104.84	348.20	1 489.77	9 475.50	28 172.28
Concentration dosée (ng/g sédiment sec)	<i>nd</i>	262	489	2494	12233	47630
Rendement (%)	88	76	85	92	75	77
<i>Échantillon</i>	<i>Fl solvant</i>	<i>Fl 0,5X</i>	<i>Fl 1X</i>	<i>Fl 5X</i>	<i>Fl 25X</i>	<i>Fl 100X</i>
Concentration théorique (ng/g sédiment sec)	0	255	514	2408	12215	48930
Concentration dosée (ng/g sédiment sec)	<i>nd</i>	224	438	1724	8859	43632
Rendement (%)	-	87.67	85.21	71.6	72.52	89.17
<i>Échantillon</i>	<i>Pyr solvant</i>	<i>Pyr 0,5X</i>	<i>Pyr 1X</i>	<i>Pyr 5X</i>	<i>Pyr 25X</i>	<i>Pyr 100X</i>
Concentration théorique (ng/g sédiment sec)	<i>nd</i>	241	510	2479	12160	50023
Concentration dosée (ng/g sédiment sec)	2	184	448	1730	7940	42840
Rendement (%)	-	76.35	87.84	69.79	65.30	85.64

2.2 Protocole expérimental

La contamination est effectuée *in vitro* : 5 g de sédiment sont déposés dans une boîte de Petri de 3,5 cm de diamètre, avec 3 mL d'E3 et un panier fabriqué avec une toile à bluter de 1 mm de maille, qui permet le dépôt des œufs sur le sédiment. Ils seront donc en contact direct avec le sédiment. Une trentaine d'œufs fécondés sont disposés sur le sédiment préalablement

réparti dans les boîtes de Petri. Les œufs sont issus d'un mélange de plusieurs pontes fécondées à plus de 80%, triés et répartis en groupes de 30. Les boîtes de Pétri sont déposés dans une étuve à 28°C avec une faible lumière blanche (Figure 47, Figure 48).

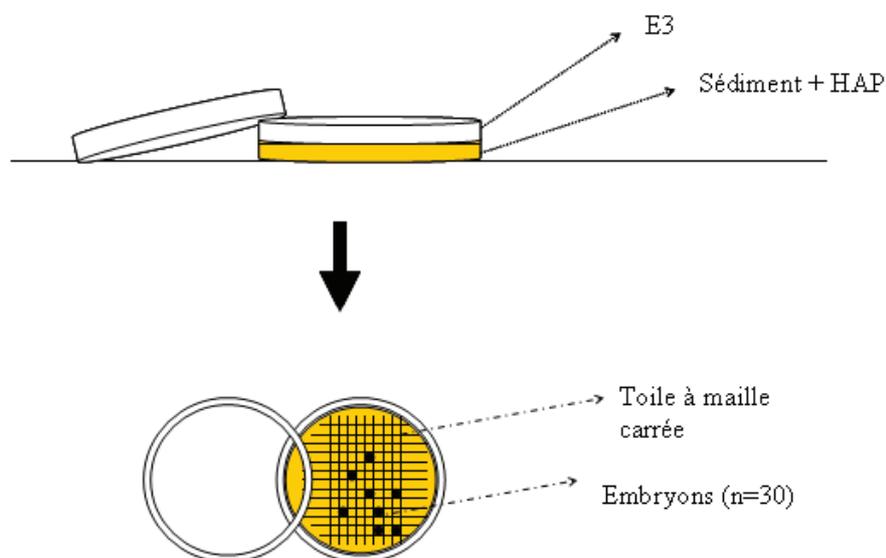


Figure 46 : Schéma d'exposition des embryons au sédiment contaminé
Le sédiment est présenté en jaune et les embryons en noir, entre les mailles de la toile à bluter.

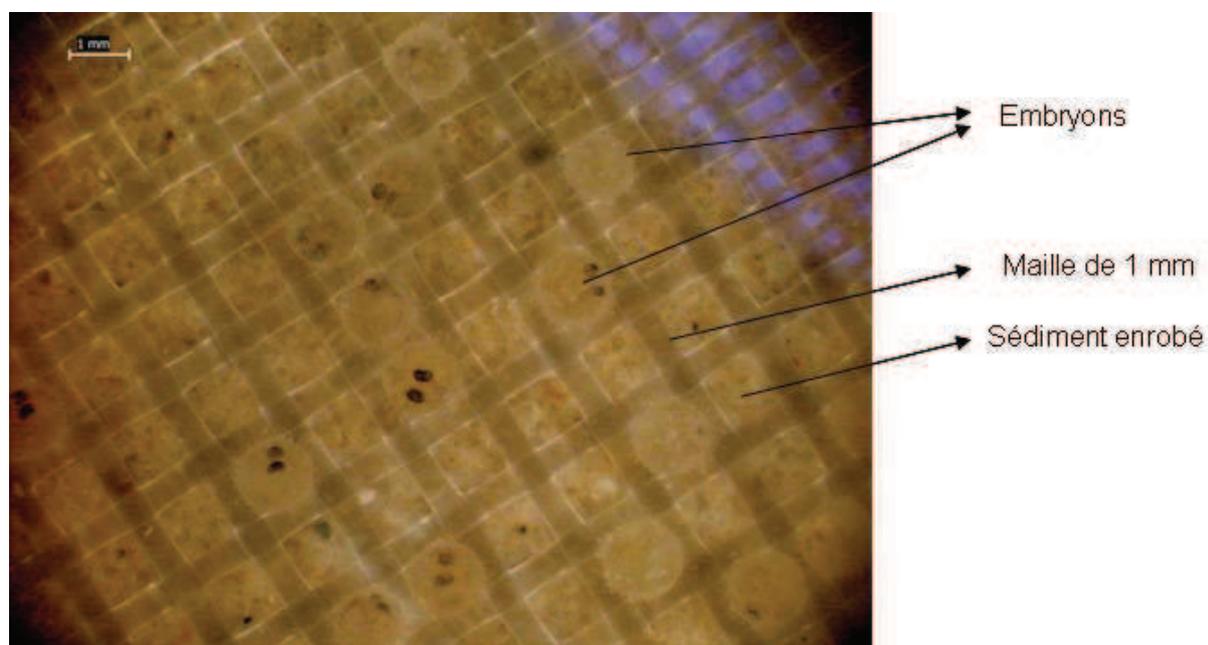


Figure 47 : Photo des embryons en contact avec le sédiment

2.3 Directive REACH

La directive REACH consiste à enregistrer, déclarer, autoriser et restreindre l'utilisation des produits chimiques. C'est une directive européenne (REACH EC/2006/1907 le 18 décembre

2006) qui permet de mieux réguler la production et l'utilisation des produits chimiques et qui permet d'étudier leur impact sur la santé humaine et l'environnement. Cette directive est entrée en vigueur en juin 2007. Les objectifs de la directive REACH sont :

- 1- Régulariser les substances produites ou importées en quantités inférieures à 1 tonne/an.
- 2- Classifier les substances chimiques selon leur toxicité et leurs effets ; les industriels et les utilisateurs doivent démontrer l'innocuité des 30 000 substances chimiques couramment utilisées et susceptibles d'être néfastes pour notre santé.

En outre, cette directive recommande de limiter le nombre de test *in vivo*. Nos contaminations ont été effectuées sur les stades embryon-larvaires, avant le début de l'alimentation autonome. Ces expositions sont donc considérées comme *in vitro*, et sont donc en accord avec la directive REACH.

3 Poisson zèbre : entretien, reproduction et histologie

3.1 Conditions d'élevage des poissons

3.1.1 Généralités

Durant une grande partie de ma thèse (2 ans), le suivi, l'élevage et l'entretien des poissons étaient assurés par différents stagiaires et moi-même. La salle d'élevage des poissons zèbres était alors constituée de 2 colonnes d'élevage de poisson, avec un système fermé, dont le renouvellement d'eau était assuré une fois par semaine. La salle contenait aussi une dizaine de bacs utilisés lors de la première expérience de contamination avec le mélange de 4 congénères de PCB.

L'entretien général consistait en un changement d'eau des colonnes et des bacs et en un nettoyage des bacs (car ils n'étaient pas munis d'un système de changement d'eau continu).

Les colonnes sont en système fermé, avec un volume élevé d'eau qui circule grâce à une pompe. L'eau est filtrée en deux temps par différents types de mousses.

L'entretien comprend aussi la vérification de la production et de la qualité d'eau et le nourrissage des différents bacs de poissons avec la nourriture appropriée.

3.1.2 Salle poissons zèbre, fonctionnement et entretien

La salle d'élevage est une salle isolée de l'extérieur ; l'eau comme l'air y sont maintenus toute l'année à 27°C par une climatisation. Cela fournit un climat très favorable pour l'élevage et la reproduction en continu des poissons. Cette salle a aussi un cycle de lumière de 14 heures de

jour et 10 heures de nuit. La lumière se déclenche automatiquement chaque jour à 8h30 et s'éteint à 22h30. Ce cycle permet la synchronisation des pontes.

Actuellement, la salle est composée de plusieurs structures (colonnes, bacs, rangement...) contenant différentes lignées de poisson zèbre. Au total, la salle contient 8 colonnes de tailles différentes (Figure 49).

Les colonnes sont utilisées essentiellement pour l'élevage des poissons de lignées sauvages (HB, TU, AB), transgéniques et pour les expériences de contamination. Les colonnes A et B contiennent deux réserves d'eau (un en bas et un en haut) ; l'eau circule donc en continu dans les bacs. Les autres colonnes ont un fonctionnement sur le même principe.

