



HAL
open science

Effets des polluants organiques persistants sur le comportement des poissons

Samuel Péan

► **To cite this version:**

Samuel Péan. Effets des polluants organiques persistants sur le comportement des poissons. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2012. Français. NNT : 2012LAROS359 . tel-00818410

HAL Id: tel-00818410

<https://theses.hal.science/tel-00818410>

Submitted on 26 Apr 2013

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 des polluants organiques persistants sur le comportement des poissons

ÉCOLE DOCTORALE *Gay LUSSAC*

LABORATOIRE IFREMER – *Ressources Halieutiques de La Rochelle*

THÈSE présentée par :

Samuel PÉAN

Soutenue le : **13 mars 2012**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de La Rochelle**

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

JURY :

Agnès BARDONNET
Magalie BAUDRIMONT
Marie-Laure BÉGOUT
Xavier COUSIN
Véronique LOIZEAU
Pierre MIRAMAND

Directrice de recherche, INRA, Rapporteur
Professeur, Université Bordeaux I, Rapporteur
Cadre de recherche, IFREMER, Directrice de thèse
Chargé de recherche, INRA, Responsable scientifique
Cadre de recherche, IFREMER
Professeur, Université de La Rochelle

Illustrations couverture & inter-chapitres :

Bastien PÉAN

www.bastienpean.com

Effets des polluants organiques persistants sur le comportement des poissons

ÉCOLE DOCTORALE Gay LUSSAC

LABORATOIRE IFREMER – Ressources Halieutiques de La Rochelle

THÈSE présentée par :

Samuel PÉAN

soutenance prévue le : **13 mars 2012**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de La Rochelle**

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

JURY :

Agnès BARDONNET
Magalie BAUDRIMONT
Marie-Laure BÉGOUT
Xavier COUSIN
Véronique LOIZEAU
Pierre MIRAMAND

Directrice de recherche, INRA, Rapporteur
Professeur, Université Bordeaux I, Rapporteur
Cadre de recherche, IFREMER, Directrice de thèse
Chargé de recherche, INRA, Responsable scientifique
Cadre de recherche, IFREMER
Professeur, Université de La Rochelle

石の上にも三年

Avant-propos

Cette thèse a été co-financée par l'Ifremer et la région Poitou-Charente (2008-2011). Elle s'intègre dans deux projets nationaux qui ont assuré son soutien financier :

ANR VMC SoleBEMOL

Le programme SoleBEMOL (Sole Bioaccumulation Écotoxicologie ModeLisation) a pour principal objectif d'étudier chez des juvéniles de sole le devenir et les effets biologiques des contaminants chimiques de l'individu à la population.

Le premier objectif est d'étudier la bioaccumulation et la biotransformation de trois familles de contaminants organiques (PCB, HAP et PBDE) chez la sole provenant de trois zones de nurricerie (Seine, Vilaine, et Pertuis). Les niveaux et profils de contamination seront comparés à ceux du sédiment et confrontés aux indices biologiques de la sole. Les effets spécifiques d'une substance sont très difficiles à dissocier dans le milieu naturel. La description et la compréhension des processus responsables du devenir des contaminants nécessitent que la phase d'acquisition des données *in situ* soit complétée par une approche expérimentale en milieu contrôlé.

Le deuxième objectif est donc de mettre en oeuvre une stratégie expérimentale afin d'étudier les mécanismes d'accumulation, de biotransformation et de toxicité de ces contaminants. Les effets de l'exposition seront appréhendés en terme de génotoxicité et au niveau physiologique. Le dernier objectif est de proposer un modèle sur le devenir des contaminants dans les soles qui prenne en compte leurs effets. Un modèle de type DEB sera développé en intégrant un volet contaminant (DEB-Tox).

Enfin, ce travail se fixe également pour objectif de quantifier la dépendance des populations de poissons qui exploitent des nurriceries côtières et estuariennes à ces habitats et à leur qualité, c'est-à-dire d'analyser le lien entre ces milieux essentiels à leur cycle de vie, les perturbations subies par les juvéniles sur ces habitats et les capacités de renouvellement des populations.

C'est dans le cadre du deuxième objectif qu'interviennent mes travaux de thèse.

EC2O Citrix CNRS INSU Génération POP

Le programme Génération POP consiste quant à lui à exposer dans un premier temps des embryons de poissons zèbre à des HAP par sédiment contact afin de caractériser les effets immédiats (embryotoxicité et développement précoces). Dans un second temps, des poissons zèbre adultes seront contaminés par voie alimentaire à des PCB afin d'identifier d'éventuels effets sur la physiologie, la croissance, la reproduction, la génotoxicité, la tumorigénèse mais aussi le comportement. Le programme Génération POP prévoit aussi d'identifier les effets transgénérationnels.

Mes travaux de thèse portent à la fois sur l'étude des poissons contaminés par voie orale et la mesure d'éventuels effets transgénérationnels.

Remerciements

Comme tout travail de recherche, ces trois années de thèse n'auraient pas été possibles sans la contribution de certaines personnes, que je tenais à remercier.

Mes premiers remerciements vont à Marie-Laure Bégout et Xavier Cousin, qui m'ont encadré pendant mon stage de M2 et ces trois ans de thèse. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné les moyens d'aborder cette problématique de thèse selon ma propre personnalité. Merci de m'avoir permis de rencontrer différents chercheurs au gré de différents congrès. Merci enfin pour m'avoir laissé jeter un œil sur d'autres problématiques, cela m'a permis d'en apprendre d'autant plus sur mon propre sujet et pourra m'être bien utile pour la suite...

Je tiens aussi à remercier les membres du jury pour avoir accepté d'évaluer mon travail : Agnès Bardonnnet, Magalie Baudrimont, les rapporteurs de cette thèse, Véronique Loizeau et Pierre Miramand, ainsi que les membres de mes deux comités de thèse : Alain Ghysen, Paco Bustamante, Christel Lefrançois, Patrick Prunet et Violaine Colson, qui m'ont tous ensemble permis de progresser.

Au sein du laboratoire Ifremer de L'Houmeau, je tiens à remercier Philippe-Jacques Hatt et Jean Prou, chefs de Station successifs, ainsi que Gérard Biais, Responsable de l'Unité Halieutique Gascogne Sud et du Laboratoire Ressources Halieutiques, pour m'avoir accueilli.

Je remercie aussi Didier Leguay, Michel Prineau, Laura Lyphout et Lilian Ducci, nos super techniciens de choc qui ont assuré le maintien des structures d'élevage et/ou la réalisation des bacs/salles d'expérimentation.

Un grand merci à Marie-Élise Schwartz et Tarek Daouk, les « colocs » de labo sans qui ces trois ans de thèse n'auraient pas eu la même saveur (en tout cas pas celle du poulet-patates au chocolat !).

Un grand merci à David Benhaïm, pour avoir grandement enrichi ma culture scientifique et pour les grandes sessions débats sur les variables Ethovision. Merci aussi pour tous tes conseils et ton soutien !

Mille mercis à Christel Lefrançois, pour m'avoir donné goût à la recherche (et à la Méditerranée !) lors de mon stage de M1. Merci pour m'avoir conseillé pendant ces trois années de thèse, au-delà des comités de thèse.

Merci à Marcella Cannas, pour ces moments « sole » inoubliables !

Merci à Véronique Loizeau et Anne-Marie Le Guellec du Laboratoire Ifremer de Brest, pour nous avoir fourni en granulés contaminés en toute circonstance, et pour avoir assuré l'analyse chimique de nos petits poissons.

Merci à mes stagiaires, qui ont réussi à supporter le rythme, qui ont mis les mains dans le poisson et qui se sont abimés les yeux tout autant que moi sur les vidéos : Anne-Lise Mayeras, Mathieu Besson et Pierre Poitevin.

Pour l'ambiance générale et l'aide ponctuelle, merci aux "nouvelles recrues" : Claire Rocancourt (surtout pour tes envois de liens), Julie Lucas, Prescilla Perrichon et Sébastien Ferrari. Merci aussi à Pauline Cajeri, Cécile Curti, Fabien Aubert (Sarthe libre !).

Merci à tous les anonymes qui postent des conseils sur leurs blogs ou les forum, que ce soit pour le logiciel ImageJ (qui m'a permis de me mettre VRAIMENT à l'analyse d'image) ou le logiciel L^AT_EX (qui m'a permis de rédiger ce manuscrit sans souci !). Merci aussi aux internautes qui ont pris la peine de me contacter depuis mon site internet et avec qui j'ai pu échanger des techniques et des conseils !

Merci à mes parents, mon frère (fais chauffer le pad, j'arrive !), ainsi que tout le reste de ma famille, pour leur soutien à toute épreuve et pour avoir accepté mes (trop) nombreuses absences. Merci d'avoir soutenu mes choix et d'avoir supporté mon stress pendant ces dernières années.

Table des matières

Introduction générale	1
1 L'éthologie : la science du comportement	3
1.1 Qu'est-ce que le comportement ?	3
1.2 La naissance de l'éthologie	5
1.3 L'étude du comportement par l'analyse vidéo	9
2 Comprendre la pollution	12
2.4 Qu'est-ce que la pollution ?	12
2.5 Les disciplines de la toxicologie	13
2.5.1 La toxicologie	13
2.5.2 Minamata : un exemple concret des limites de la connaissance	14
2.5.3 De la toxicologie à l'écotoxicologie : un changement progressif	16
3 Les PCB	19
3.6 Description et historique de production	19
3.7 Règlementations relatives aux PCB	20
3.8 Les PCB dans l'environnement	22
3.8.1 Généralités sur la biodisponibilité, la bioaccumulation et la bioamplification	22
3.8.2 Le suivi des PCB dans l'environnement	23
3.9 Influence des PCB sur la physiologie et le comportement des poissons	27
3.9.1 Généralités	27
3.9.2 Effets des PCB	29
4 Présentation de la thèse	32
4.10 Description et intérêt éthologique des espèces étudiées	32
4.10.1 La sole commune <i>Solea solea</i>	32
4.10.2 Le poisson zèbre <i>Danio rerio</i>	36
4.11 Objectifs de la thèse et présentation du manuscrit	40

Partie I Présentation de la méthodologie et des outils mis en place 43

Chapitre 1 Le <i>video tracking</i>	45
1.1 Les outils existants	47
1.2 Présentation de la solution retenue : Ethovision XT® (Noldus, The Netherlands)	50
1.2.1 Les options de base	50
1.2.2 L'utilisation des zones	51
1.2.3 Le choix de la méthode de détection	51
1.3 Le calcul des variables	53
1.4 Les avantages et limitations du <i>video tracking</i> et leurs prises en compte dans les méthodes d'analyse retenues	54
1.4.1 Avantages et limitations du <i>video tracking</i> automatique	54
1.4.2 Les méthodes choisies	61
1.5 Mise en place du matériel	62
1.6 Mise en place du protocole de challenge lumineux pour les larves de poisson zèbre	65
1.6.1 Bref état de l'art	65
1.6.2 Matériel mis en place	65
1.6.3 Mise en place du protocole	68
1.6.4 Conclusion et description du protocole retenu	69
Chapitre 2 Présentation du logiciel ODRec (<i>Observational Data Recorder</i>) et du <i>plugin Heatmap From Stack</i> pour le logiciel ImageJ	73
2.1 ODRec : logiciel gratuit et <i>open source</i> de codage de séquences comportementales	75
2.1.1 Description du programme ODRec	76
2.1.2 Utilisation du logiciel ODRec	77
2.1.3 Illustration des données obtenues	79
2.2 <i>HeatMap From Stack</i> : <i>plugin</i> pour le logiciel ImageJ servant à l'analyse de la répartition spatiale en groupe	80
2.2.1 Principe de fonctionnement	81
2.2.2 Pré-requis	81
2.2.3 Lancement du <i>plugin</i>	82
2.2.4 Résultats obtenus	83
Chapitre 3 Electronic individual identification of zebrafish using RFID tags	85
3.1 Introduction	89
3.2 Methods	91
3.2.1 Fish and tag insertion	91
3.2.2 Feeding regime and Growth monitoring	92
3.2.3 Spawning	93
3.2.4 Behavior	93
3.2.5 Statistical tests	94
3.3 Results	94
3.3.1 Evaluation of tagging procedure success	94
3.3.2 Growth rate	96
3.3.3 Spawning characteristics	97
3.3.4 Swimming behavior	99
3.4 Discussion	99

Partie II Effets des PCB sur le comportement des poissons 103

Chapitre 4 Effets des PCB sur le comportement de la sole commune, <i>Solea solea</i>	105
4.1 Introduction	109
4.2 Matériel et méthodes	111
4.2.1 Matériel biologique et contamination	111
4.2.2 Acquisition des données	113
4.3 Résultats	117
4.3.1 Phase de contamination	117
4.3.2 Phase de décontamination	126
4.4 Discussion	129
4.5 Conclusions	133
Chapitre 5 Long-term food-exposure to PCB mixtures induces behavioural disruptions in zebra-fish	135
5.1 Introduction	139
5.2 Materials and methods	141
5.2.1 Rearing conditions and PCB exposure	141
5.2.2 Behavioural experiments	142
5.2.3 Data recording and analysis	144
5.2.4 Measured variables and statistical analysis	144
5.3 Results	145
5.3.1 Background colour preference	145
5.3.2 T-maze exploration	145
5.3.3 24-h swimming activity	147
5.4 Discussion	148
5.5 Conclusion	152
Chapitre 6 Zebrafish as a model of hyperactivity transmission to offspring after parental PCB exposure	155
6.1 Introduction	159
6.1.1 Rearing conditions and PCB exposure	161
6.1.2 Behavioural experiments	162
6.1.3 Data recording and analysis	163
6.1.4 Measured variables and statistical analysis	164
6.2 Results	165
6.2.1 Sudden dark challenge in larvae	165
6.2.2 24-h swimming activity – horizontal movements	166
6.2.3 24-h swimming activity – vertical movements	168
6.3 Discussion	172
6.4 Conclusions	174

Discussion générale	177
Références bibliographiques	189
Annexes	213
Annexe A Figure originale Slobodkin et Rapoport (1974)	215
Annexe B Poster International Flatfish Symposium 2011	216
Annexe C Fiche technique Nonatec	217
Annexe D Système de couleur Munsell	218
Annexe E Détail des dosages chimiques de PCB dans les muscles de soles après 30 et 60 jours de contamination	219
Annexe F Publications et actes de congrès	220