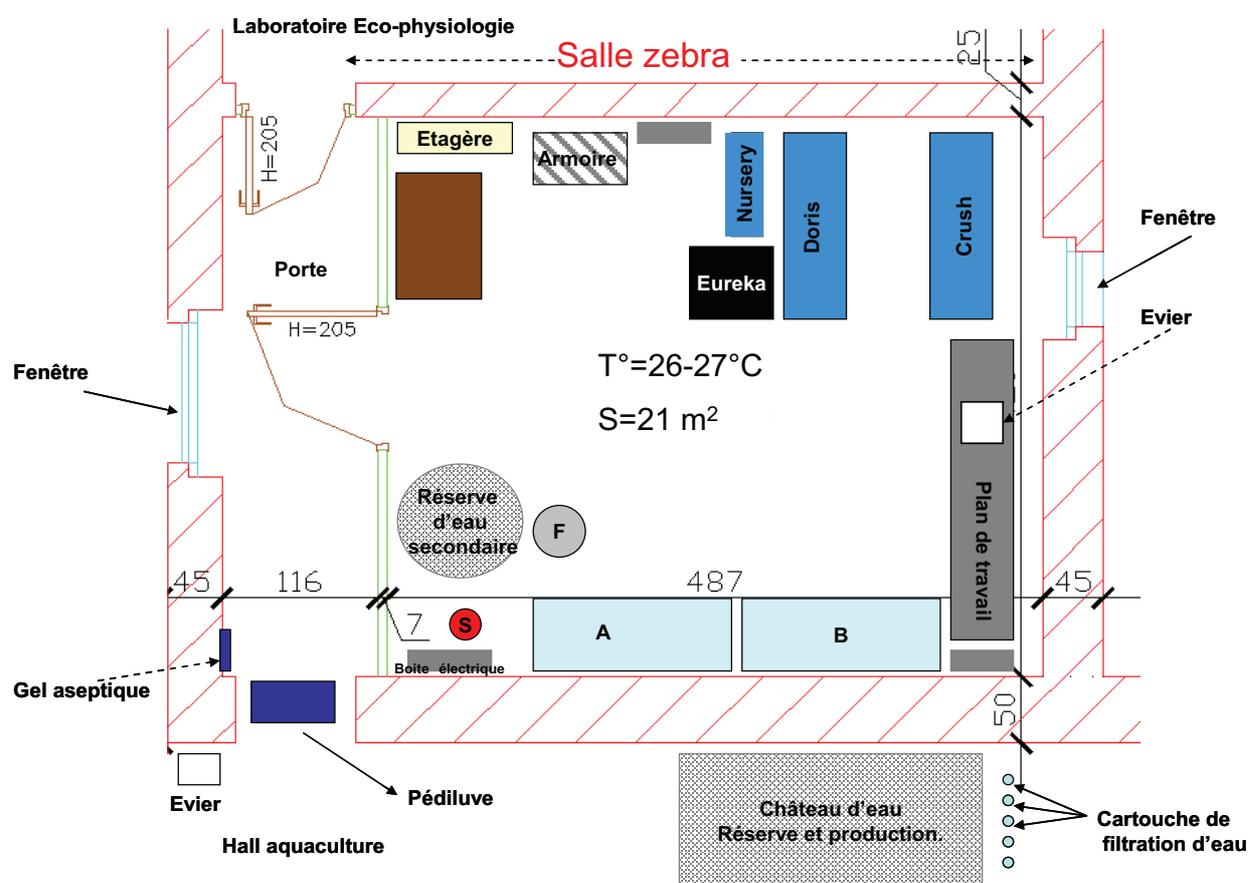


Figure 48 : Schéma de la salle d'élevage avec toutes les installations (S = surpresseur d'eau)

L'entretien de la salle d'élevage est assuré par une technicienne animalière à plein temps, avec l'aide des doctorants lors de leurs expériences. L'animalier est responsable de l'entretien des lignées sauvages (WT) et transgéniques présentes dans le laboratoire. Cela comprend l'élevage et la reproduction des différentes lignées.

Les colonnes ou les bacs sont nettoyés une fois par semaine, l'eau est changée (1/3 du volume) au moins une fois par semaine voire plus si la qualité est mauvaise. Des bactéries nitrifiantes sont ajoutées à l'eau pour diminuer la quantité de nitrite.

La salle d'élevage est approvisionnée en eau (chauffée grâce à un thermoplongeur) par une réserve d'eau qui a une capacité de stockage de 660 L, localisée dans la salle d'élevage. La production d'eau s'effectue à l'extérieur de la salle zèbre dans un château d'eau qui a une capacité de stockage double à celle de la réserve. L'eau municipale est filtrée par des cartouches anti-sédiments et anti-chlore (filtre à charbon) et passe dans un osmoseur. L'eau utilisée pour les poissons est un mélange de 2/3 de cette eau osmosée avec 1/3 d'eau du robinet non osmosée qui passe aussi dans un filtre à sédiments et un filtre à charbon. Ce mélange présente alors la dureté idéale pour le bien-être des poissons et leur bonne reproduction (ils pourraient vivre dans une eau plus dure mais se reproduiraient moins bien). Nos installations actuelles ont une capacité de production d'eau de 1000 L par jour, utilisables pour l'entretien de la salle d'élevage. Chaque accessoire de cette salle est nettoyé avant et après utilisation (épuisette, pondoirs, bacs...). Les personnes qui utilisent la colonne de contamination utilisent toujours des gants nitriles car elle est contaminée avec des PCB ou des HAP. Tout matériel utilisé pour les expériences de contamination est attribué à la colonne de contamination et ne sera jamais utilisé pour des poissons non contaminés. Pour le suivi de la salle, un cahier est mis en place pour notifier tous les changements ou actions effectués dans la salle, avec leur date et l'heure. Ce cahier est un registre, il résume la sortie ou l'entrée des poissons de la salle, leur destination ou leur lieu de provenance. Les colonnes/bacs utilisés lors des pontes et le nombre de pontes sont aussi notés.

L'élevage des embryons ne débute pas dans la salle d'élevage mais dans deux étuves thermostatées à 28°C, une pour les embryons non contaminés et l'autre pour les contaminés. Les embryons destinés à l'élevage sont ramenés dans la salle d'élevage à l'âge de 96 hpf. Ils sont alors transférés dans des pondoirs ou dans la colonne dédiée à l'élevage.

3.1.3 Installations pour les expériences de contamination

L'aquarium présenté dans la Figure 50 a été utilisé pour la première expérience de contamination.

La deuxième expérience s'est effectuée dans une colonne à circuit ouvert : l'eau se change par un système de surverse (Figure 52) puis passe par un filtre de charbon actif qui retient toutes les molécules organiques, dont les PCB et les HAP, pour éviter qu'elles ne soient déversées dans les égouts. Le charbon actif est changé tous les trois mois (Figure 51).

La colonne est approvisionnée automatiquement avec de l'eau osmosée préalablement filtrée par plusieurs cartouches (Figure 50).



Figure 49 : Aquarium individuel de 20 poissons et filtre à charbon

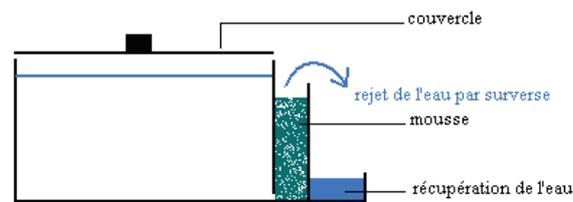


Figure 50 : Système de surverse permettant le changement d'eau lors de l'activation de la pompe
Une mousse est insérée pour éviter l'échappement des poissons

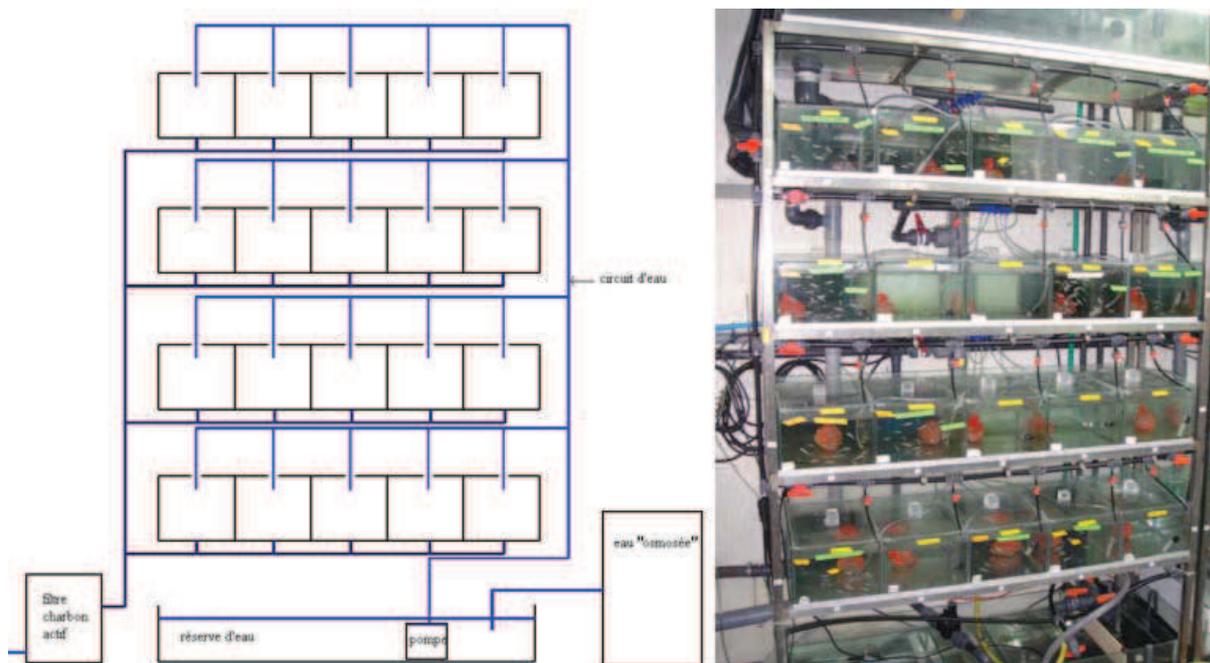


Figure 51 : Schéma et photographie de l'installation expérimentale utilisée pour la deuxième expérience de contamination aux PCB.