Liste des figures

1	Les différentes relations comportementales qui peuvent lier un individu aux individus de son espèce, d'autres espèces ou à son environnement	5
2	Représentation schématique des quatre questions de Tinbergen et des relations entre elles .	8
3	Représentation des mouvements ondulatoires des nageoires de la raie obtenue par chronophotographie	9
4	Chronologie (non-exhaustive) des publications sur les avancées de l'analyse vidéo dans le domaine de l'éthologie	11
5	Devenir des substances toxiques dans l'organisme	14
6	Mère japonaise donnant le bain à son fils, victime de la pollution au mercure de la ville de Minamata	15
7	Composantes et enjeux de l'écotoxicologie	17
8	Représentation schématique du champ d'étude des différentes disciplines appliquées à la toxicologie en fonction du niveau de complexité du vivant et du temps	18
9	Structure chimique des polychlorobiphényles	19
10	Toxicité relative des dioxines, furanes et PCB	21
11	Principaux types de pyramides des concentrations selon la valeur du facteur de transfert (F_T)	23
12	Bioamplification des PCB : l'exemple des Grands Lacs canadiens	24
13	Estimation de la distribution globale des PCB dans l'atmosphère	24
14	Concentrations médianes de la somme de 13 congénères de PCBs mesurées dans des billes de plastique du littoral	25
15	Cartographie du CB-153 sur le littoral français entre 2003 et 2007	26
16	Représentation schématique et simplifiée des réponses à une perturbation environnementale	28
17	Photo de la sole commune, <i>Solea solea</i>	32
18	Répartition mondiale de la sole commune <i>Solea solea</i>	33
19	Cycle de vie de la sole commune, <i>Solea solea</i>	34
20	Photo du poisson zèbre, <i>Danio rerio</i>	36
21	Répartition géographique du poisson zèbre <i>Danio rerio</i>	37
22	Cycle de vie du poisson zèbre, <i>Danio rerio</i>	39
23	Illustration du traitement d'image par soustraction statique pour ne laisser que les objets à détecter	52
24	Illustration de l'interprétation de déplacements en 3D dans le plan bidimensionnel d'une caméra	55
25	Les trajectoires possibles des poissons et les erreurs d'interprétations fréquentes des logiciels de <i>video tracking</i>	57

26	Exemple d'échange d'identités entre deux poissons par le module <i>Social interaction</i> du logiciel Ethovision utilisé sans marque externe	58
27	Illustration d'un cas théorique d'erreur de la variation inter-individuelle de la distance parcourue due à une inversion d'identité des individus suivis	59
28	Dispositif mis en place par Beeuwkes et al. (2008) pour analyser la trajectoire d'un individu en trois dimensions et commercialisé sous le nom de <i>Track3D</i> (Spitzen et al., 2008)	60
29	Dispositif mis en place par Delcourt et al. (2011) pour analyser la trajectoire de quatre individus simultanément en trois dimensions à l'aide de marques de couleur	61
30	Représentation schématique du dispositif expérimental d'acquisition vidéo	63
31	Fonctionnement du filtre <i>Visible block / IR pass</i>	64
32	Distance parcourue pendant 5 minutes dans le noir (infra-rouge) en fonction de l'heure de la journée, MacPhail et al. (2009)	66
33	Distance parcourue pendant 10 minutes pendant une série d'extinctions et d'allumage d'éclairage par phases de 10 min, MacPhail et al. (2009)	66
34	Photo de la boîte à lumière mise en place pour l'analyse du comportement locomoteur des larves de poisson zèbre	67
35	Locomotion moyenne de larves de poissons zèbres (5 dpf) avant, pendant et après une série d'alternances de phases de 5 min d'obscurité (infra-rouge) et de lumière	68
36	Locomotion moyenne de larves de poissons zèbres (5 dpf) avant, pendant et après une période de 5 min d'obscurité (infra-rouge) et de lumière	71
37	Aperçu de l'interface du logiciel ODRec	77
38	Graphique et tableau obtenus après traitement d'une vidéo avec le logiciel ODRec	80
39	Aperçu des deux fenêtres successives de l'interface du <i>plugin</i> pour ImageJ <i>Heatmap From Stack</i>	82
40	Aperçu des résultats obtenus par le <i>plugin</i> pour ImageJ <i>Heatmap From Stack</i>	84
41	Photo d'un poisson zèbre et d'une marque NONATEC®	91
42	Suivi de la survie des poissons zèbres marqués et du succès du marquage au cours du temps	95
43	Suivi de la croissance de poissons zèbres non marqués et marqués au cours du temps	97
44	Activité de nage de poissons zèbres marqués et non marqués lors d'un challenge en <i>T-maze</i>	99
45	Montage expérimental pour la mesure de l'activité de nage pendant 23 h	114
46	Détail de l'expérience d'homochromie pour les 26 premiers jours de décontamination des soles	116
47	Données biométriques des soles pendant les 60 j de contamination aux PCB	119
48	Dosages chimiques dans les muscles de sole après 30 et 60 j de contamination aux PCB	120
49	Valeurs de champ chromatique des soles pendant les 60 j de contamination aux PCB obtenues à partir d'une gamme de Munsell	121
50	Distance parcourue pendant 23 h par les soles après 30 et 60 j de contamination alimentaire aux PCB	123
51	Pourcentages de soles enfouies après 30 j de contamination aux PCB	125
52	Temps de mobilité (pour les soles non enfouies et enfouies), d'enfouissement et de latence avant enfouissement	126
53	Valeurs de Munsell de soles soumises à des environnements clairs ou sombres après 60 j de contamination aux PCB	127
54	Résultats obtenus après une première expérience de contamination sur 30 j	132

55	Schéma du T-maze utilisé pour mesurer les capacités exploratoire des poissons zèbres . . .	143
56	Test de préférence de couleur de fond en fonction du régime de contamination	146
57	Activité de nage mesurée dans la zone peu profonde durant le test de T-maze	147
58	Activité de nage mesurée dans la zone profonde durant le test de <i>T-maze</i>	148
59	Variables locomotrices mesurées pendant le test d'activité pendant 24h	149
60	Activité de nage de larves issues de géniteurs contaminés lors d'un challenge lumineux . .	165
61	Distance travelled according to period of the day during the 24-h swimming activity test .	167
62	Répartition verticale pendant le test de nage de 24 h	168
63	Nombre de passages entre les sections verticales pendant le test de nage de 24 h	169
64	Temps passé dans le fond du bac pendant le test de nage de 24 h	170
65	Représentation schématique et simplifiée des événements suivant une perturbation environ- nementale	215
66	Poster présenté au congrès International Flatfish Symposium en 2011	216
67	Fiche technique de micro-tags RFID de la marque Nonatec utilisés pour le marquage indi- viduel des poissons zèbre et des soles communes	217
68	Système de couleur Munsell	218
69	Détail des dosages chimiques de PCB dans les muscles de soles après 30 et 60 j de conta- mination	219

Liste des tableaux

1	Comparaison des principales solutions logicielles de <i>video tracking</i> automatiques existantes	49
2	Nombre et croissance des poissons zèbres non marqués et marqués selon leur sexe	95
3	Nombre de poissons zèbres marqués et leur croissance selon leur sexe et leur poids initial .	98
4	Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données biométriques des soles contaminées aux PCB pendant 60 j	118
5	Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données chimique des soles contaminées aux PCB pendant 30 et 60 j	121
6	Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des valeurs des champs chromatiques des soles contaminées au PCB pendant 60 j	122
7	Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données d'activité de nage pendant 23 h des soles contaminées aux PCB pendant 30 puis 60 j	124
8	Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données du challenge d'enfouissement pendant 30 s sur des soles contaminées au PCB pendant 30 j	125
9	Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données du test d'homochromie pendant 26 j sur des soles après une contamination aux PCB pendant 67 j	128
10	Taux de succès et latéralité du test T-maze	147
11	Results of the comparison between treatments (Solvent, PCB-medium and PCB-high) using Kruskal-Wallis test within period and between treatments for the 24-h swimming activity - vertical movements.	171

The background features a series of thin, light-colored wavy lines that create a sense of movement and depth. These lines are arranged in a pattern that resembles a stylized wave or a series of overlapping curves, filling the lower half of the page.

Introduction générale

Les travaux de thèse rapportés dans ce manuscrit portent sur les **effets des PCB sur le comportement des poissons** en se basant sur l'étude de deux espèces : l'une marine, la sole commune (*Solea solea*), l'autre d'eau douce, le poisson zèbre (*Danio rerio*).

Ces travaux de thèse font appel à différentes notions, que ce soit en rapport avec l'étude du comportement, des polluants ou des espèces utilisés pendant ces travaux, qui peuvent trouver des définitions différentes en fonction des auteurs considérés. Cette introduction générale permettra donc de redéfinir ces notions dans le cadre de cette étude puis de mettre en relation les principaux concepts de l'éthologie avec ceux de l'écotoxicologie afin de mettre en avant le potentiel de l'étude des effets des polluants par l'analyse comportementale.

1 L'éthologie : la science du comportement

1.1 Qu'est-ce que le comportement ?

L'observation du comportement animal est une démarche naturaliste très ancienne. Mais si l'observation reste quelque chose de simple, définir ce qu'est ou n'est pas un comportement, ce qui le constitue et qui (ou quoi) peut être à même de se comporter, peut s'avérer être un exercice assez difficile. En effet, de nombreuses définitions existent sans que les auteurs ne parviennent à s'entendre sur une définition unique (Levitis *et al.*, 2009). À l'inverse, de nombreux ouvrages entrent directement dans les techniques d'analyse du comportement sans même en donner la définition. Certaines d'entre elles sont néanmoins intéressantes :

Par « comportement » j'entends tous les mouvements produits par un animal dans son entier.

Tinbergen (1951)

Le comportement est ce que fait un animal.

Lehner (1979)

Le comportement implique des interactions entre la machinerie d'un animal, ses os, ses muscles, son système nerveux, etc. et son milieu externe tels que la nourriture, ses ennemis et son milieu social.

Hall et Halliday (1998)

B.F. Skinner et D.O. Hebb [...] ont défini le comportement comme étant : tous les procédés observables par lesquels un animal répond à un changement de perception de son état interne ou de son milieu externe.

Barnard (2004)

Les comportements sont les actions et réactions d'une personne ou d'un animal en réponse à une stimulation interne ou externe.

Gong et Xiang (2011)

Les définitions de [Tinbergen \(1951\)](#) et [Barnard \(2004\)](#) décrivent toutes deux le comportement comme étant observable et excluent donc toutes les formes de communication invisible, comme par exemple les communications acoustiques ou chimiques. De plus dans ces cinq définitions, l'individu est à la fois l'échelle minimale et maximale : le comportement d'un groupe de plusieurs individus est donc lui aussi exclu, alors qu'il est admis que le déplacement synchronisé de poissons en banc ou d'oiseaux en volée puisse être considéré comme unité d'analyse ([Allman, 2009](#)).

Alors que les comportementalistes ont pour habitude de mettre des mots sur des actions, le terme « comportement » semble quant à lui faire partie des choses que l'on reconnaît quand on le voit mais qu'il nous est difficile de définir. [Levitis et al. \(2009\)](#) ont tenté de prendre le problème à l'envers en intégrant l'ensemble des sujets étudiés par les comportementalistes pour en faire une définition plus intégrative :

Le comportement est : l'ensemble des réponses coordonnées en interne (action ou inaction) d'organismes vivants (individus ou groupes) aux stimulations internes et/ou externes, excluant les réponses plus facilement comprises comme des changements liés au développement.

Levitis et al. (2009)

Un comportement est donc une interaction d'êtres vivants entre eux ou leur milieu (Fig. 1). Il peut apparaître, changer, ou être inhibé suite à un changement d'état physiologique, un changement dans l'environnement ou à cause d'une nouvelle interaction sociale. Puisque le comportement est une action, son occurrence peut être perçue (par au moins un des sens) quand il se produit ([Miltenberger, 2006](#)). Les comportementalistes ont pour objectif de pouvoir à la fois décrire et mesurer les comportements, mais aussi de pouvoir les expliquer et les prévoir. En effet, un grand nombre de réactions comportementales sont à la fois répétables et prévisibles ([Bell et al., 2009](#)). Depuis les premières observations des naturalistes sur le comportement animal, il a été établi qu'un comportement était initialement composé de mouvements musculaires formant des **successions d'actions complexes** pouvant être classées dans des **unités** reconnaissables à plusieurs

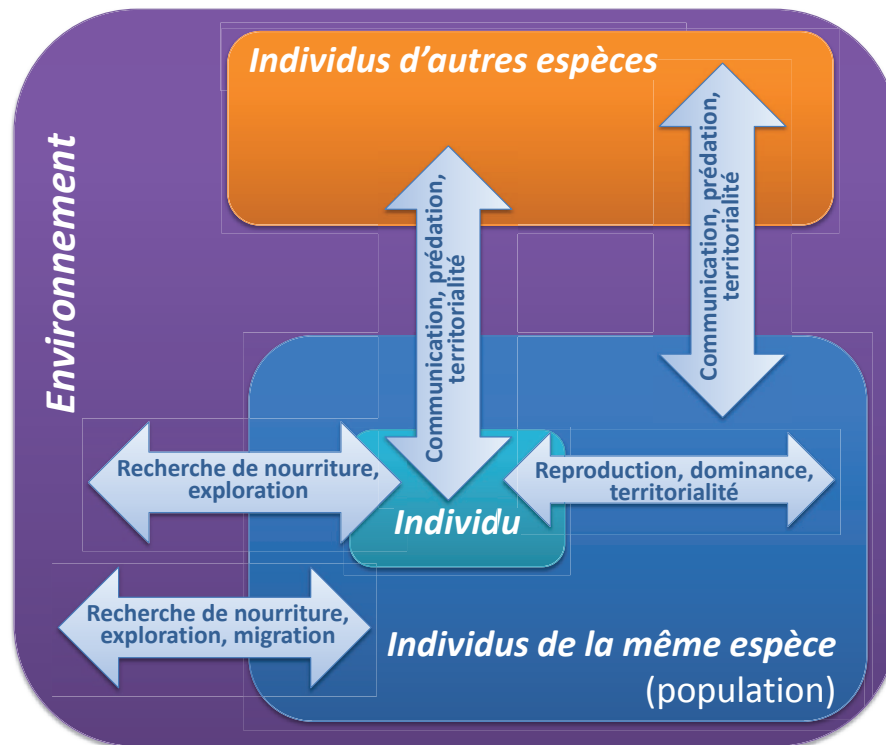


FIGURE 1 – Les différentes relations comportementales qui peuvent lier un individu aux individus de son espèce, d'autres espèces ou à son environnement.

reprises, et donc **mesurables** (Barnard, 2004). Ce sont les unités comportementales qui sont généralement enregistrées lors d'une étude. Ceci permet à la fois de comptabiliser et de distinguer les comportements :

- interrompus : seules les premières unités comportementales sont réalisées ;
- mal réalisés : absence ou répétitions anormales d'unités ou de groupes d'unités ;
- bien réalisés : bon nombre d'unités réalisées dans le bon ordre.

D'une manière générale, une succession d'unités comportementales est appelée une **séquence comportementale**, qu'il s'agisse de l'accomplissement d'une partie d'un comportement, d'un comportement en entier ou de plusieurs comportements successifs.

Ainsi, une unité comportementale peut avoir une ou plusieurs **dimensions mesurables**, qui sont sa **fréquence**, sa **durée** et son **intensité** (Lehner, 1979; Miltenberger, 2006).

1.2 La naissance de l'éthologie

D'une manière générale, l'**éthologie** est le nom donné à l'étude du comportement. L'origine du mot est grec, et vient de l'association du terme ἦθος (ethos) qui signifie « caractère », « état d'âme », « disposition psychique » et λόγος (logos) qui signifie « raison »,

« science ». Passer de la simple observation des animaux dans leur milieu à l'explication de l'origine et de l'évolution d'un comportement a demandé un certain nombre d'étapes et l'établissement de règles et concepts. La première de ces étapes importantes s'est déroulée entre le xvii^e et le xviii^e siècle : durant cette période, se sont affrontés les aristotéliens, les cartésiens et les sensationnalistes au sujet des origines du comportement (Richards, 1979). Selon les aristotéliens, le comportement était un instinct fonction de l'âme de l'animal, que le Créateur leur avait insufflé pour préserver l'individu et sa progéniture. Descartes, quant à lui, refusait l'idée que les animaux avaient une âme et que leurs actions pouvaient résulter d'une quelconque cognition primitive. Selon lui, les animaux n'étaient que des machines, réalisant des actions qui venaient telles quelles, sans aucune forme de réflexion. Les aristotéliens et les cartésiens pensaient que les animaux n'avaient aucune forme de raison ou d'intelligence, et qu'ils étaient seulement dirigés par l'instinct (Richards, 1979). Les sensationnalistes ont quant à eux développé un courant de pensée basé sur l'établissement des comportements par l'apprentissage au cours de la vie de l'individu.

Dans la continuité de ce dernier mouvement de pensée, Lamarck (1809) a été l'un des premiers à vouloir expliquer l'agissement des animaux qu'il observait.

Or, les besoins des animaux qui possèdent un système nerveux, étant, pour chacun, selon l'organisation de ces corps vivants :

- 1. de prendre telle sorte de nourriture ;*
- 2. de se livrer à la fécondation sexuelle que sollicitent en eux certaines sensations ;*
- 3. de fuir la douleur ;*
- 4. de chercher le plaisir ou le bien-être.*

*Ils contractent, pour satisfaire à ces besoins, diverses sortes d'habitudes, qui se transforment, en eux, en autant de penchants, auxquels ils ne peuvent résister, et qu'ils ne peuvent changer eux-mêmes. De là, l'origine de leurs actions habituelles, et de leurs inclinations particulières, auxquelles on a donné le nom d'**instinct**. Ce penchant des animaux à la conservation des habitudes et au renouvellement des actions qui en proviennent, étant une fois acquis, se propage ensuite dans les individus, par la voie de la reproduction ou de la génération, qui conserve l'organisation et la disposition des parties dans leur état obtenu ; en sorte que ce même penchant existe déjà dans les nouveaux individus, avant même qu'ils l'aient exercé. C'est ainsi que les mêmes habitudes et le même instinct se perpétuent de générations en générations, dans les différentes espèces ou races d'animaux, sans offrir de variation notable, tant qu'il ne survient pas de mutation dans les circonstances essentielles à la manière de vivre.*

Lamarck (1809)

Le terme « **éthologie** », dans le sens de « **l'étude du comportement animal dans l'environnement naturel** », est utilisé pour la première fois par le Français **Geoffroy Saint-Hilaire (1859)** pour désigner les descriptions des moeurs des animaux telles qu'elles ont été faites par Aristote, Buffon, Réaumur, G. Leroy ou Lamarck.

C'est à l'éthologie [...] qu'appartient l'étude des relations des êtres organisés dans la famille et la société, dans l'agrégat et la communauté.

Geoffroy Saint-Hilaire (1859)

Par la suite, la personne qui a grandement contribué à l'évolution de cette discipline est Darwin. En effet, ce-dernier est considéré comme étant l'un des premiers comportementalistes modernes, d'une part par ses travaux d'observations lors de son voyage aux îles Galápagos et d'autre part par son ouvrage « *The Expression of the Emotions in Man and Animals* ». Plus que de simples observations, **Darwin** a su associer les notions de **comportement** et de **sélection naturelle**, en introduisant le concept de **sélection sexuelle** que l'on retrouve entre autre dans les mécanismes de spéciation.

Outre-Atlantique, c'est l'article de **Wheeler de 1902** qui popularise le terme « *ethology* » dans les pays anglophones.

En **1963**, **Tinbergen** redéfinit l'**éthologie** comme étant « *l'étude biologique du comportement* » et propose une méthodologie s'articulant autour de quatre questions :

- quelles sont les **causes** immédiates du comportement ?
- quelle est sa **valeur de survie** ?
- comment s'est-il mis en place au cours de l'**ontogenèse** ?
- comment s'est-il mis en place au cours de la **phylogenèse** ?

Ces quatre questions sont à la fois une adaptation des trois questions majeures de la biologie proposées par Huxley et des « quatre causes » d'Aristote. Cet article de **Tinbergen** a permis l'émergence d'une nouvelle discipline, l'**écologie comportementale**, qui se différencie maintenant de l'éthologie cognitive en s'intéressant plus particulièrement au comportement animal tel qu'on peut l'observer en milieu naturel ou en conditions expérimentales maîtrisant la variation de certains facteurs environnementaux et qui est souvent interprétée de manière évolutionniste (Fig. 2). En effet, l'expression d'un comportement peut s'adapter voire évoluer, être inhibée ou disparaître, en fonction des facteurs environnementaux. Ces changements ne se font pas aléatoirement : plus les coûts (en énergie et en prise de risques) sont faibles et les bénéfices élevés, plus la valeur de survie du comportement est grande, au sens où elle optimise les chances de se reproduire. L'écologie comportementale cherche donc à savoir dans quelle mesure les comportements liés à la survie et à la reproduction dépendent de l'environnement.

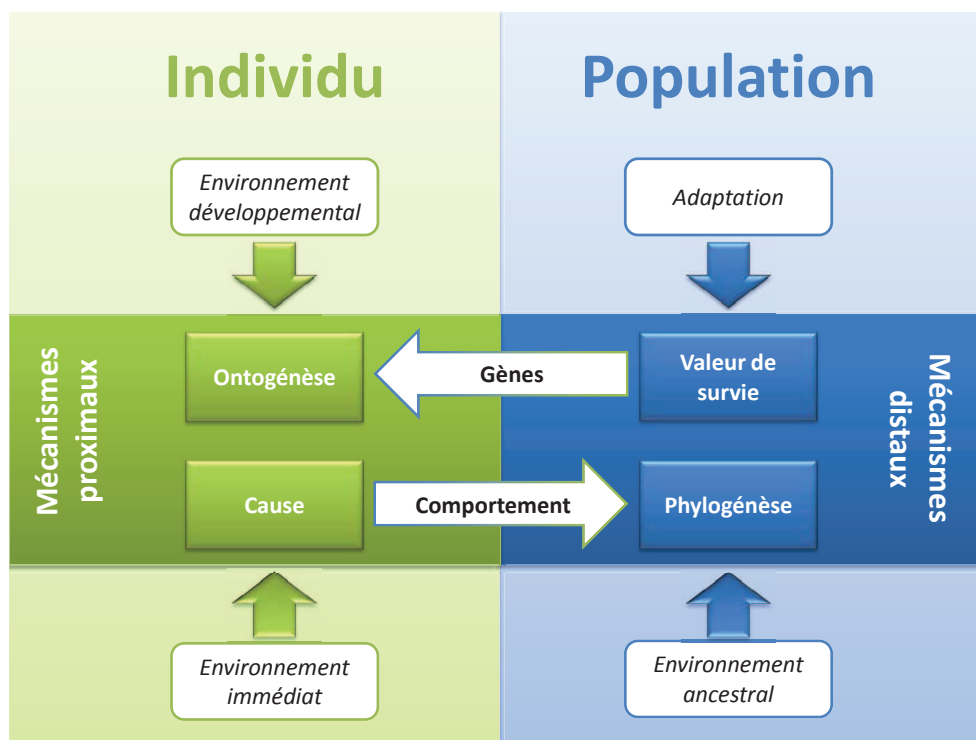


FIGURE 2 – Représentation schématique des quatre questions de Tinbergen et des relations entre elles. Modifiée de : [Wikimedia Commons](#) – Crédits W Pete Welch.

Le caractère observable rend l'approche éthologique particulièrement intéressante. [Dawkins \(2007\)](#) rappelle que l'**étude du comportement est non-invasive** (car elle n'implique pas d'altérer la peau) mais aussi potentiellement **non-intrusive** (car elle peut ne pas perturber l'animal). Ceci permet aux études éthologiques d'être facilement combinées à d'autres disciplines comme la physiologie.

D'un point de vue méthodologique, l'étude du comportement animal va nécessiter de déterminer *a priori* le nombre d'individus à suivre, la période de temps d'observation, la liste des unités comportementales à analyser et les variables descriptives adéquates à enregistrer, ainsi qu'éventuellement le système de codage associé ([Altmann, 1974](#)). L'observation directe nécessite une méthodologie très précise et une grande rigueur mais ne permet pas systématiquement de pouvoir enregistrer toutes les informations nécessaires. C'est pour cela que l'**éthologie** moderne a rapidement sollicité les outils d'**acquisition vidéo** dans un premier temps, puis les outils d'analyse numérique développés par la suite avec l'émergence de l'informatique.

La section suivante présente un bref historique de l'utilisation des outils vidéos dans l'étude du comportement animal.

1.3 L'étude du comportement par l'analyse vidéo

Les premières études du mouvement par séquence d'images ont été réalisées par le physiologiste français [Marey \(1894\)](#) grâce à son invention permettant de prendre plusieurs photographies dans un intervalle de temps très court (Fig. 3). Cette technique, appelée la **chronophotographie**, a permis de détailler la physiologie du mouvement de nombreuses espèces de vertébrés comme l'Homme, le cheval l'anguille, la raie ou d'invertébrés comme la comatule. L'animal étant souvent fixé sur un support, cette première approche était très orientée sur la physiologie du mouvement plus que sur le comportement en lui-même.

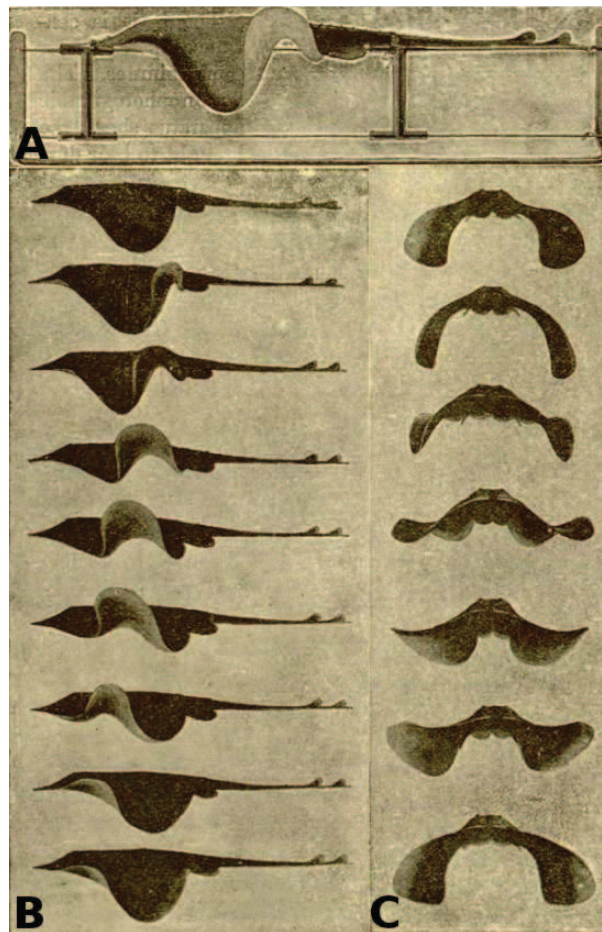


FIGURE 3 – Représentation des mouvements ondulatoires des nageoires de la raie obtenue par chronophotographie, [Marey \(1894\)](#). A : Dispositif utilisé pour fixer le poisson ; B : Vue de profil ; C : Vue de face.

Par la suite, ce sont les techniques d'enregistrement vidéographiques d'individus libres qui ont permis les premières études comportementales utilisant un support de type film, puis magnétique ou maintenant numérique. La démocratisation des outils d'enregistre-

ment vidéo et des ordinateurs (essentiellement due à la baisse relative de leurs coûts) ont permis aux comportementalistes d'intégrer de plus en plus facilement ces outils en éthologie (Dawkins, 2007, Fig. 4).

Les premières avancées ont été l'utilisation de l'enregistrement vidéo afin de pouvoir réanalyser *a posteriori* les **séquences comportementales** et ainsi compléter et rendre les données acquises plus précises (Candland *et al.*, 1972; Patterson, 1977; Haimoff, 1981) tout en respectant les méthodologies de Altmann (1974, voir p. 8). Par la suite, des programmes informatiques de **codages d'observation comportementale** en temps réel ont fait leur apparition (Crossman *et al.*, 1978; Flowers et Leger, 1982; Deni *et al.*, 1983; Unwin et Martin, 1987; Kahng et Iwata, 1998; Koch et Zumbach, 2002). Ces programmes permettent par une action de l'utilisateur (pression d'une touche, clic de souris) de démarrer l'identification du début et de la fin d'une variable descriptive d'une unité comportementale choisie. À la fin de l'encodage, le nombre d'actions de l'utilisateur pour déclencher l'identification de chaque variable descriptive permet d'en connaître la durée unitaire et la fréquence. C'est depuis les années 90 que des systèmes plus élaborés couplant à la fois la vidéo et le codage comportemental ont pu faire leur apparition (Noldus, 1991; Tapp et Walden, 1993; Tapp *et al.*, 1995; Ruusuvirta *et al.*, 1996; Ottoni, 2000; Japysú *et al.*, 2006; Hänninen et Pastell, 2009).

Dans le même temps, ont été développés des outils de **video tracking** automatiques permettant l'analyse des trajectoires des individus filmés (Rudell, 1979; Livesey et Leopard, 1981; Kawai, 1984; Olivo et Thompson, 1988; Ergener et Wellens, 1989; Derry et Elliott, 1997; Hashimoto *et al.*, 1999; Noldus *et al.*, 2001; Suzuki *et al.*, 2003; Kato *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2004). Jusqu'alors, ces informations de trajectoires étaient uniquement obtenues *via* des systèmes télémétriques (Gapenne *et al.*, 1990) qui, contrairement à la majorité des systèmes de *video tracking*, nécessitent l'utilisation de marques électroniques (internes ou externes) pouvant biaiser le comportement des individus enregistrés et non adaptables aux petits individus (poisson zèbre, larves de poissons en général, insectes).

L'outil idéal permettrait d'obtenir automatiquement depuis une vidéo à la fois les données de *tracking* (distance parcourue, vitesse moyennes, zones explorées, ...) ainsi que l'encodage des séquences comportementales. Ceci commence à se développer pour le modèle souris mais n'existe pas encore pour le poisson. Une revue méthodologique de différentes techniques de *video tracking* est présentée dans le *Chapitre 1 : Le video tracking*, p. 47.

Après cette première partie faisant le point sur le comportement et son analyse par les systèmes vidéos, la seconde partie va quant à elle définir la notion de pollution, ainsi que des moyens de l'étudier.