3.2 Reproduction, pontes et survie

Lors de la première expérience, les pontes ont été faites en couple (un mâle et une femelle de tailles équivalentes) et en groupe (3 mâles et 2 femelles), tandis que lors de la deuxième expérience, les pontes ont exclusivement été faites en couple. Habituellement, l'accouplement des poissons se fait 20 à 30 minutes après l'éclairage de la salle d'élevage. Les embryons obtenus sont collectés puis nettoyés et mis dans l'étuve à 28°C, où ils continueront à se développer normalement. Les embryons sont par la suite fixés à différents stades, selon l'analyse souhaitée.

Pour la première expérience, les pontes sont réalisées dans des pondoirs (Figure 52, Figure 53), à l'extérieur des aquariums. Un insert, constitué d'une maille laissant passer les œufs, est placé dans le pondoir afin que ceux-ci soient hors de portée des géniteurs, qui pourraient les manger. Des billes sont ajoutées dans l'insert pour simuler un substrat naturel (comme les graviers). Un couvercle est nécessaire afin d'éviter les sauts des poissons hors des pondoirs. Pour la deuxième expérience, des pondoirs avec des billes sont introduits dans chaque aquarium de la colonne, à la fin du stade juvénile, pour déterminer l'âge de la première ponte. Puis, à l'âge adulte, ils sont mis à pondre en couple, à l'extérieur de l'aquarium, dans des pondoirs de 1 L. Chaque soir, un aquarium nature, un solvant, un PCB 100 et un PCB 500 sont choisis pour être mis à pondre. Un roulement des aquariums est effectué, afin que les poissons ne soient jamais sollicités plus d'une fois par semaine.

Les œufs sont collectés avec une épuisette à maille fine, comptés, nettoyés, triés (comptage et élimination de tous les œufs non fécondés ou anormaux), puis mis dans du E3 (solution physiologique permettant le bon développement des embryons). Afin de suivre la survie (sans apport de nourriture), 100 embryons sont transférés dans une boîte de Pétri de 80 mL ; 100 embryons sont fixés avec du PFA 4 % puis stockés dans du méthanol. Certaines séries de pontes sont gardées pour l'élevage, pour l'étude des effets transgénérationnels des polluants.

Des pontes entières sont stockées à -20°C pour le dosage des PCB dans les œufs.



Figure 52 : Pondoir contenant des billes introduit dans un bac

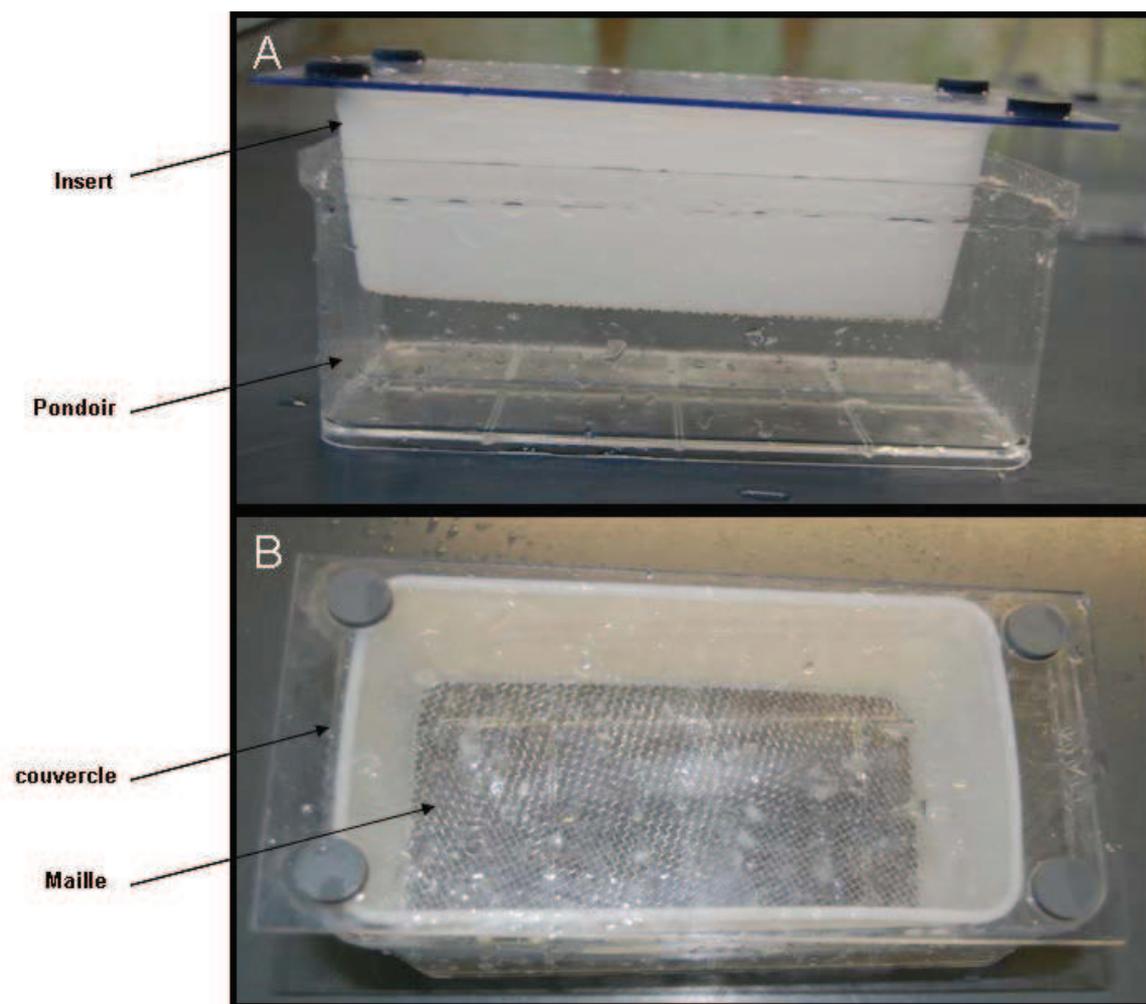


Figure 53 : Pondoir de 1 L
A) Vue latérale ; B) Vue de haut

3.3 Histologie du poisson zèbre

Une quarantaine de poissons de chaque condition (contrôle, PCB 100 et PCB 500) ont été stockés dans du formol à 4 % (spécifique pour l'histologie). Les 120 poissons (20 poissons nature, 20 poissons solvant, 40 poissons PCB 100 et 40 poissons PCB 500 avec 1/3 de mâles et 2/3 de femelles dans chaque échantillon) sont tous utilisés pour faire des coupes fines de 20 microns.

La procédure de stockage est la suivante : chaque poisson est sexé, anesthésié (50µl/100 ml solution pendant 5 minutes), pesé et mesuré. La vessie natatoire est percée à l'aide d'une aiguille fine (si cette étape n'est pas faite, le poisson va flotter et les tissus ne seront pas bien conservés dans le formol). Pour les gros poissons (femelles de 1,5 g), une incision est réalisée au niveau de l'abdomen pour faciliter l'entrée du formol dans les différents tissus. Chaque poisson est stocké, marqué puis conservé à 4°C (voir Annexe 4.8 p.145).

Voici deux coupes entières d'un poisson contrôle : la première est une coupe médiane (Figure 54) et la deuxième est une coupe passant par la chambre antérieure de l'œil (Figure 55).

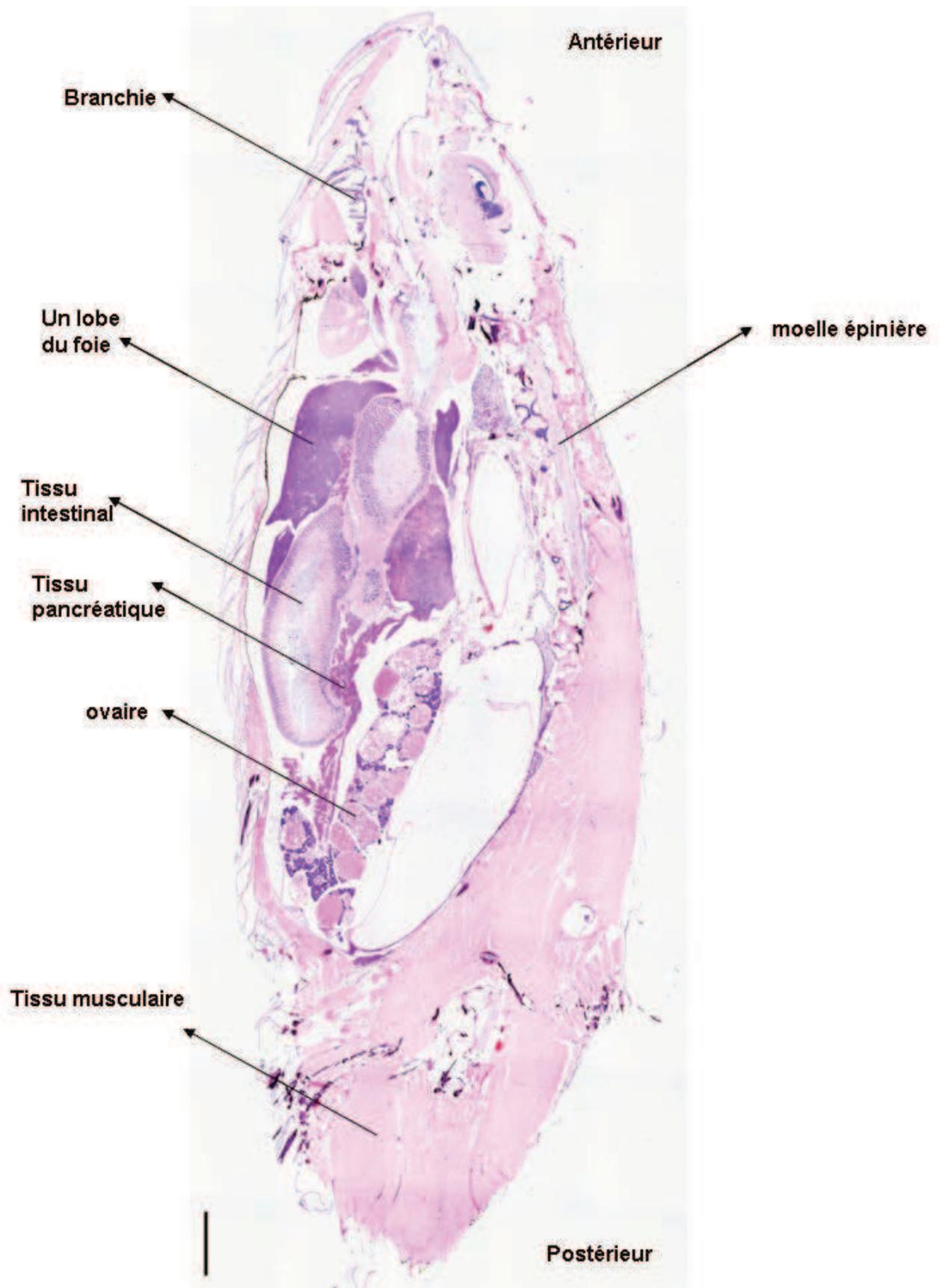


Figure 54 : Présentation d'une coupe entière d'un poisson zèbre (femelle)
Coupe médiane.

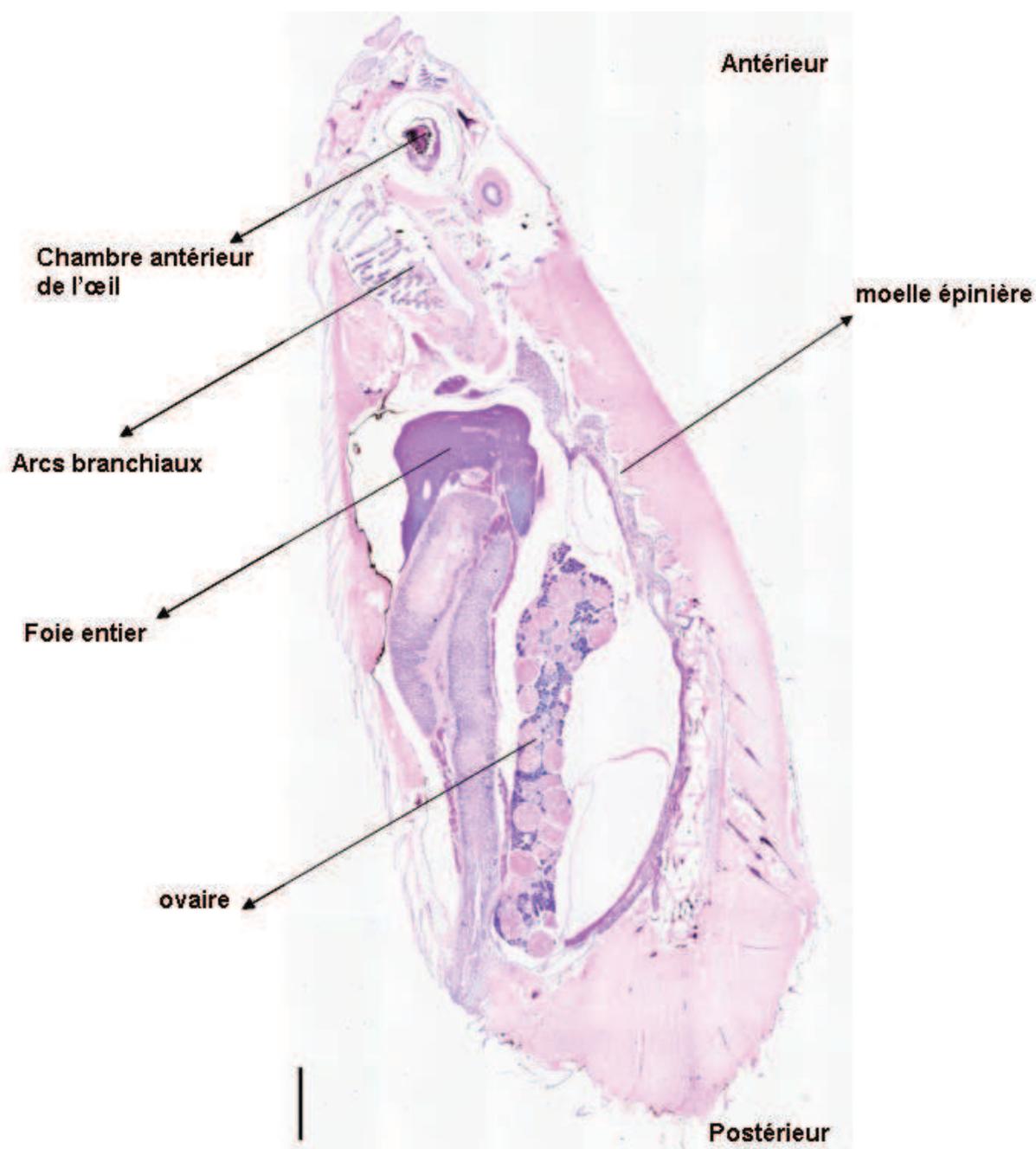


Figure 55 : Coupe entière de poisson zèbre
Coupe au niveau de la chambre antérieure de l'œil (correspond à 15 champs pris avec grossissement x4).

L'histologie permet de voir si les PCB ont un effet sur les différentes structures morphologiques. Le système reproductif est notamment atteint. La Figure 57 montre les gonades femelles et les différents stades des follicules ovariens.