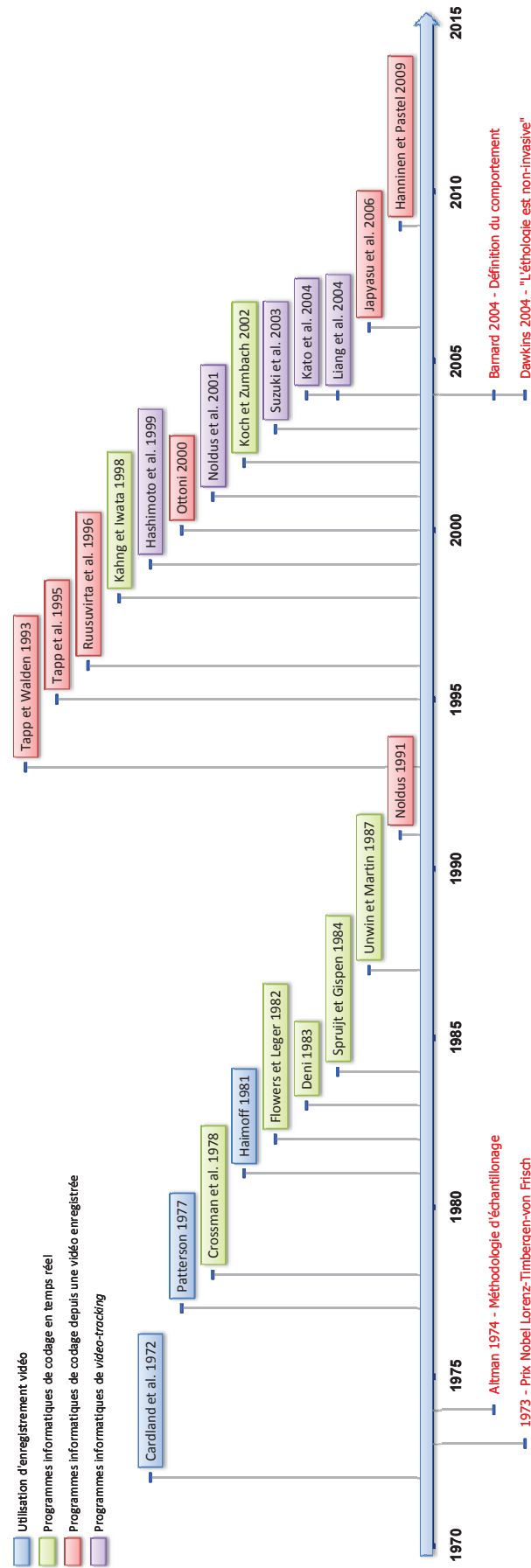


FIGURE 4 – Chronologie (non-exhaustive) des publications sur les avancées de l'analyse vidéo dans le domaine de l'éthologie.

2 Comprendre la pollution

2.4 Qu'est-ce que la pollution ?

Le terme de pollution est de plus en plus utilisé pour décrire des phénomènes bien différents. Dans le langage courant, une pollution peut être chimique, biologique, génétique, sonore, visuelle, etc.

Dans un premier temps, il convient de distinguer les perturbations naturelles de l'environnement (éruptions volcaniques, tremblements de terre, raz-de-marées, etc.) des perturbations d'origine humaine. Ce sont ces **perturbations liées aux activités humaines** qui peuvent être à l'origine de **pollutions**.

Ainsi, l'une des premières définitions, à la fois moderne et scientifique, de la pollution est celle donnée par [The Environmental Pollution Panel President's Science Advisory Committee \(1965\)](#) :

La pollution 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 modifications peuvent affecter l'Homme directement ou au travers des ressources agricoles, en eau ou 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.

*The Environmental Pollution Panel President's Science
Advisory Committee (1965)*

Selon [Ramade \(2007\)](#), cette définition mélange deux concepts différents :

- la **pollution**, qui va réellement altérer l'environnement et/ou la santé humaine ;
- la **nuisance**, qui consiste en une altération de l'environnement sans conséquence écologique ou sanitaire (comme « l'enlaidissement de la nature »).

Il redéfinit donc la pollution comme suit :

Constitue une pollution toute modification anthropogénique d'un écosystème se traduisant par un changement de concentration des constituants chimiques naturels, ou résultant de l'introduction de substances chimiques artificielles ; toute perturbation du flux de l'énergie, de l'intensité des rayonnements, de la circulation de la matière, ou encore toute altération d'une biocénose naturelle provoquée par l'introduction d'espèces exotiques invasives.

Ramade (2007)

Le terme « **polluant** » va quant à lui désigner l'agent responsable d'une pollution.

Les pollutions peuvent être classées de différentes manières, par exemple par la nature de l'agent polluant (pollution biologique, physique ou chimique), par la nature du milieu contaminé (pollution atmosphérique, continentale, aquatique), selon sa durée et/ou son intensité (pollution aiguë ou chronique), etc. Il n'existe pas de classification parfaite et tout reste une question de point de vue.

Les polluants chimiques peuvent eux aussi être différenciés par leur nature. Ainsi, il est possible de distinguer **deux types de polluants** :

- ceux d'**origine naturelle** ; normalement présents en faible quantité dans l'environnement (et donc inoffensifs, voire essentiels pour la vie) mais dont les concentrations vont augmenter à cause des activités humaines, les rendant ainsi toxiques (comme les métaux ou le CO₂ , par exemple) ;
- ceux d'**origine humaine** ; non naturels, ils sont synthétisés par l'Homme et sont appelés **xénobiotiques** car « *ce sont des substances qui n'interviennent en aucun cas dans la constitution de la matière vivante* » (Ramade, 2007) et leur toxicité peut s'exprimer à de très faibles doses.

Ce sont ces derniers qui sont les plus étudiés depuis quelques années. En effet, depuis un siècle, de nombreuses nouvelles molécules sont créées chaque année et rapidement produites à grande échelle. Leurs réels effets sur la santé et l'environnement sont parfois connus bien plus tard. Dans ce manuscrit de thèse, les termes « pollution » et « polluant » seront relatifs à des xénobiotiques.

2.5 Les disciplines de la toxicologie

2.5.1 La toxicologie

D'une manière générale, la **toxicologie** a pour objet « *d'étudier les divers problèmes propres aux toxiques tant sur le plan analytique, qu'au point de vue physiologique et biochimique* » (Ramade, 1977). Cette discipline est très ancienne : le premier document

écrit connu faisant référence à la toxicologie est celui du papyrus *Ebers*, dont l'origine est estimée à 1500 av. J.-C. (Hodgson, 2010). Le terme vient quant à lui du grec τοξικός (toxicos) qui signifie « poison » et λόγος (logos) qui signifie « raison », « science ».

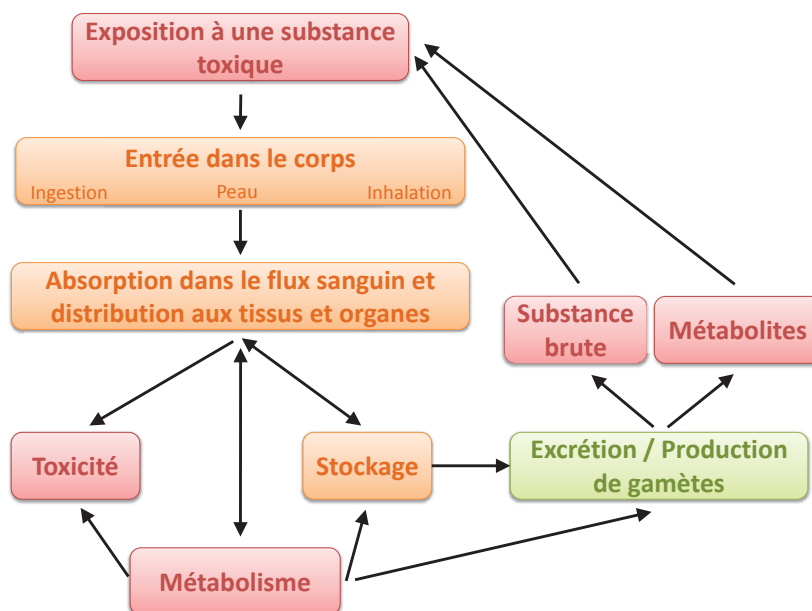


FIGURE 5 – Devenir des substances toxiques dans l'organisme, d'après Hodgson (2010).

Cette discipline permet donc de comprendre le champ d'action des substances toxiques sur le plan moléculaire, cellulaire, etc. jusqu'à l'individu en entier (Fig. 5). De plus, la toxicologie est une discipline qui, historiquement, s'est surtout orientée sur l'étude à de fortes doses de molécules très toxiques, le but de cette science étant la compréhension des poisons et non la description de phénomènes environnementaux réalistes.

2.5.2 Minamata : un exemple concret des limites de la connaissance

Au début des années 50, dans la région de Minamata (située à l'Ouest de l'île de japonaise de Kyushu) une « épidémie » semble se répandre à grande vitesse sans explication. Dans leur revue, Harada et Smith (1975) ont repris la chronologie des événements :

- dès 1950 : les poissons, coquillages, crustacés et algues de la baie de Minamata ont commencé à périr ;
- 1952 : certains oiseaux ont commencé à tomber dans la mer en plein vol ;
- 1953 : les animaux domestiques comme les chiens, les chats et les cochons ont été touchés ; leur comportement devenait anormal avant de mourir, particulièrement les chats qui salivaient et se mettaient à tourbillonner sur place sans raison (maladie appelée du « chat dansant » par les habitants) ;

- avril 1956 : une première victime est présentée à l'hôpital de Minamata, il s'agit d'une fillette de 5 ans souffrant de troubles locomoteurs, troubles de la parole et délires ;
- octobre 1956 : la « maladie du chat dansant » est reconnue comme étant en fait la conséquence d'une pollution par des particules métalliques.

Le lien sera rapidement fait avec l'usine de Chisso (*Chisso Corporation's Minamata factory*), mais malgré tout l'usine continue de rejeter des effluents pouvant contenir à la fois du manganèse, du thallium, de l'arsenic, du mercure, du sélénium, du cuivre ou du plomb. Pendant plusieurs années, tous les polluants ont été étudiés un par un jusqu'à ce que les médecins et scientifiques trouvent en 1959 (soit 9 ans après les premiers signes) que l'origine venait d'une contamination par le mercure. Malgré les premiers signes inquiétants dès 1950 dans le milieu marin, aucune interdiction de pêche n'avait été prononcée à l'époque.



FIGURE 6 – Mère japonaise donnant le bain à son fils, victime de la pollution au mercure de la ville de Minamata. Photo : William Eugene Smith.

Les enfants nés durant le pic de contamination ont été gravement touchés et beaucoup d'entre eux ont vu le jour avec de graves malformations (Fig. 6). De nos jours, la zone est toujours contaminée (Yoshida, 2007; Nakata *et al.*, 2008). Le gouvernement japonais a officiellement reconnu en 2001 que 2 265 patients avaient été officiellement diagnostiqués, parmi lesquels 1 558 périrent (Yoshida, 2007, <http://www.env.go.jp/en/chemi/hs/minamata2002/ch2.html>). Minamata a été l'un des premiers drames de cette ampleur, mais d'autres maladies furent reconnues, parfois bien plus tard, comme étant causées par des polluants d'origine industrielle :

- la maladie d'*Itai-itai* reconnue officiellement comme étant une intoxication au cadmium en 1970 (Shiraishi, 1975) ; les rejets d'une mine d'argent ont pollué les rizières

dans le préfecture de Toyama au Japon ;

- la maladie de Yushō en 1968 au Japon, due à de fortes concentrations de PCB et PCDF (polychlorodibenzo-furanes) contenus dans de l’huile de son de riz (Miyata *et al.*, 1989) ;
- la contamination aux PCB de Taiwan : à la fin des années 1980, 1843 cas ont été recensés avec un pic de contamination situé de mars à juillet 1979, soit 10 ans après Yushō (Hsu *et al.*, 1985) ;
- une autre contamination aux PCB a eu lieu en Chine, à Yu-Cheng, entre 1991 et 1992 ;
- la contamination du porc à la dioxine en Irlande en 2008 (Heres *et al.*, 2010).

Les cas de pollution de grande ampleur augmentant, la toxicologie a dû étendre son champ de connaissance et de compétence afin de pouvoir expliquer, puis anticiper ces phénomènes. La section suivante décrit l’évolution de cette discipline.

2.5.3 De la toxicologie à l’écotoxicologie : un changement progressif

La toxicologie manquant d’outils pour expliquer certains mécanismes, différentes disciplines sous-jacentes ont commencé à se développer afin de combler le manque de connaissance sur les polluants. En effet, la rémanence de certains sous-produits des activités humaines dans l’environnement était souvent mal connue. Pire encore, certaines idées reçues ont persisté pendant des années : par exemple, alors que la fragilité des écosystèmes aquatiques d’eau douce était connue, le milieu marin a été quant à lui très longtemps considéré comme très stable car bénéficiant du « pouvoir tampon des océans » (Waldichuk, 1978). De ce fait, les rejets d’effluents toxiques voire l’enfouissement de déchets (y compris radioactifs) dans le milieu marin ont été pratiqués pendant des années de manière complètement légale.

La **toxicologie environnementale** (ou toxicologie de l’environnement), qui tentait de percer depuis les années 30, s’est alors développée de manière plus importante. Celle-ci place ses études expérimentales dans des conditions de concentrations qui se veulent réalistes par rapport aux situations existantes dans le milieu naturel, mais conserve l’individu entier comme plus haut niveau d’organisation. La toxicologie environnementale s’appuie sur les connaissances acquises par la toxicologie traditionnelle (comme par exemple la chimie du composé étudié). Elle n’explique pas tout à l’échelle d’un écosystème, mais permet de franchir certaines barrières écologiques et est donc une étape préalable indispensable à toute approche écosystémique. De plus, la toxicologie environnementale étant moins anthropocentrée, elle s’intéresse aussi à des phénomènes comme par exemple le SO₂ (dioxyde de soufre) qui peut devenir toxique pour les plantes.

Parallèlement à la mise en avant de la toxicologie environnementale s’est développée

une autre branche de la toxicologie : la **toxicologie comportementale**. Cette discipline a pour but d'étudier les effets de substances toxiques sur le comportement. De par la définition même du comportement (voir section 1.1 *Qu'est-ce que le comportement ?* de l'*Introduction générale*, p. 3), la toxicologie comportementale a permis un changement d'échelle en plaçant l'individu comme unité d'étude et a ouvert la porte des interactions intra- et inter-spécifiques. De plus, le comportement étant potentiellement facilement observable, cette approche permet d'établir la relation entre substances toxiques et symptômes comportementaux, permettant ainsi d'avoir des éléments simples de diagnostic.

Au cours des années 70, la demande sociétale pour obtenir des réponses aux questions environnementales est devenue de plus en plus forte. Dans le même temps, de nouveaux outils comme la modélisation ont pu voir le jour et apporter leur contribution à l'étude des mécanismes de transfert des polluants d'un niveau trophique à l'autre. L'intégration de ces outils a donné lieu à la création de l'**écotoxicologie** (Fig 7). Ce terme, inventé par le français René Truhaut en 1974 (Ramade, 1977), est une compression d'**écologie** et de **toxicologie**.