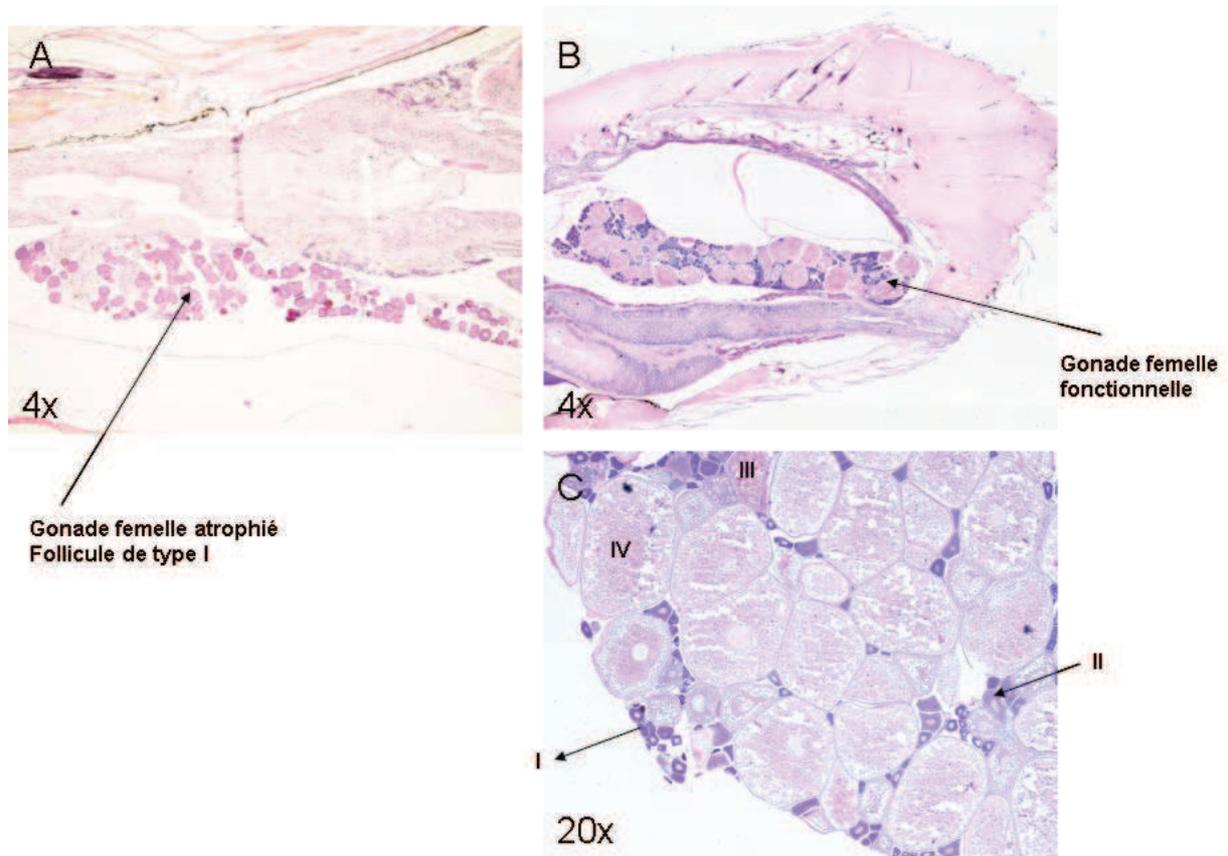


Figure 56 : Gonades femelles

A) gonades atrophiées ; B) gonades fonctionnelles ; C) follicules ovariens

Les gonades femelles atrophiées ne vont présenter que des follicules de type I (Figure 57-A), qui ne se développent pas ou qui dégèrent, tandis que des gonades fonctionnelles vont avoir différents types de follicules en cours de développement (Figure 57-B). Les différents types de follicules ovariens sont représentés sur la Figure 57-C. Les follicules de type I possèdent un grand noyau violet. Les follicules de type II ont un noyau plus petit et un cytoplasme plus développé contenant des vacuoles blanches. La présence de vtg est visible dans les follicules de type III, qui possèdent une membrane très épaisse. Enfin les follicules de type IV sont les plus volumineux et ont une membrane plus fine. Ils sont matures et prêt à libérer les ovocytes.

Les gonades mâles sont représentées dans la Figure 58, aucune différence n'a été observée entre les mâles témoins et les mâles contaminés.

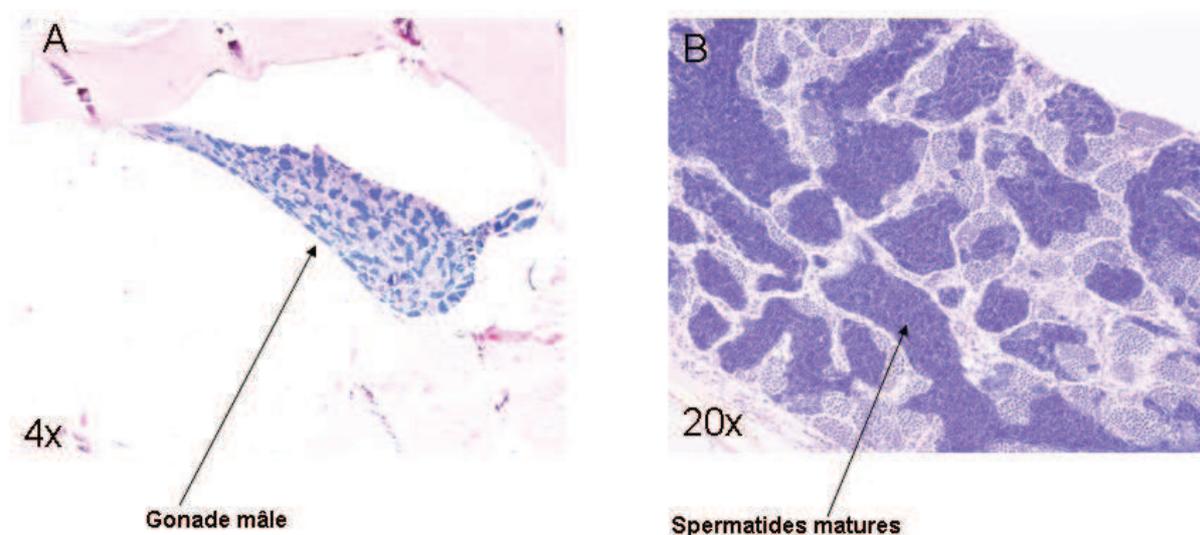


Figure 57 : Gonade mâle
Les spermatides E3 ayant une couleur foncée sont matures.

4 Protocoles

Les protocoles utilisés durant ma thèse sont présentés dans les sections suivantes, quelques modifications ont été réalisées à partir des protocoles initiaux. Ces modifications sont nécessaires pour obtenir une meilleure qualité de marquage sur notre modèle, le poisson zèbre. Certains protocoles, comme l'hybridation *in situ* et l'immunohistochimie sont réalisés avec un robot autonome : les solutions de base sont préparées puis les différentes étapes de lavages sont réalisées par le robot. La quantité d'échantillons stockés est importante et la nécessité d'analyser simultanément plusieurs échantillons avec les mêmes sondes nous oblige à utiliser le robot, qui permet d'avoir un marquage de qualité homogène et permet une comparaison entre des embryons issus de parents contaminés et d'autres issus de parents non contaminés ; ces manipulations sont souvent effectuées avec un minimum de 16 conditions, d'où la difficulté de les réaliser manuellement.

N.B. Bien que le robot soit capable de chauffer à une température de 65°C, certaines parties du protocole de l'HIS et de l'IHC ont été réalisées à l'extérieur du robot comme l'étape d'hybridation qui se fait à l'étuve à 65°C. Cela permet de réduire la quantité de sonde utilisée, dont la synthèse est coûteuse. En effet, dans le robot, la quantité de sonde nécessaire est doublée; l'étape de révélation (température ambiante) est aussi réalisée à l'extérieur du robot, afin d'éviter une trop grande consommation de NBT et BCIP de plus cette étape nécessite l'obscurité.

4.1 Protocole de l'hybridation *in situ*

1^{er} jour :

1. Lavage du robot par le programme 01 nettoyage
2. Les embryons sont stockés à – 20°C dans du méthanol à 100% (MeOH), réhydratés graduellement avec des mélanges (70%, 50%) de MeOH/PBT. Les mélanges sont faits par le robot, il suffit de mettre les solutions de base, MeOH 100 % et PBT, à leur source.
3. 2 lavages PBT de 5 minutes.
4. Une pause permet de réaliser l'étape avec la protéinase K (PK) (pour perméabiliser les membranes et permettre aux sondes de rentrer dans les tissus). Le temps appliqué dépend de l'âge des embryons (ex : pour un embryon de 24h, entre 6-7 min). Si le temps n'est pas respecté, cela peut endommager les tissus des embryons ; l'oubli de cette étape donne des résultats négatifs ou un faible signal lors de la révélation.
5. Un lavage rapide au PBT (pour éliminer la PK), suivi d'un lavage de 5 minutes.
6. 20 minutes de fixation avec du paraformaldéhyde (PFA) 4%.
7. 2 lavages successifs de 5 min avec du PBT. Les embryons sont sortis du robot.
8. Lavage du robot.
9. Les embryons sont transférés dans une plaque de 48 puits et mis dans l'HYB- 5 min à T° ambiante, sur le shaker.
10. Pré hybridation avec le tampon d'hybridation HYB+, une heure minimum à 65°C.
11. La sonde est ajoutée avec le tampon HYB+, les embryons laissés à l'étuve toute la nuit.

2^{ème} jour :

1. lavage du robot par le programme 01 nettoyage.
2. Utilisation du deuxième protocole du robot : préchauffage du robot environ 10 min à 65°C.
3. Les tampons de lavage sont préparés, préchauffés dans le bain marie à 65°C avant leur utilisation :
 - tampons 1 : 2 * 20 min ; 50% formamide, 2x SSC, 0.1% tween, H₂O.
 - tampons 2 : 1 * 20 min ; (2x SSC, 0.1% tween, H₂O).
 - tampons 3 : 2 * 20 min ; (0.2x SSC, 0.1% tween, H₂O).
4. 1 lavage de 5 min avec du PBT.

5. 4 heures dans du blocking (BSA 100mg/mL, sheep serum 100 µl, PBS 10X 1ml, Tween 50µl, H₂O qsp 10 mL) à température ambiante.
6. 12 heures avec l'anticorps anti-DIG (5µl dans 20 ml de blocking) à 4°C

3^{ème} jour :

1. 5 lavages de 25 min avec du PBT
2. 3 lavages de 5 min avec le tampon de coloration (tris pH 9.5 concentration finale =100mM, MgCl₂ concentration finale = 50mM, NaCl concentration finale =100mM, 0.1 % Tween).
3. La coloration se fait en ajoutant 4.5µL de NBT et 3.5µL du BCIP dans un 1 mL de tampon de coloration. On utilise 400 µL pour chaque puit, et on laisse à l'abri de la lumière le temps de coloration est fait (différent d'une sonde à l'autre).
4. L'arrêt de la réaction se fait par des lavages au PBT, puis, pour préserver et observer les embryons, ils sont transférés progressivement dans du glycérol 100%.

4.2 Protocole Immunohistochimie (IHC)

Le protocole d'immunomarquage avec un ou deux fluorochromes est fonctionnel, il a été adapté selon nos besoins de marquage.

4.2.1 Simple marquage

1^{er} jour :

1. Fixer les embryons au PFA 4%
Si déjà fixés, commencer à l'étape 2
2. Rincer le fixateur : 5 min avec du PBS (conservé à 4°C sinon refaire une nouvelle solution).
5 min dans de l'eau distillée (eau milliQ)
5 min PBS/Triton X 0,1%.
3. Perméabilisation des structures avec de l'acétone, à -20°C, pendant 7-15 min (utilisation de piluliers en verre).
4. Rinçage : 5min dans l'eau distillée
5min dans PBS (0,1M et pH 7,3).
5. Blocage des sites aspécifiques : un tampon de blocage à 2% de sérum de mouton ou d'agneau composé de PBS (10 mL)/BSA1% (0,1mg)/DMSO1 % (100 µL)/Triton X

0,1%. (Cette solution est appelée solution de base et sera utilisée pour tous les rinçages qui suivent).

1 h sous agitation.

6. Incubation avec le premier anticorps (MF20, S46, Znp1...) : anticorps primaire (Ac I^{aire}) de souris.

L'Ac I^{aire} est dilué à (voir tableau) dans du PBS/BSA/DMSO/Triton pendant la nuit à 4°C

JOUR 2:

7. Rinçage de l'Ac I^{aire} pendant 2 h avec du PBS/BSA/DMSO/TX, en changeant la solution, un lavage toutes les 20 min.
8. Incubation avec l'Ac II^{aire} : Ac Anti-Ac de souris couplé à un fluorochrome ; dilué au 1/100 dans du PBS/BSA/DMSO/TX (pendant la nuit à 4°C avec agitation ou 2 h à température ambiante ou à 37°C).

JOUR 3 :

9. Rinçage de l'Ac II^{aire} : comme l'étape 7.
10. 2 lavages au PBS. Garder dans du PBS si l'analyse se fait à la suite ; sinon mettre graduellement dans du glycérol 100 %.
11. La visualisation se fait dans du VectaShield sous le microscope.

4.3 PCR (Polymérase Chain Reaction)

1-Préparation du tube PCR (volume final=50µl) :

1. *Primer sens* (M13 Forward): **2 µL**
2. *Primer antisens* (M13 Reverse): **2 µL**
3. *Tampon 5X* : **10 µL** (concentration finale 1X)
4. *TAQ polymerase* (Go Taq de Promega): **0.4 µL** (conservé à -20°C)
5. déoxyribonucléotides triphosphates (*dNTP*): **1 µL**
6. *H₂O (stérile)* : **32.6 µL** (les volumes indiqués sont pour 1 échantillon)

En général, un mélange est fait pour le nombre d'échantillons présents puis réparti dans les tubes pour PCR.

7. *ADN*, dilué à 1/1000, ajouté en dernier: **2 µL**.

2-Principe de PCR :

1. Dénaturation du brin d'ADN à 95°C pendant 15 à 30 secondes,
2. Hybridation à 55°C pendant 15 à 30 secondes,
3. Elongation à 72°C, sa durée est fonction de la longueur du brin d'ADN : 1 min / kb,
4. Répétition des étapes 1, 2 et 3 (30 fois)
5. Elongation finale à 72°C pendant 10 à 15 minutes.

3-Migration sur gel d'agarose : (concentré à 1% et dissous dans du TAE 1X)

Pour vérifier le résultat de la PCR avant purification, et s'assurer qu'une seule bande est amplifiée. Rien ne doit apparaître au niveau du témoin.

4-Purification du produit de PCR sur colonne (NucleoSpin extract II) :

1. Pour les PCR avec moins de 50 µL, ajuster à 50 µL avec de l'eau miliQ stérile.
Ajouter 2 volumes de buffer NT pour 1 volume de produit de PCR.
2. Placer la colonne (NucleoSpin Extract II) dans un tube eppendorf 2 ml et y mettre l'échantillon.
3. Centrifuger 1 minute à 11.000 g et éliminer le culot.
4. Ajouter 600 µL de buffer NT3 et centrifuger 1 minute à 11.000 g, puis éliminer le culot.
5. Centrifuger 2 minutes à 11.000 g pour éliminer la totalité du buffer NT3. S'assurer que la colonne n'entre pas en contact avec le surnageant en la retirant de la centrifugeuse et du tube eppendorf.
6. Placer la colonne dans un tube à centrifuger stérile (1.5 mL), ajouter 30 µL de buffer d'élution NE et laisser 1 minute à température ambiante. Centrifuger 1 minute à 11.000 g.
7. Stocker à -20°C après vérification sur gel d'agarose.

4.4 Synthèse de sonde (transcription)

1. Préparation du mélange de transcription (respecter l'ordre suivant) :
 - *H₂O (stérile)* : **9 µL**
 - *dNTP-DIG-RNA 1X* : **2 µL**
 - *Buffer de transcription* : **2 µL**
 - *RNAse inhibitor* : **1 µL** (conservé à -20 °C)

- *ADN linéaire* : **5 µL**
 - *ARN polymerase (T7, T3 ou Sp6 selon le promoteur)* : **1 µL** (conservé à -20 °C).
2. Placer 2 heures minimum à 37°C au bain-marie.
 3. Digestion du double brin d'ADN en ajoutant 2 µL de DNase (RNase free). Mettre au bain-marie à 37°C pendant 15 minutes.
 4. Stopper la transcription en ajoutant 1 µL d'EDTA 0.5M pH 8 et 30 µL d'H₂O milliQ (stérile).
 5. Purification sur colonne (Probe Quant G-50 Micro columns)
 - Préparation de la colonne
 1. Remettre la résine en suspension en plaçant la colonne ProbeQuant sur le vortex,
 2. Dévisser d'un quart environ le couvercle et casser l'embout inférieur,
 3. Placer la colonne dans un tube eppendorf à centrifuger (1.5 mL),
 4. Pré-centrifuger à 3000 rpm pendant 1 minute.
 - Purification
 1. Placer la colonne dans un nouveau tube eppendorf (1.5 mL) et y introduire doucement la solution à purifier (50 µL), sans abîmer la résine.
 2. Centrifuger à 3000 rpm pendant 2 minutes. La solution purifiée est récupérée dans le tube eppendorf servant de support à la colonne (1.5 mL).
 6. Ajouter 50 µL de formamide désionisé (volume final de sonde : 100 µL) et stocker à -20°C. L'hybridation nécessite 1µl de sonde pour ~200 µl de HYB+ (selon la sonde).

4.5 Protocole comète sur embryons de poisson zèbre (d'après Farida Akcha modifié)

1. Préparation des lames (toutes ces étapes sont préparées à la veille) :
Agarose (2 types) dans du PBS 1X :
 - 50 mL avec 0.25g du low melting (LMT) agarose ;

- 50 ml avec 0.25g agarose normal ;

Remarque : ne jamais les laisser bouillir

2. Laisser dans le bain marie à 37°C dans des flacons de 50 mL.
 - Une lame par répliquat (toujours les annoter avec un crayon à papier).
 - Plonger la lame en entier dans l'agarose normal puis laisser sécher quelques heures puis mettre sur glace (avec une plaque en métal).
3. Préparation de la collégénase sous hotte extemporanément attention, elle est toxique 1.11g/L + 10 % SVF (sérum de veau) dans du PBS 1X et bien vortexer.
4. Déchoriation des embryons de 24 hpf à la pince à dissection (3 par échantillon par lame)
5. Récupération des embryons déchorionnés dans un tube eppendorf de 1.5 mL.
6. PBS qsp 1 mL.
7. Centrifugation 5 min à 1500g à température ambiante (2000 rpm).
8. Reprise du culot avec 600 µL de la solution de collagénase (pure ou diluée au 1/2 dans du tampon PBS).
15 min pour les embryons de 24h, dans la solution diluée au ½ ; les autres stades sans dilution, 30 min à 37°C, à l'abri de lumière directe et avec une agitation toutes les 2 min.
9. Filtration à 48 µm (les filtres sont utilisés plusieurs fois) dans un tube eppendorf.
10. Centrifugation 10 min à 2300 rpm à température ambiante.
11. Remise en suspension du culot dans 30 µL de PBS ou utilisation directe de 85 µL de LMT agarose puis mettre une lamelle directement pour éviter de faire des bulles.
Mettre sur glace puis retirer la lamelle puis remettre une autre couche de LMT agarose 85µL et mettre sur glace pour la polymérisation.
12. Utilisation de cet échantillon pour le test des comètes : procédure classique (dénaturation 15', électrophorèse 25') :
13. Mettre les lames dans le tampon de lyse 1h à 16°, à l'abri de la lumière dans les cuves en verre.
14. 15 min tampon d'électrophorèse/dénaturation dans la cuve (volume du tampon est de 900 mL).
15. Mettre le courant sur 13v pendant 25 min bien positionner les lames (noir à gauche et rouge à droite).
16. 7 x 2 min dans du tampon de neutralisation (changement du tampon).
17. Fixation avec l'éthanol absolu 10 min.
18. Stockage sur un portoir de lames.

19. Lire les lames sur microscope après avoir ajouté du BET (toxique et cancérigène)

4.6 Protocole EROD (Nouri *et al.* 2006, d'après le protocole du Cemagref laboratoire d'Ecotoxicologie, modifié).

Principe, matériel et méthode :

Ce protocole permet la mesure *in vivo*, par détection fluorimétrique de l'activité de biotransformation de l'éthoxyrésorufine par les embryons/larves de poisson zèbre.

Cette activité est appelée EROD (Ethoxy-Resorufine-O-Dééthylase) et mesurée suite à une exposition d'un organisme (ici, les embryons de poissons zèbres) à un polluant susceptible d'induire cette activité (PCB, HAP, Dioxines).

Cette méthode permet également de détecter des inhibitions sur une activité EROD basale ou co-induite par une substance de référence comme le B[a]P ou la BNF.