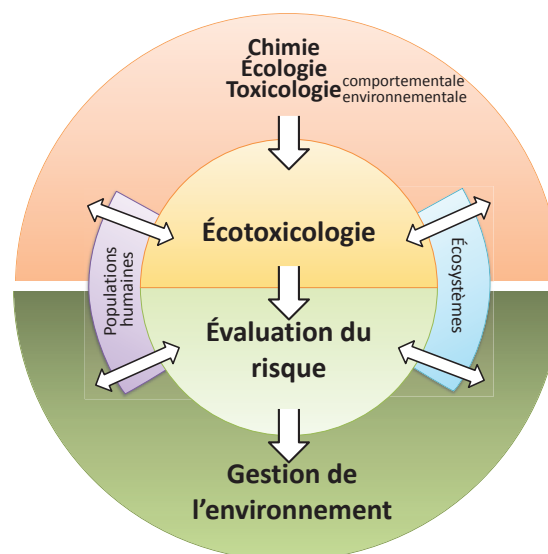


FIGURE 7 – Composantes et enjeux de l'écotoxicologie, d'après Lam *et al.* (1999).

L'écotoxicologie est définie comme la science dont l'objet est l'« étude des polluants toxiques à l'échelle d'un écosystème » (Ramade, 1977) et même « à celle de la biosphère tout entière » (Ramade, 1992). Pour ce faire, l'écotoxicologie se repose à la fois sur les connaissances acquises en chimie, mathématiques, écologie et en toxicologie. La naissance de l'écotoxicologie n'a pas pour autant fait disparaître les autres disciplines de la toxicologie : au contraire des études préalables à différentes échelles sont nécessaires pour aborder la dimension complexe d'un écosystème.

Ainsi, pour connaître les effets potentiels d'une nouvelle molécule dont on ignore tout à l'échelle d'un écosystème tout entier, il est nécessaire d'aborder tout d'abord l'approche chimique, toxicologique, toxicologique environnementale et comportementale, puis écotoxicologique (Fig. 8). Chacun de ces éléments est indispensable car ensemble ils apportent des réponses de l'échelle moléculaire à celle de la biosphère afin de pouvoir à la fois expliquer les causes d'une pollution, et d'anticiper les effets potentiels à venir.

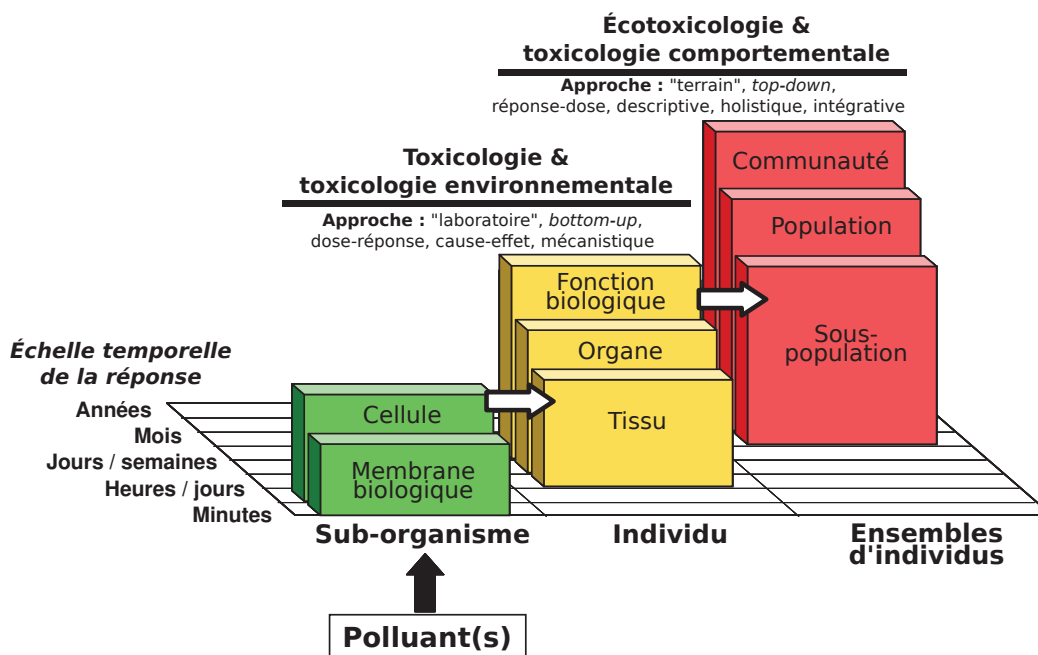


FIGURE 8 – Représentation schématisée du champ d'étude des différentes disciplines issues de la toxicologie en fonction du niveau de complexité du vivant et du temps, d'après Munkittrick et McCarty (1995) et Adams et Greeley (2000).

Les travaux de cette thèse se situent dans le domaine de la toxicologie comportementale, en utilisant des doses rencontrées dans l'environnement. Parmi l'ensemble des polluants existants, ces travaux de thèse se sont focalisés sur les PCB. La section suivante porte sur la description de ces molécules polluantes, ainsi que sur leurs effets connus sur les êtres vivants.

3 Les PCB

3.6 Description et historique de production

Les **polychlorobiphényles (PCB)** sont des composés aromatiques organochlorés synthétisés industriellement. De par leur structure, il existe **209** dérivés théoriques, renfermant 1 à 10 atomes de chlore en différentes positions (INRS, 2007, Figure 9). Chacun de ces dérivés est appelé un **congénère**.

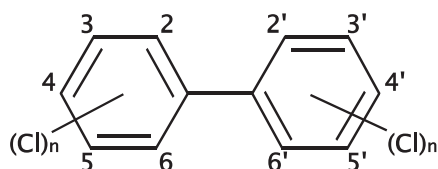


FIGURE 9 – Structure chimique des polychlorobiphényles. Source : Wikimedia Commons (<http://commons.wikimedia.org/>).

Leur solubilité dans l'eau est extrêmement faible (0.007 à 5.9 mg.L⁻¹) mais ils sont solubles dans les huiles et la plupart des solvants organiques (INRS, 2007). Cette solubilité augmente cependant avec la température et le nombre d'atome de chlore en position *ortho* (Huang et Hong, 2002). De même, leur stabilité thermique augmente en fonction du nombre d'atomes de chlore (HSPH, 2001).

Les propriétés chimiques de ces composés varient en fonction de leur degré de chloration : les mélanges à faible chloration sont fluides et incolores, alors que ceux à forte chloration sont plus visqueux (Safe, 1993). Ces molécules ont été massivement utilisées comme lubrifiant, pour la fabrication des transformateurs électriques, condensateurs, subsectionneurs de puissance, ou comme isolants dans des environnements à très haute tension (THT) en raison de leur relative ininflammabilité et de leurs excellentes caractéristiques diélectriques (ils étaient alors mélangés à des chlorobenzènes). Ils ont aussi été utilisés comme fluides caloporteurs (dans les environnements à risque d'incendie, dont les navires transportant des carburants), comme fluides hydrauliques dans des environnements à risque ou à contraintes thermiques (mines..), dans les moteurs de pompe, fours à micro-ondes, ou comme additifs d'huiles ou de produits de soudures, dans certains adhésifs, peintures et jusque dans des papiers autocopiants. C'est pour ces propriétés qu'ils ont

été massivement produits et inclus dans des mélanges tels que l'Aroclor (*Monsanto Chemical Company*, États-Unis), le Clophen (*Bayer*, Allemagne), le Kanechlor (*Kanegafuchi - Monsanto Chemical Company*, Japon), le Santotherm (*Mitsubishi*, Japon), le Phenoclor et le Pyralène (*Prodolec*, France), ou le Fenclor (*Caifaro*, Italie), etc. jusqu'au milieu des années 80 (Ballschmiter et Zell, 1980; Safe, 1993; Takasuga *et al.*, 2006).

3.7 Règlements relatifs aux PCB

À partir des années 70, leur toxicité environnementale a été reconnue par le « *Toxic Substances Control Act* » (TSCA, 1976), et le dosage puis le devenir des PCB dans l'environnement ont commencé à être suivis (Helle *et al.*, 1976; Letz, 1983; Jaouen-Madoulet *et al.*, 2000).

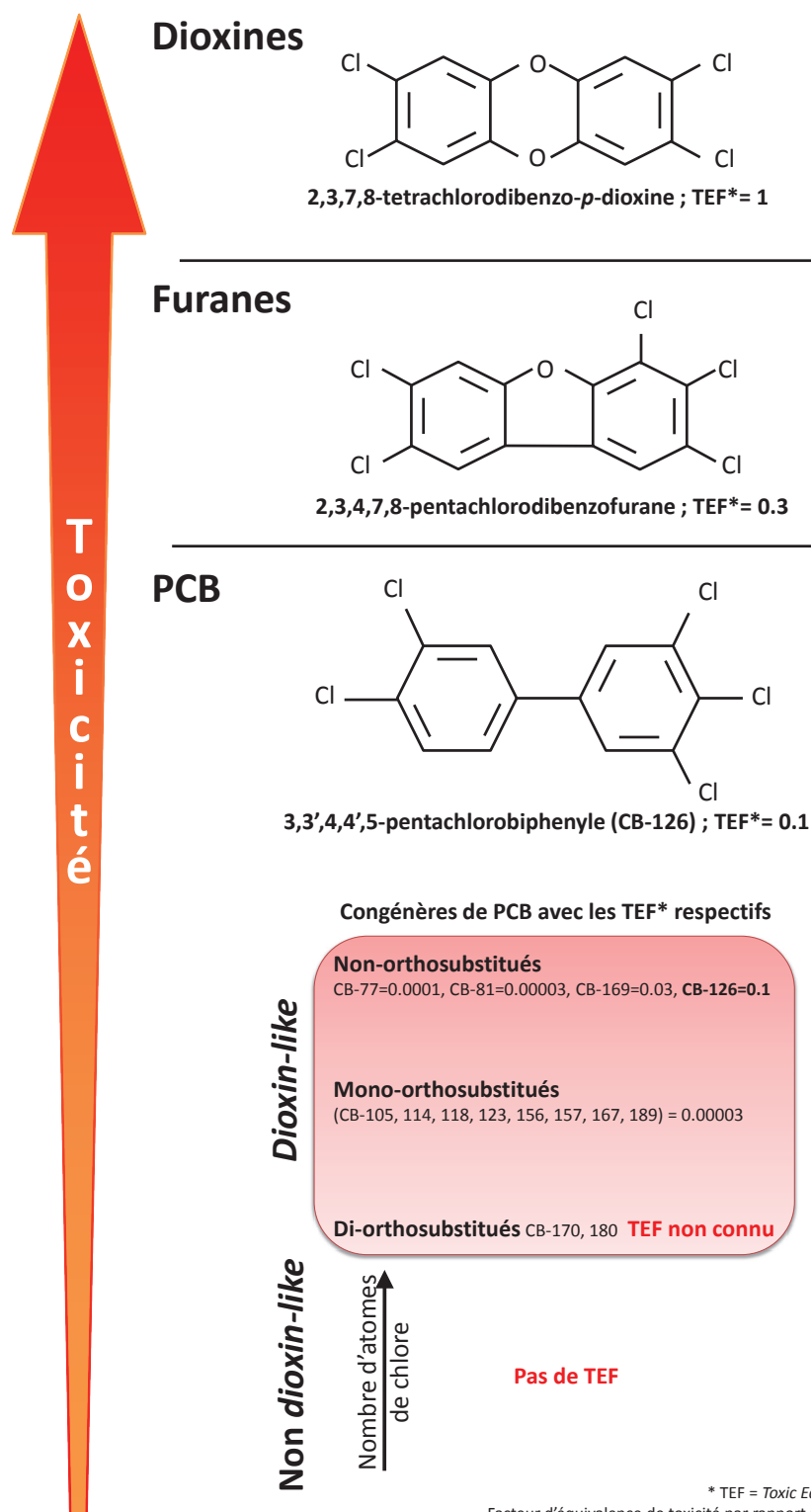
Parmi les 209 congénères théoriques, McFarland et Clarke (1989) en ont retenus 36 potentiellement toxiques. En effet, la toxicité peut considérablement varier d'un congénère à l'autre en fonction du nombre et de la position des substitutions. Parmi les PCB les plus toxiques, on distingue le groupe des *dioxin-like* qui, comme leur nom l'indique, vont avoir une structure et des effets proches de ceux de la dioxine (Metcalf et Metcalf, 1997, Figure 10).

Parmi le groupe des *dioxin-like*, les congénères ayant des atomes de chlore en position *meta* ou *para*, sans chlore en position *ortho* (dits PCB *non-ortho* substitués) ou avec un seul atome de chlore en position *ortho* sont les plus toxiques (Metcalf et Metcalf, 1997, Fig. 10).

À cause de leur composition et de leur grande rémanence dans l'environnement, ils ont été classés parmi les polluants organiques persistants (POP). Certains travaux ont permis d'établir des seuils de concentration quant aux normes industrielles (Brown *et al.*, 1994; Chovancová *et al.*, 2011) ou à la consommation de produits issus de la pêche (Pompa *et al.*, 2003; Turyk *et al.*, 2006; Weintraub et Birnbaum, 2008; Harris et Jones, 2008; Gewurtz *et al.*, 2011) voire en aquaculture (Berntssen *et al.*, 2005; Pinto *et al.*, 2008).

Au niveau européen, les textes qui ont mené à l'interdiction des PCB sont :

- la convention de Genève 1979 sur la pollution atmosphérique transfrontalière à longue distance, ratifiée entre 34 états membres, mais ne prenant pas encore en compte ce type de pollution ;
- la convention d'Århus de 1998 (UNECE, adopted 25 June 1998), durant laquelle un protocole à la convention de Genève de 1979 a été ratifié entre les 39 états membres ; ce texte interdit la production et l'utilisation de 16 types de POP (dont les PCB) mais n'est entré en vigueur qu'en 2003 ;



* TEF = Toxic Equivalent Factor

Facteur d'équivalence de toxicité par rapport à la dioxine (=1)

FIGURE 10 – Toxicité relative des dioxines, furanes et PCB d'après les valeurs données par Van den Berg *et al.* (2006). Seuls les congénères les plus toxiques sont représentés à titre d'exemple.

3.8 Les PCB dans l'environnement

3.8.1 Généralités sur la biodisponibilité, la bioaccumulation et la bioamplification

L'estimation ou le calcul de la concentration d'une substance dans un milieu (air, eau et sédiment), qu'elle soit essentielle ou toxique, n'apporte aucune information réelle sur le fait qu'elle pourra être absorbée ou non par les organismes vivants. La **biodisponibilité** d'une substance en général (et donc d'un polluant en particulier), est la fraction de la quantité totale présente dans l'environnement qui peut être prélevée du milieu par un organisme et être transférée, stockée et métabolisée par ce dernier (Ramade, 2007). Ce n'est que si cette substance est biodisponible qu'elle pourra avoir une influence sur les individus puis éventuellement dans l'équilibre d'un écosystème.