Cette méthode est une mesure indirecte, *in vivo* et non destructrice de l'activité CYP450 1A. Les embryons, à l'issue d'une exposition préalable aux sédiments enrobés en HAP, sont mis en présence d'un substrat, la 7-éthoxyrésorufine. Ce substrat est assimilé par les embryons puis transformé en résorufine, qui est excrétée dans le milieu et quantifiée en continu par fluorimétrie.

- 1- Expositions sur sédiment avec un seul HAP (B[a]P, DMBA, Pyr et Fl).
- 2- 10 embryons par condition/concentration sont mis sur une microplaque, toujours à 28°C pour un bon développement.
- 3- Dilution du substrat 7-éthoxyrésorufine (la solution mère est à 1.5 mM, il faut la diluer à raison de 4 µL par mL).
- 4- Ajout du substrat dilué : 0.5 mL pour 1.5 mL de E3 (Volume finale = 2 mL).
- 5- La première lecture se fait au temps zéro, après l'ajout du substrat puis chaque heure pendant 5-6 h. Les échantillons sont toujours conservés à 26°C.
- 6- La mesure est faite en double, d'abord excitation 545 nm - émission 587 nm puis excitation 545 nm-émission 565 nm (c'est le bruit de fond que l'on retire). Bien agiter pour éviter les erreurs de mesure.
- 7- Fin de l'expérience, le nombre d'embryons vivant par puit est marqué.

Calcul de l'activité EROD :

- 8- Les graphes obtenus correspondent à la fluorescence_{résorufine} = fluo_{587nm} - fluo_{565nm}
- 9- Etablir une régression linéaire $\text{Fluo}_{\text{reso}} = \text{EROD}_{(\text{UF/h})} * \text{temps}$

10- Conversion de l'Unité Fluorescence/h en fmol/h/larve à l'aide de la pente résorufine (de la gamme étalon):

$$\text{EROD}_{(\text{fmol/h/larves})} = (\text{EROD}_{(\text{UF/h})} / \text{pente}_{\text{reso}}) * (\text{volume puit/nombre de larve vivante})$$

11- Répéter la même opération pour les 3 réplicats puis calculer la moyenne, les écartypes et faire les statistiques.

4.7 Protocole de contamination des sédiments par des composés hydrophobes, exposition sédiment-contact sur médaka et poisson zèbre

- 1- Echantillonnage du sédiment.
- 2- Congélation du sédiment.
- 3- Lyophilisation du sédiment.
- 4- Broyage du sédiment.
- 5- Préparation des solutions de contaminations : pour une contamination 1X à 1 µg/g de sédiment, préparer une solution 100X à 5 mg/mL d'isooctane, puis faire les dilutions en cascade pour avoir 25, 5, 1 et 0,5X.
- 6- Installer l'évaporateur rotatif (bain à 45°C) et le bain réfrigérant, attendre une quinzaine de minutes que le bain se mette à la température souhaitée.
- 7- Les contaminations se font de la concentration minimale à la concentration maximale.
- 8- Placer la masse de sable souhaitée dans le ballon 250 mL.
- 9- Ajouter 2 mL de dichlorométhane (CH₂Cl₂) par gramme de sédiment.
- 10- Ajouter goutte à goutte, de manière aussi homogène que possible, 20 µL d'isooctane de la concentration désirée par gramme de sédiment.
- 11- Placer le ballon sur l'évaporateur rotatif et le lancer à sa vitesse normale.
- 12- Attendre que tout le CH₂Cl₂ se soit évaporé (~ 45 minutes).
- 13- Mettre le sédiment dans une coupelle en aluminium, recouvrir de papier aluminium percé avec une pointe de pipette.
- 14- Recommencer depuis l'étape 8 jusqu'à la concentration maximale pour y arrivé a la concentration la plus élevée.
- 15- Mettre 150 mL de CH₂Cl₂ seul pour rincer ; il est possible d'augmenter la température à 60-70°C.
- 16- Les sédiments sont laissés sous hotte toute la nuit pour que toute trace de CH₂Cl₂ soit éliminée

- 17- Peser les sédiments en autant d'aliquotes que désirées, garder à +4°C ou à -20°C au suivant le composé et sa tolérance thermique à température ambiante.

4.8 Protocole d'histologie pour le poisson zèbre (Thibault Larcher et Mireille Ledevin, ONIRIS Nantes, protocole adapté)

- 1- Les poissons sont euthanasiés avec de la benzocaïne, et leur vessie natatoire est percée, puis ils sont directement stockés dans du formol 4 % Panreac et conservés à 4°C.
- 2- Déshydratation progressive par des solutions croissantes éthanol, jusqu'à arriver à l'alcool absolu.
- 3- Une étape d'éclaircissement avec du méthylcyclohexane (MCH) est nécessaire car la paraffine n'est pas miscible avec l'éthanol.
- 4- Imprégnation en paraffine liquide, puis solidification optimale à -5°C (ces étapes sont faites par un automate d'inclusion Tissu Tek VIP 3000).
- 5- Inclure les pièces imprégnées de paraffine dans un bloc de paraffine pour permettre de faire des coupes au microtome (cette étape est réalisée à l'aide d'un automate Tissu Tek 5).
- 6- Adéquation du nombre de blocs avec la demande technique. Une étape de décalcification des blocs est faite pendant 1 min, ce qui permet de faire 3 coupes de 15 µm sans abimer les organes et les tissus par la moelle osseuse et les arêtes. Cette étape est faite spécialement pour les poissons zèbres pour une meilleure qualité de coupe.
- 7- Coupes avec un microtome rotatif à mouvement vertical.
- 8- Etalement des coupes sur lames.
- 9- Vérification des numéros histo et de la correspondance des images de la coupe et du bloc.
- 10- Séchage des coupes sur lames maximum 12 h à l'étuve à 37°C
- 11- Déparaffinage et réhydratation (MCH-solutions d'alcool 100 %, 80 %, eau courante).
- 12- Coloration des noyaux pendant 2 min avec l'hématoxyline de Gill II, lavage à l'eau puis au HCl (quelques secondes) et enfin un autre lavage à l'eau (couleur rose).
- 13- Coloration des noyaux dans le carbonate de lithium (couleur bleu), lavage à l'eau.
- 14- Coloration des cytoplasmes dans de l'Eosine-Erythrosine (2 min), lavage à l'eau.
- 15- Déshydratation, puis coloration dans du safran alcoolique. Rinçage à l'alcool, et montage en milieu anhydre.

16- Contrôle de la qualité des lames.

17- Lecture de la lame par pathologiste.

4.9 Schéma des étapes statistiques

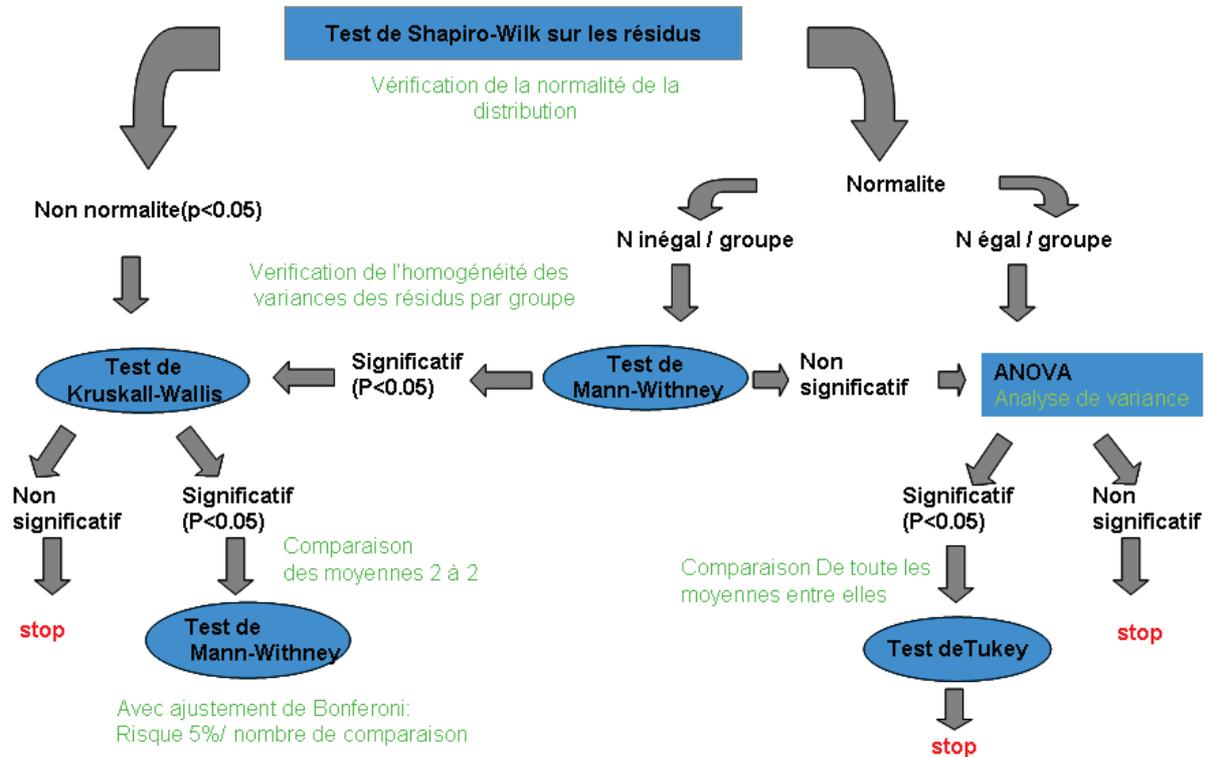


Figure 58 : Schéma montrant la stratégie statistique adoptée

5 Solutions

1. Tampon PBS (phosphate buffer salin)

- 1 L à 10X (température ambiante) :
- Dissoudre dans 800 mL d'H₂O milliQ
- KCl = 2 g
- NaCl = 80 g
- Na₂HPO₄·2H₂O = 17.8 g
- KH₂PO₄ = 2.4 g
- H₂O qsp 1 L puis autoclaver.

2. Tampon 20X SSC (NaCl 3 M ; Na₃citrateX₂H₂O 300 mM):

- Dissoudre dans 800 mL de H₂O milliQ
- NaCl = 175.3 g
- Na₃citrateX₂H₂O = 88.2 g
- Ajuster le pH à 7.0 avec HCl 14N
- H₂O qsp à 1L puis autoclaver.

3. Tampon d'hybridation (HIS) :

- HYB- : 50% formamide (désionisé), 5X SSC, 0.1% tween.
- HYB+ : 50% formamide, 5X SSC, 0.1% tween, héparine 50 µg/mL (à -20°C), ribonucleic acid from yeast t_{RNA} 0.5mg/mL (à -20°C). Les deux tampons sont stockés à -20°C.

4. Tampon de base pour l'IHC :

- Préparation de 10 ml PBS pour les rinçages.
- BSA (bovine sérum albumine) poudre stocké à 4°C ; solution mère à 100mg/mL à 4°C : 100 µL pour 10 mL de PBS 1X.
- DMSO (diméthylsulfoxyde) 100 µL pour 10 mL de PBS 1X
- Triton X-100 0.1% (10 µL) pour 10 mL de PBS 1X

5. Tampon de blocage : le tampon de base + 2% de LS

- Tampon de base cité ci-dessus +2% de LS

6. **Tampon E 3 :**

Concentrations finales :

- NaCl = 5 mM
- KCl = 0.17 mM
- Ca Cl₂ = 0.33 mM
- MgSO₄ = 0.33 mM

Pour 1 L de ce tampon à une concentration 60X (à 4°C) :

- NaCl = 17.2 g
- KCl = 0.76 g
- Ca Cl₂ = 2.9 g
- MgSO₄ = 4.9 g
- Dans 1 L puis autoclave.

Pour 1 L à 1X :

- 16.7 ml du 60X
- H₂O qsp 1 L milliQ + ajouté du bleu de méthylène pour les embryons qui ne sont pas utilisés pour expériences de contamination.
- Mettre à l'étuve, à 28°C.

7. **3 ou 4 % Méthyle cellulose :**

- 3 g de méthyl cellulose dans 100 ml de E3
- Chauffer sous agitation avec un barreau aimanté, à 28°C jusqu'à disparition de la poudre.
- Le faire chauffer à l'étuve avant utilisations.
- Elimination par dilution avec le E3

8. **4% Paraformaldehyde (PFA) :**

- 450 mL de H₂O dans un bécher chauffé à 60°C, sous agitation
- Ajouter 20 g de PFA sous la hotte aspirante, dans le bécher couvert avec un papier aluminium tout en maintenant à 60°C.

- Ajouter 5 gouttes de 2N NaOH (une goutte pour 100 mL), la solution devient transparente. Ne jamais chauffer à plus de 70°C, cela peut casser la molécule.
- Ajouter 50 mL de PBS 10 X. Le volume final est de 500 mL
- Stocké à -20 °C, en aliquotes de 10-20 mL.

9. **Benzocaïne :**

- Poudre et solution stockées à 4°C.
- Solution de stock préparée à 100 g/L
- La poudre étant insoluble dans l'eau, à dissoudre 5 g de benzocaïne dans 50 mL d'éthanol ou d'acétone.
- Concentration finale d'utilisation est 50mg/L : pour une anesthésie, utiliser 50 µl/100 mL pour une euthanasie, utiliser 1 mL /100 mL.

10. **Préparation des solutions pour le test des comètes :**

Agarose normal 0.5 %

- A préparer dans du PBS 1X (Mg²⁺ et Ca²⁺ free).
- Environ 1 mL/lame.
- Porter la solution à ébullition au micro-ondes et vortexer. Répéter l'opération jusqu'à dissolution complète de l'agarose.
- Conserver l'agarose dans un tube Corning de 50 ml au bain marie à 37°C

Agarose LMP 0.5 %

- A préparer dans du PBS 1X (Mg²⁺ et Ca²⁺ free).
- Chauffer la solution sans porter à ébullition.
- Aliquoter à raison de 225 µL dans des tubes eppendorfs stériles 1.5 mL
- Maintenir au bain-marie à 37°C

Tampon de lyse (NaCl 2.5 M, EDTANa₂ 0.1 M, Tris base 0.01 M, N-sarcosinate 1%,

DMSO 10 %, Triton X100 1 %, pH 10)

Ces solutions sont faites en 5 * 200 mL.

Pour 200 mL :

NaCl : 100 mL d'une solution mère à 5M

EDTANa₂ : 40 mL d'une solution mère à 0.5 M pH 8

N-sarcosinate : 2 g

H₂O qsp 178 mL

Ajuster le pH à 10.

Autoclaver.

+ 20 mL DMSO

+ 2 mL Triton X100

A préparer au dernier moment et à conserver à 4°C.

(DMSO/EDTA : antioxydants)

Tampon de déroulement et d'électrophorèse (NaOH 0.3 M, pH 13)

Pour 2 L :

NaOH : 60 mL d'une solution à 10M

EDTANa₂ : 4 ml d'une solution à 0.5 M, pH 8

H₂O qsp 2 L

Ajuster le pH à 13 : bien vérifier le pH avant utilisation.

A conserver à température ambiante.

Tampon de neutralisation (Tris base 0.4 M, 7.5)

Pour 500 mL

200 mL de Tris 1M pH 7.5

H₂O qsp 500 mL

Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (Danio rerio) par des PCB et des HAP

Résumé :

Les milieux aquatiques constituent des réservoirs ultimes pour de nombreux polluants organiques persistants, notamment les polychlorobiphényles (PCB, composés bioaccumulables) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP, composés accumulés dans le sédiment et métabolisés par les vertébrés). Les poissons peuvent être exposés à ces polluants à plusieurs stades de vie, ce qui peut altérer leur intégrité fonctionnelle. Les objectifs de cette thèse étaient d'évaluer les altérations physiologiques entraînées par des expositions représentatives de situations environnementales. Ainsi, d'une part, des juvéniles et adultes de poissons zèbres ont été exposés par voie trophique à des mélanges de PCB représentatifs des estuaires européens. Les résultats montrent que la bioaccumulation varie en fonction des congénères de même que le transfert vers les œufs, et pour ce dernier, le niveau de substitution par des chlores est déterminant. Une altération de la reproduction caractérisée par une réduction du taux de fécondation et l'apparition d'une atrésie folliculaire massive ont été montrées. Ces travaux pourraient être complétés 1) au niveau moléculaire pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents et notamment l'activité perturbateur endocrinien et 2) par l'évaluation des effets au niveau des populations par une approche de modélisation. D'autre part, des embryons ont été exposés pendant 96h à des sédiments enrobés par des HAP individuels. Les phénotypes obtenus sont conformes aux effets décrits pour ces HAP et ont permis de valider la procédure d'exposition. Cette procédure pourrait être utilisée pour évaluer la toxicité de sédiments naturels après extraction de la fraction aromatique, ainsi que pour évaluer la toxicité de molécules hydrophobes. Pour être fiable dans le cadre de tests, il reste indispensable d'identifier des marqueurs précoces d'effets tardifs pour éviter de sous-estimer la toxicité d'un composé.

Mots clés : PCB, HAP, voie trophique, exposition chronique, reproduction, test-embryon, sédiment-contact

Effects of zebrafish (Danio rerio) embryos and adults contaminations with PCB and PAH.

Abstract:

Aquatic environments are ultimate reservoir for many persistent organic pollutants, including polychlorinated biphenyls (PCBs, bioaccumulative compounds) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs, compounds accumulated in the sediment and metabolized by vertebrates). Fish can be exposed to these pollutants at different life stages which can alter their functional integrity. The objectives of this PhD were to assess physiological alterations following exposure to mixtures representative of environmental situations. Thus, on the one hand, juvenile and adult zebrafish were exposed through the trophic pathway to PCB mixture representative of European Estuaries. The results showed that bioaccumulation varied with the congeners as well as transfer to eggs and for the latter, the level of chlorination is decisive. Impaired reproduction characterized by a reduction in the rate of fertilization and the appearance of a massive follicular atresia were shown. This work could be completed 1) at the molecular level to better understand the underlying mechanisms including endocrine disruptive activity and 2) by the evaluation of effects at the population level by a modelling approach. On the other hand, embryos were exposed for 96 h to sediment spiked with individual PAHs. The obtained phenotypes were consistent with the effects described for these PAHs and thus validated the exposure process. This procedure could be used to assess the toxicity of natural sediment after extraction of the aromatic fraction as well as to assess the toxicity of hydrophobic molecules. To be reliable tests, it remains essential to identify early markers of late effects to avoid underestimating the toxicity of a compound.

Keywords: PCB, PAH, food exposure, chronic exposure, reproduction, embryo-test, sediment-contact