Le terme de **bioaccumulation** (ou **bioconcentration**) désigne le processus permettant aux organismes vivants d'absorber et de concentrer certains éléments rares de l'environnement (Ramade, 2007). Ce processus est indispensable pour leur survie dans le cas de substances chimiques tels que les oligoéléments utiles, mais peut aussi se produire dans le cas de molécules chimiques toxiques. La bioaccumulation se mesure en calculant le rapport de concentration d'un élément dans un organisme par rapport à sa concentration dans le biotope. Ce rapport est appelé le **facteur de concentration** (F_c). Pour les organismes aquatiques pélagiques, il se calcule en prenant en compte à la fois l'apport du milieu (voie transtégumetaire et transbranchiale) et l'apport alimentaire :

$$F_c = \frac{[C_p + C_a]}{[eau]} \quad \text{avec : } C_p, \text{ quantité de polluants absorbée par contact avec l'eau}$$

C_a , quantité de polluants absorbée par la nourriture

Pour les individus au mode de vie benthique, la concentration de polluant mesuré à la surface du sédiment peut être considérée dans le calcul et ajoutée à celle de l'eau (Ramade, 2007). Lorsque ce rapport est supérieur à 1, il y a bioaccumulation de l'élément. C'est ce qui est observé dans le cas des PCB : leur caractère lipophile et leur faible métabolisation les rendent facilement bioaccumulables.

Un autre facteur important à considérer est le **facteur de transfert** (F_t) qui permet de calculer le rapport de concentration entre un niveau trophique donné $n+1$ et celui du niveau inférieur n de ses proies.

$$F_t = \frac{[NT_{n+1}]}{[NT_n]} \quad \text{avec : } NT, \text{ niveau trophique réel de l'organisme}$$

Le calcul de ce rapport peut s'avérer complexe lorsqu'il s'agit d'espèces omnivores et nécessite une bonne connaissance du réseau trophique considéré (Ramade, 2007). Lorsque ce rapport est supérieur à 1, il y a **bioamplification** (appelée aussi biomagnification, Fig. 11).

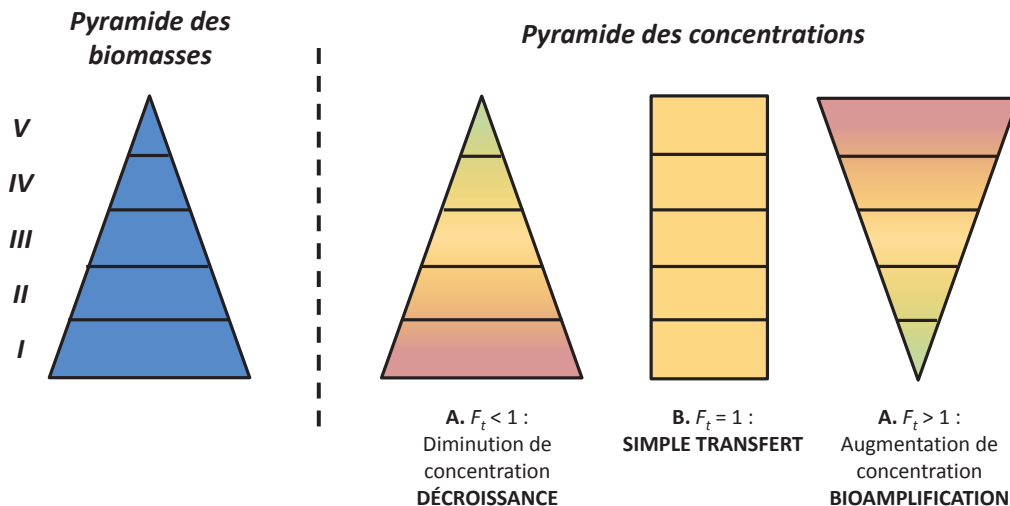


FIGURE 11 – Principaux types de pyramides des concentrations selon la valeur du facteur de transfert (F_t , d'après Ramade, 1977).

En plus d'être bioaccumulables, les PCB sont bioamplifiables : leur concentration augmente donc tout au long des réseaux trophiques (Fig. 12).

3.8.2 Le suivi des PCB dans l'environnement

Les PCB sont présents dans tous les compartiments de la biosphère, et une grande partie des êtres vivants y sont exposés (Safe, 1993; Van den Berg *et al.*, 2006). Cependant, le milieu aquatique en général (et marin en particulier, Fig. 13) est beaucoup plus contaminé que les autres.

De nombreuses études ont montré que les populations humaines les plus contaminées aux PCB étaient celles qui consommaient le plus de poissons (Schwartz *et al.*, 1983; Mendola *et al.*, 1995; Grimvall *et al.*, 1997; Hanrahan *et al.*, 1999; Weintraub et Birnbaum, 2008; Gobas et Arnot, 2010; Chovancová *et al.*, 2011; Fromberg *et al.*, 2011). En effet, comme pour de nombreux autres polluants, les PCB vont passer des continents à l'hydrosphère (Ramade, 1977; Rice *et al.*, 2002), s'adsorber sur des particules en suspension puis sédimenter lorsque que le courant ne permet plus de les transporter (dans les lacs, les mers ou les océans Hiraizumi *et al.*, 1979). Le milieu aquatique (et le milieu marin

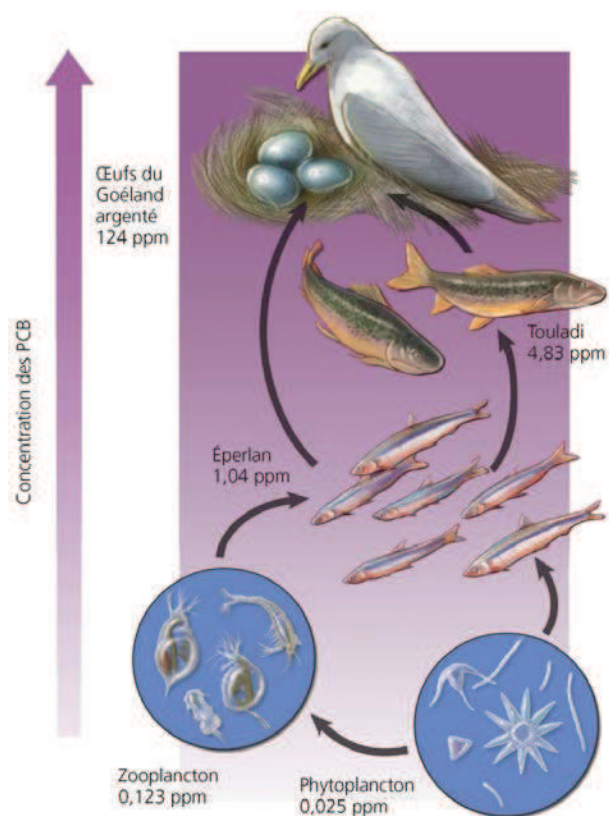


FIGURE 12 – Bioamplification des PCB : l'exemple des Grands Lacs canadiens, Campbell et Reece (2009).

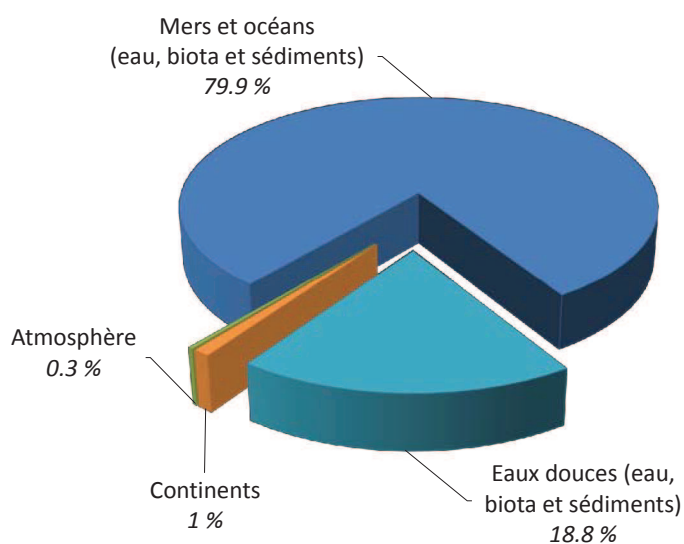


FIGURE 13 – Estimation de la distribution globale des PCB dans l'atmosphère, Rice *et al.* (2002).

en particulier) est donc un lieu privilégié pour le piégeage des PCB et leur concentration y est particulièrement suivie dans de nombreux pays (Duinker et Hillebrand, 1983; Guzzella *et al.*, 2005; Oliveira Ribeiro *et al.*, 2008; Pinto *et al.*, 2008; Gobas et Arnot, 2010). Ce suivi est généralement assuré en prélevant des individus ou du sédiment d'un milieu donné. Les techniques d'évaluation de l'état de contamination d'un milieu étant différentes d'un pays à l'autre, la cartographie des concentrations mondiales des PCB n'est pas réalisable. Il existe cependant de nouvelles techniques originales pour évaluer la toxicité potentielle de certains sites : une équipe de l'Université d'Agriculture et de Technologie de Tokyo a mis en place une technique d'évaluation de la quantité de PCB piégée dans les résidus de plastique du littoral japonais (Mato *et al.*, 2001). Étant donné que des billes de plastiques sont présentes dans la majorité des sédiments côtiers mondiaux et facilement transportables, cette équipe a pu utiliser cette technique à plus grande échelle afin d'estimer les différences de contamination qui pouvait exister entre les différents pays du globe (Ogata *et al.*, 2009, Fig. 14). Il apparaît sur cette carte que les plus importantes quantités de PCB sont mesurées dans les zones les plus fortement industrialisées.

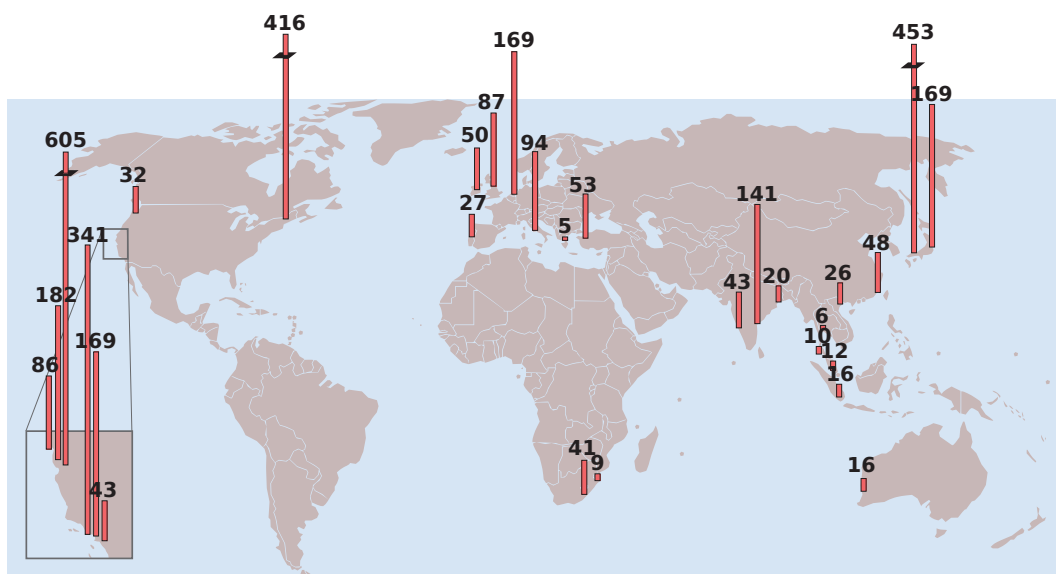


FIGURE 14 – Concentrations médianes de la somme de 13 congénères de PCBs (CB-66, 101, 110, 149, 118, 105, 153, 138, 128, 187, 180, 170, 206, valeurs exprimées en ng.g⁻¹) mesurées dans des billes de plastique du littoral (Ogata *et al.*, 2009).

En France, c'est le ROCCH¹ (ex-RNO²) qui permet de suivre la concentration environnementale de nombreuses molécules, dont les PCB, dans les bivalves depuis 1979 (Claisse, 1989).

1. Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du milieu marin
2. Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin

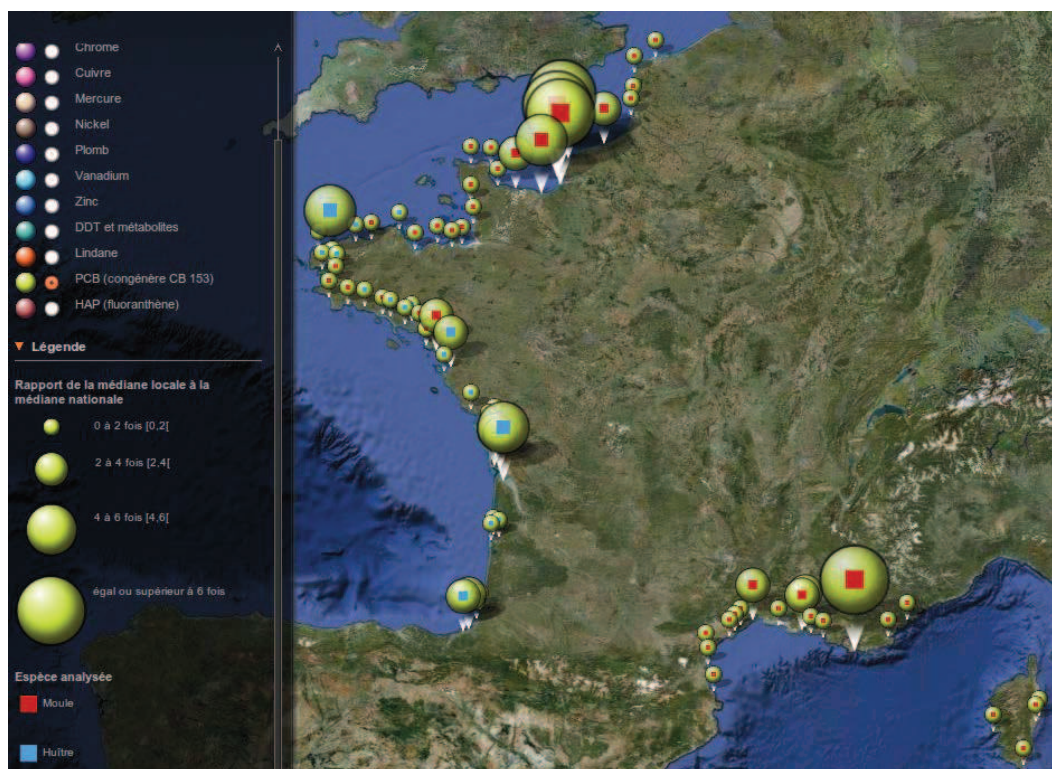


FIGURE 15 – Cartographie des PCB sur le littoral français entre 2003 et 2007. Source : [Ifremer Environnement](#), d'après les données du ROCCH. Les symboles **rouge** représentent la concentration de CB-153 mesurée dans les moules et les symboles **bleu** représentent la concentration de CB-153 mesurée dans les huîtres. Les disques représentent des taux de concentration de la médiane locale respectivement égaux à : 0 à 2 fois, 2 à 4 fois, 4 à 6 fois et plus de 6 fois la médiane nationale ($20.9 \mu\text{g.kg}^1$).

Sur le littoral français, c'est essentiellement la baie de Seine qui est touchée par la contamination aux PCB (plus de six fois la concentration médiane nationale). La pointe de la Bretagne ainsi que le bassin d'Arcachon sont aussi touchés, mais dans une moindre mesure (concentrations égales à deux à quatre fois la médiane nationale). En Méditerranée, la frange littorale entre Montpellier et Marseille est légèrement impactée par cette pollution (concentrations égales à deux à quatre fois la concentration médiane nationale) alors que Toulon semble plus touchée (plus de 6 fois la médiane nationale).

Les zones les plus industrialisées (comme la baie de Seine) présentent les quantités de PCB les plus importantes. Dans le cas des pertuis Charentais, un rapport récent montre que les PCB sont bien présents dans les sédiments, même s'ils ont été retrouvés en faibles quantités par rapport à l'ensemble du littoral français : leur quantité est comparable à celle de l'estuaire de la Vilaine (c'est-à-dire 8 à 12 fois moins que dans l'estuaire de Seine [Biais et al., 2010](#)). Les taux de PCB retrouvés dans les soles sont eux aussi comparables à ceux

retrouvés dans celle de l'estuaire de la Vilaine, avec toutefois un profil de contamination plus élevés chez les individus du pertuis d'Antioche par rapport à ceux du pertuis Breton (Biais *et al.*, 2010).

3.9 Influence des PCB sur la physiologie et le comportement des poissons

3.9.1 Généralités

Les poissons sont des animaux **poikilothermes**, et donc par définition dépendants de la température, mais aussi d'autres conditions environnementales telles que la salinité, le pH, l'oxygène dissous, etc. Toute perturbation environnementale peut donc jouer un rôle important dans l'équilibre physiologique des poissons (Scott et Sloman, 2004). La Fig. 16 montre la succession d'étapes et les différentes échelles de réponse d'un organisme à une perturbation environnementale.

La réponse comportementale peut intervenir soit directement après la perception de la perturbation par un centre nerveux (par exemple lors de la réponse de fuite d'un poisson dès qu'un oiseau touche la surface de l'eau), soit au moment de la réponse physiologique (par exemple, l'augmentation de la locomotion lors d'un pic de cortisol). Slobodkin et Rapoport (1974, figure originale présentée en Fig. 65, Annexe A, p. 215) placent le comportement comme premier niveau de réponse avant la physiologie. Cependant, il ne peut y avoir de comportement en réponse à une perturbation sans sa perception, et c'est ce que montre la partie de droite de la Fig. 16 (tirée de Scott et Sloman, 2004). Le comportement a en effet la particularité de pouvoir exprimer différents types de réponse, allant du réflexe (en lien direct avec le système nerveux, comme la réponse de fuite), à une réponse très intégrée, résultant d'une réelle stratégie (comme la migration ou la parade nuptiale). Le système nerveux, la physiologie et le comportement forment donc un ensemble dans lequel il existe de nombreuses passerelles.

D'un côté, le comportement joue un rôle essentiel car il peut à tout moment rompre la cascade de réactions présentée en Fig. 16. En effet, en présence d'une perturbation environnementale distante, une stratégie comportementale essentielle est l'**évitement**. Si le danger n'a pas pu être anticipé (car trop soudain ou non perceptible à distance) il reste la possibilité de choisir la **fuite**. Ces deux stratégies comportementales (évitement et fuite) sont des éléments essentiels dans la survie d'un individu car elles permettent de potentiellement retrouver l'état environnemental initial auquel l'individu est adapté. Les individus les plus à même d'éviter ou de fuir le danger pourront survivre plus facilement et assurer la survie de l'espèce (comportement à haute valeur de survie, selon Tinbergen, 1963).

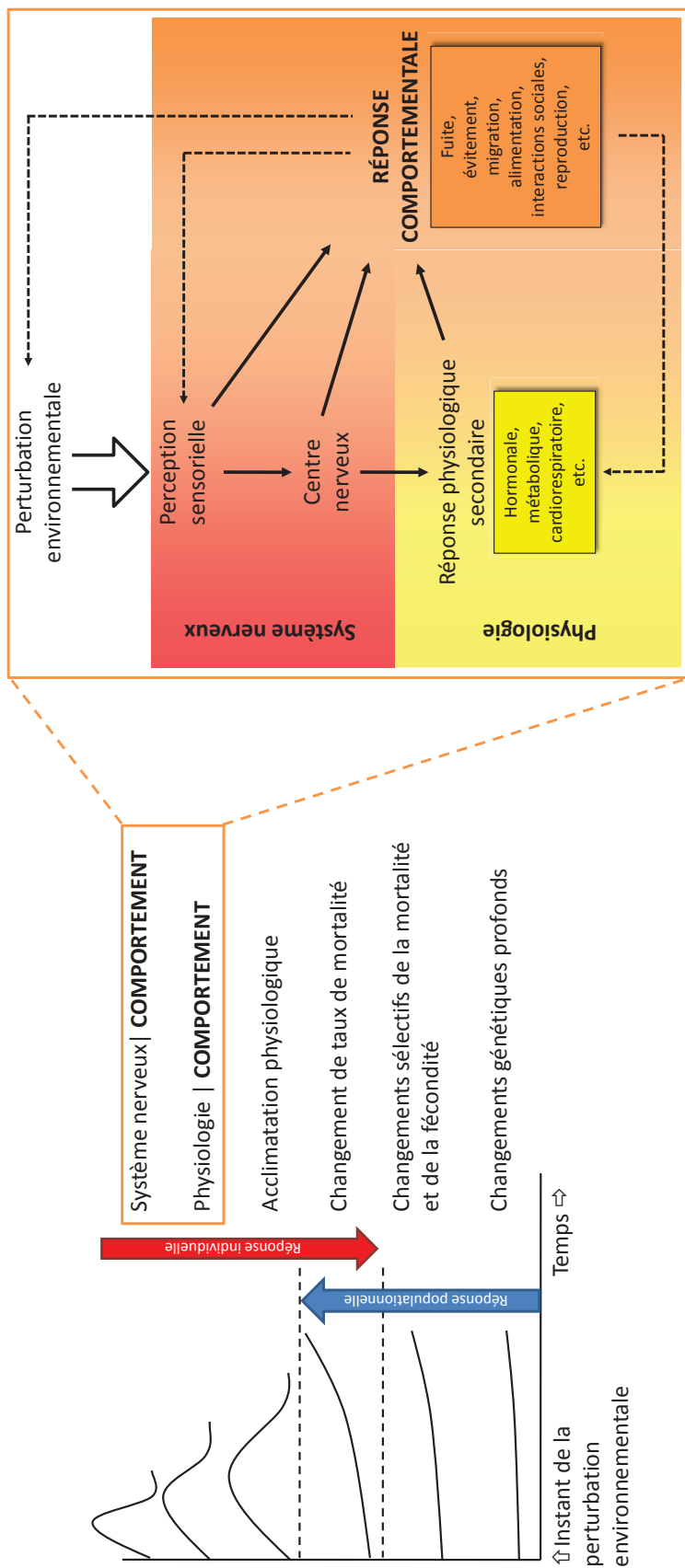


FIGURE 16 – Représentation schématique et simplifiée des réponses à une perturbation environnementale ; adapté de Slobodkin et Rapoport (1974) et Scott et Sloman (2004)

D'un autre côté, la capacité de réaliser la **réponse comportementale** appropriée dépend de l'**état physiologique** de l'individu : une réponse telle que la fuite ou l'évitement engendre des coûts métaboliques que seuls les individus dans un état physiologique adéquat, c'est-à-dire ayant une réserve d'énergie à allouer à cette activité, peuvent assurer (Domenici *et al.*, 2007; Claireaux et Lefrançois, 2007).

Dans le cas d'une faible perturbation environnementale, la stratégie la moins coûteuse consiste à rester dans l'environnement perturbé, afin de s'acclimater. Suite à l'acclimatation physiologique, la stratégie comportementale peut être modifiée, comme par exemple réduire les activités coûteuses en énergie telles que la recherche de nourriture ou la reproduction quand les conditions de température ou d'oxygène sont moins favorables.

Dans le cas de substances chimiques présentes dans l'environnement (comme les polluants), les questions de fuite et d'évitement sont plus complexes. En effet, beaucoup d'entre elles ne sont pas perceptibles par les organismes vivants et la cascade de réactions physiologiques en réponse au xénobiotique va démarrer. La balance physiologique va être déséquilibrée et les capacités physiologiques et comportementales vont être toutes deux modifiées (Scott et Sloman, 2004). À défaut d'avoir pu percevoir la substance responsable de son changement d'état, l'individu peut aussi réagir à ce déséquilibre, ce « *changement de perception de son état interne* » décrit par Barnard (2004), et le compenser avec une réponse comportementale appropriée, voire une stratégie alternative d'urgence (Elliott *et al.*, 2007).

Or, toute perturbation physiologique et/ou comportementale peut avoir des répercussions importantes sur les fonctions locomotrices (Little et Finger, 1990; Schmidt *et al.*, 2005), alimentaires (Jørgensen *et al.*, 1999), reproductrices (Örn *et al.*, 1998; Daouk *et al.*, 2011) et sociales (Ward *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*, 2005a), ce qui peut compromettre la survie des individus et donc des populations. Mais ce changement d'échelle des individus aux populations (puis aux communautés) reste encore difficile à établir en écotoxicologie (Hinton *et al.*, 2005) et l'étude du comportement pourrait en être l'une des clés en passant de l'unité « individu » au « groupe ».

3.9.2 Effets des PCB

Lorsqu'ils sont présents dans un organisme, les PCB sont présents dans tous les tissus, mais leur quantité est plus importante dans ceux contenant relativement plus de lipides et selon les congénères (certains sont métabolisables) le transport et le stockage dans les organes diffèrent (Boon et Duinker, 1985; Monosson *et al.*, 2003). Une fois dans le cytoplasme, vont se fixer au récepteur Aryl hydrocarbure (Ah). L'association dioxine-Ah va ensuite entrer dans le noyau cellulaire et induire une production anormale de protéines : ce phénomène constitue la réponse toxique.

Chez les poissons, les PCB ont un effet :

- négatif sur la maturation des oocytes (Örn *et al.*, 1998; Monosson *et al.*, 1994; Khan et Thomas, 2006; Foekema *et al.*, 2008; Daouk *et al.*, 2011)
- négatif sur la fonction hépatique (Celander et Förlin, 1995; Örn *et al.*, 1998)
- négatif sur la fonction rénale (Blom et Förlin, 1997; Quabius *et al.*, 1997)
- négatif sur la synthèse de cortisol (Quabius *et al.*, 1997)
- perturbateur du système endocrinien (Buckman *et al.*, 2007)

Des résultats similaires ont été obtenus chez le rat (Collins et Capen, 1980; Parkinson *et al.*, 1980; Holene *et al.*, 1998; Hany *et al.*, 1999; Crofton *et al.*, 2000; Cocchi *et al.*, 2009; Colciago *et al.*, 2009) les primates (Collins et Capen, 1980; Ahmad *et al.*, 2003; Baldrige *et al.*, 2003) et l'Homme (Fromberg *et al.*, 2011; Schell *et al.*, 2008).

Concernant la croissance, les résultats divergent. En effet, alors que Bengtsson (1980) et Lyche *et al.* (2010) ont montré une augmentation du poids, qu'ils expliquent par une altération du système endocrinien, Örn *et al.* (1998) ont montré une diminution significative chez les groupes de poissons zèbres contaminés alors que Daouk *et al.* (2011) n'ont pas montré de variation de poids entre les groupes. De même, une récente revue sur les perturbateurs endocriniens responsables d'obésité chez l'Homme (Tang-Péronard *et al.*, 2011) explique que les PCB peuvent jouer un rôle sous certaines conditions, telles que le type de congénère, la dose, la durée et le moment de l'exposition. Dans tous les cas, les troubles de surpoids, s'ils apparaissent, semblent être plus prononcés chez les femelles/femmes (Bengtsson, 1980; Tang-Péronard *et al.*, 2011).

Lors des stades précoces, les PCB :

- provoquent des **malformations** (Billsson *et al.*, 1998; Olsson *et al.*, 1999);
- perturbent la **cardiogénèse** (endocarde et myocarde, Grimes *et al.*, 2008);
- augmentent la **mortalité** (Billsson *et al.*, 1998; Foekema *et al.*, 2008; Olsson *et al.*, 1999; Westerlund *et al.*, 2000).

Les PCB semblent perturber le fonctionnement du système nerveux chez les poissons, mais pas sa structure (Grimes *et al.*, 2008). Ces résultats concordent avec des études faites sur de jeunes enfants, où les PCB ont montré un effet sur les capacités mentales entre deux et quatre semaines mais pas sur le développement moteur ou la mémorisation à sept mois (Winneke *et al.*, 1998).

L'étude des effets d'une contamination aux PCB sur un comportement donné est encore rare. Chez les poissons, il a cependant été mis en évidence que les PCB altéraient le comportement natatoire (Triebkorn *et al.*, 1997; Nakayama *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 2005) et la formation en banc (Nakayama *et al.*, 2005a). Les résultats de cette dernière étude montrent clairement un effet des PCB sur la nage en groupe de medaka (chez des groupes de six individus contaminés ou des groupes mélangés composés de trois indivi-

du contaminés et trois individus non contaminés) et les hypothèses des auteurs sur cette différence seraient :

- un **comportement hyperactif** ;
- une altération du système latéral et/ou visuel menant à une **mauvaise cohésion des individus contaminés dans le groupe**.

La première hypothèse concorde avec les premiers travaux de cette équipe (Nakayama *et al.*, 2004) ainsi que d'autres notamment chez le rat (Bushnell et Rice, 1999; Holene *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 2001; Vitalone *et al.*, 2008) et l'Homme (Chen *et al.*, 1994; Banerjee *et al.*, 2007). La seconde hypothèse n'a quant à elle été confirmée par aucune autre étude. De plus, une altération de la nage en banc est trop souvent associée à une altération du système visuel et/ou latéral alors qu'un grand nombre d'autres facteurs peuvent jouer sur ce comportement en groupe, allant du parasitisme (Barber *et al.*, 2000), aux relations inter-individuelles (individus familiers ou non) (Barber et Wright, 2001; Frommen *et al.*, 2007) ou la communication chimique (Keenleyside, 1955; Brown et Smith, 1994; Ward *et al.*, 2002). Dans l'étude de Nakayama *et al.* (2005a), l'hypothèse d'une hyperactivité des poissons contaminés permettrait d'expliquer l'altération du comportement en groupe et semble être l'hypothèse la plus plausible à retenir. Bien que l'effet hyperactif des PCB ait été démontré chez plusieurs espèces, les mécanismes physiologiques menant à cet état ne sont pas encore connus (Banerjee *et al.*, 2007; Holene *et al.*, 1998), mais semble s'exacerber en présence de contaminants métalliques tels que le mercure ou l'étain (Grandjean *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2005) et vraisemblablement impliquer la voie dopaminergique.

Ces travaux de thèse vont chercher à identifier les effets des PCB après une contamination par voie alimentaire chez deux espèces de poisson : la sole commune et le poisson zèbre. La partie suivante présente les deux espèces ainsi que les comportements potentiellement intéressants à analyser dans le cas d'une étude toxicologique.

4 Présentation de la thèse

4.10 Description et intérêt éthologique des espèces étudiées

4.10.1 La sole commune *Solea solea*

4.10.1.1 Historique et généralités à propos de la sole commune



FIGURE 17 – Photo de la sole commune, *Solea solea*. Source : [Biopix](#) – Photo : JC Schou.

La **sole commune** (*Solea solea*, Linnaeus, 1758, Fig. 17) est un **téléostéen** appartenant à l'ordre des **Pleuronectiformes** et à la famille des **Soléidées**. Elle est présente essentiellement sur les **côtes atlantiques** européennes et nord-africaines ainsi qu'en **Méditerranée** ([Cabral et Costa, 1999](#), Fig. 18). Comme la plupart des poissons plats, c'est une espèce **benthique** (qui vit au fond de la masse d'eau) qui préfère les zones côtières estuariennes aux fonds sableux ou vaseux ([Koutsikopoulos et al., 1989](#); [Rogers, 1992](#); [Le Pape et al., 2003](#)). Elle représente un intérêt économique majeur dans le Golfe de Gascogne ([Amara et al., 1998](#); [Gilliers et al., 2006](#)).

La sole est une espèce migratrice qui effectue essentiellement ses déplacements entre les frayères et les nurseries au niveau du plateau continental, préférentiellement en zones estuariennes dans certaines zones géographiques ([Greer Walker et Emerson, 1990](#); [Rijnsdorp et al., 1992](#)).



FIGURE 18 – Répartition mondiale de la sole commune *Solea solea*. Source du fond de carte : [Wikimedia Commons](#) – Crédits du fond de carte : Brianski / Sources des données : [Fish Base](#).

De nos jours, les études scientifiques effectuées sur cette espèce concernent des questions relatives à la gestion des stocks ([Dorel et al., 1991](#); [Amara et al., 1994, 2000](#); [De Pontual et al., 2000](#)) mais aussi les problèmes relatifs à son élevage aquacole ([Howell, 1997](#); [Imsland et al., 2003](#); [Cañavate et al., 2006](#); [Reig et al., 2010](#)). Même si certaines études ont été faites concernant le statut toxicologique de cette espèce largement consommée ([Boon et al., 1984](#); [Boon et Duinker, 1985](#); [Budzinski et al., 2004](#); [Costa et al., 2008](#); [Barhoumi et al., 2009](#); [Costa et al., 2009](#)), seuls quelques travaux récents se sont concentrés sur les implications concrètes des polluants sur sa physiologie ou sa morphologie ([Claireaux et al., 2004](#); [Davoodi et Claireaux, 2007](#); [Eichinger et al., 2010](#); [Foekema et al., 2008](#); [Wessel et al., 2010](#)). Aucun article ne traite des effets des PCB sur le comportement de la sole. Pourtant, les espèces au mode de vie benthique, comme la sole, vivent bien souvent au contact de sédiments contaminés, même faiblement dans le cas des pertuis Charentais ([Biais et al., 2010](#)), et peuvent présenter des taux de contaminations souvent supérieurs à ceux des autres espèces ([Schafer et al., 1982](#); [Cossa et al., 1992](#); [Moles et Norcross, 1995](#); [Loizeau et Abarnou, 1994](#); [Eichinger et al., 2010](#)).

4.10.1.2 Le développement et les différents comportements naturels de la sole

Comme l'ensemble des Pleuronectiformes, la sole est un poisson qui va subir un aplatissement dit « secondaire » : c'est après une métamorphose et la migration de l'œil gauche que le poisson va prendre cette forme. Le cycle de vie de la sole dépend de nombreux facteurs et peut donc considérablement varier d'une zone géographique à une autre ([Amara et al., 2000](#)). En effet, les conditions environnementales et climatiques influent à la fois sur les périodes de reproduction et la qualité des pontes ([Koutsikopoulos et Lacroix, 1992](#)).

Dans le golfe de Gascogne, la fraie peut se produire de janvier à avril, et se passe aux alentours de 50 à 100 m de profondeur dans des zones situées à 50 ou 75 km du littoral (Koutsikopoulos *et al.*, 1989). La saisonnalité de la reproduction présente un gradient Sud / Nord, de janvier dans le Sud du golfe de Gascogne à avril jusqu'à la Pointe de Bretagne (Arbault *et al.*, 1986).

Les jeunes larves vont tout d'abord être pélagiques (c'est-à-dire vivre dans la colonne d'eau) et dériver pendant un à deux mois vers le littoral pour rejoindre des zones de nourricerie où elles resteront au moins deux ans (Koutsikopoulos *et al.*, 1989), les conditions de température, salinité et de nutriments y étant optimales pour leur développement. C'est pendant la migration de la zone de frayère à la nourricerie que va se produire la métamorphose. Celle-ci dure en moyenne dix jours, mais le commencement est plus déterminé par la taille des individus (entre 7 et 10 mm) que par leur âge (Amara *et al.*, 2000).

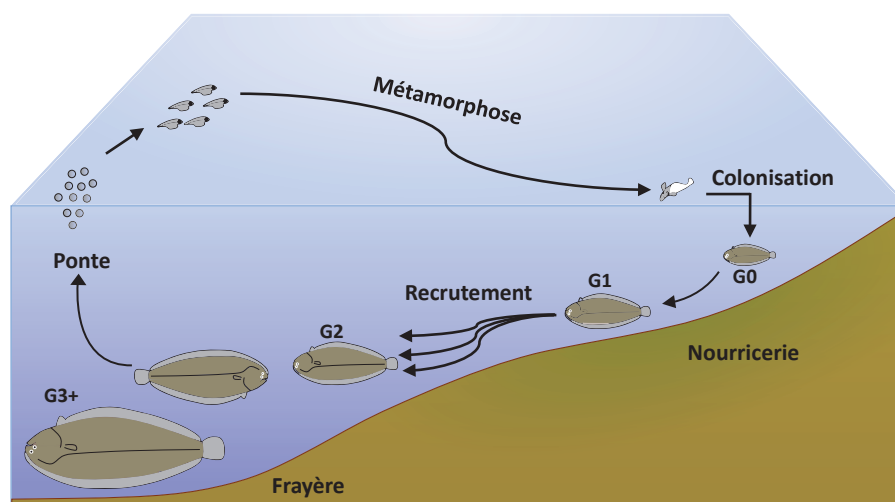


FIGURE 19 – Cycle de vie de la sole commune, *Solea solea*, d'après Durieux (2007). G0 : soles de moins d'un an ; G1 : soles âgées de un an ; G2 : soles âgées de deux ans ; G3+ : soles âgées de trois ans ou plus.

Du point de vue de l'éthologie, différents aspects comportementaux sont intéressants. Le premier est son activité locomotrice. En effet, cette espèce présente naturellement une activité locomotrice et alimentaire essentiellement nocturne qui peut cependant être épisodiquement diurne lorsque les opportunités de marées sont plus propices le jour (Kruuk, 1963; Champalbert et Castelbon, 1989). Cette stratégie alimentaire implique une faible sollicitation du système visuel chez la sole pour la prédation, en sollicitant plutôt la chémoréception et la mécanoréception (de Groot *et al.*, 1969; Batty et Hoyt, 1995). En effet, chez la sole, le développement du système olfactif se produit très tôt (Appelbaum *et al.*, 1983) et la sole possède de très nombreux neuromastes sur la ligne latérale sur les deux faces : ceux de la face oculée serviront principalement à la détection de prédateurs alors

que ceux de la face aveugle permettront la détection des proies (Appelbaum et Schemmel, 1983; Harvey *et al.*, 1992). Ces deux systèmes sont donc particulièrement développés chez la sole, alors que le système visuel est généralement considéré comme peu performant dans la détection des proies et des prédateurs, à cause notamment de la faible taille des yeux de ce poisson par rapport à sa taille ainsi que leur position (Batty et Hoyt, 1995).

Un deuxième point particulièrement intéressant est l'étude des capacités cryptiques. En effet, la sole est un poisson qui adopte une stratégie mimétique avec son environnement en jouant sur deux paramètres (Ellis *et al.*, 1997) : l'enfouissement et la variation de pigmentation. L'enfouissement consiste en un mouvement coordonné des nageoires dorsales et anales permettant à la sole de créer un courant d'aspiration qui va la recouvrir d'une fine couche de sédiment, ne laissant apparaître que ses yeux, sa nageoire pectorale et sa bouche. Concernant la variation de pigmentation, celle-ci est possible grâce à des mécanismes bien distincts. Bien qu'il soit peu performant pour la prédation (qui donc principalement est nocturne), le système visuel semble donc être plus sollicité en journée pour la détection globale de l'environnement (ce qui demande de moindres capacités visuelles), et l'adaptation de la pigmentation en fonction des perceptions visuelles. En effet, la face oculée des poissons plats possède des chromatophores qui peuvent se spécialiser en différents type de cellules (Bolker et Hill, 2000; Burton, 2002) :

- les mélanophores, qui vont produire la tyrosine kinase, l'enzyme responsable de la production de mélanine et donc de pigments noirs ;
- les xanthophores et les erythrophores, qui produisent des pigments jaune-orange à partir de composés caroténoïdes ;
- les iridiophores, qui apparaissent blancs ou argentés car les inclusions de guanine disperse la lumière (ce sont eux qui composent la couleur de la face aveugle).

Il y a deux niveaux de réponse lors d'un changement de couleur chez un poisson plat : le premier est rapide, par l'orientation des chromatophores, le second est plus lent, par synthèse de pigments pour s'assombrir ou arrêt de synthèse pour s'éclaircir (Ellis *et al.*, 1997).

Ces deux comportements, enfouissement et changement de couleur, vont naturellement lui permettre d'échapper aux prédateurs et peuvent être suivis en expérimentation en laboratoire (Ellis *et al.*, 1997).

Le dernier point, plus complexe à mettre en place, est le suivi de la reproduction. En effet, Baynes *et al.* (1994) ont décrit les séquences comportementales qui composaient la reproduction des soles. Cependant, ces travaux de thèses ne se sont focalisés que sur les réponses des juvéniles.

4.10.2 Le poisson zèbre *Danio rerio*

4.10.2.1 Historique et généralités à propos du poisson zèbre

Le **poisson zèbre** (Fig. 20) est un poisson originaire du Gange connu des occidentaux par sa description par Hamilton en 1822. C'est un **téléostéen** appartenant à l'ordre des **Cypriniformes** et à la famille des **cyprinidées**.



FIGURE 20 – Photo du poisson zèbre, *Danio rerio*. Source : [Wikimedia Commons](#) – Photo : Azul.

La distribution naturelle du poisson zèbre est essentiellement dans les pays situés autour du Gange, c'est-à-dire l'Inde, le Népal, le Bangladesh et la Birmanie ([Engeszer et al., 2007b](#); [Spence et al., 2008](#), Figure 21). Ce petit poisson tropical, qui peut atteindre 4 cm à l'âge adulte vit dans les eaux des rizières (d'où son nom *Danio*, qui vient du bengali *Dahni* qui signifie « de champs de riz ») dont la température peut varier entre 6 et 38 °C en fonction de la saison ([Spence et al., 2008](#)).

Le poisson zèbre a tout d'abord été très populaire en aquariophilie en tant que poisson d'ornement, notamment pour sa robustesse et sa facilité d'élevage qui ont fait que son cycle de vie a rapidement été maîtrisé ([Spence et al., 2008](#)). À ce premier avantage se sont ajoutés d'autres, qui ont permis à cette espèce d'émerger dans le milieu de la recherche biomédicale ([Spence et al., 2008](#); [Engeszer et al., 2007b](#); [Spence, 2011](#)) :

- un cycle de vie court (mature sexuellement à l'âge de trois mois en conditions optimales) ;
- un développement rapide (éclosion entre 48 et 72 hpf¹ environ) ;
- des œufs transparents ;
- une femelle peut pondre plusieurs centaines d'œufs par ponte (une ponte par semaine pendant au moins un an) ;
- pas de saisonnalité pour la reproduction (quand ils sont maintenus entre 26 et 28 °C) ;

Pour maintenir un élevage dans de bonnes conditions et obtenir des pontes toute l'année, il est cependant nécessaire de respecter un certain nombre d'exigences de l'espèce,

1. hpf : heures *post*-fécondation.



FIGURE 21 – Répartition géographique du poisson zèbre *Danio rerio* ; les points bleus représentent les emplacements où l'espèce a été recensée. Source du fond de carte : [Wikimedia Commons](#) – Crédits fonds de carte : Brianski (monde) et Uwe Dederig (Inde) / Sources des données : [Spence et al., 2008](#).

que ce soit en termes de température, photopériode, qualité d'eau, densité d'élevage, etc. Cependant, ces paramètres sont assez simples à respecter et peuvent être satisfaits pour des coûts d'élevage peu élevés comparés à d'autres espèces ([Spence et al., 2008](#)).

En 1996, le résultat de travaux conjoints de plusieurs équipes ont été publiés dans un numéro spécial du journal *Development* contenant 37 articles décrivant plusieurs centaines de mutations obtenues chez le *Danio rerio* (pour revue [Haffter et al., 1996](#)). Dans le même temps, l'établissement de la carte génétique du poisson zèbre a été entreprise ([Postlethwait et al., 1994](#); [Shimoda et al., 1999](#)). Suite aux possibilités offertes par ce vertébré, de nombreux domaines ont alors adopté cette espèce comme modèle, comme par exemple la physiologie (pour revue [Briggs, 2002](#)), la neurophysiologie ([Fleisch et Neuhauss, 2006](#); [Fetcho et al., 2008](#)), le comportement ([Gerlai, 2003](#); [Miklósi et Andrew,](#)

2006), ou se servent de cette espèce comme modèle de vertébré pour la recherche médicale (Dooley et Zon, 2000; Lieschke et Currie, 2007). C'est donc naturellement que cette espèce est maintenant couramment utilisée en toxicologie et neurotoxicologie disciplines auxquelles le poisson zèbre apporte à la fois des caractéristiques biologiques et des outils adaptés à la caractérisation de mécanismes moléculaires (Gerlai *et al.*, 2000; Linney *et al.*, 2004; Zon et Peterson, 2005; Deo et MacRae, 2010; Mathur et Guo, 2010).

4.10.2.2 Cycle de vie du poisson zèbre et études comportementales

L'un des grands atouts du poisson zèbre est la rapidité de son développement et son cycle de vie relativement court en général (Fig. 22). En effet, placé à 28 °C, un embryon aura atteint le stade 1024 cellules en trois heures, puis le stade sphère quatre heures après la fécondation. Après 16 hpf, le stade 14 somites est atteint et à 24 hpf le plan corporel est déjà établi. À 48 hpf, l'oeuf est prêt à éclore. Comme celui-ci est parfaitement transparent, l'ensemble de ces étapes peuvent être contrôlées et suivies par simple observation à la loupe binoculaire ou au microscope optique (Hill *et al.*, 2005). Ceci permet d'observer les éventuels retards de développement ou malformations sans altérer l'intégrité physique de l'embryon, et donc sa survie (Hill *et al.*, 2005). Entre 48 et 72 hpf, l'œuf éclot et l'embryon devient une larve nageuse qui, jusqu'à 120 hpf, ne vit que sur ses réserves vitellines (Parichy *et al.*, 2009). Ce n'est qu'à partir de 120 hpf que la bouche va s'ouvrir, ce qui permettra le début de l'alimentation exogène.

Même si les réserves vitellines permettent aux larves de survivre pendant 13 jours en moyenne sans s'alimenter (Örn *et al.*, 1998), pour pouvoir croître et continuer de se développer correctement, la larve va devoir se nourrir rapidement. Ceci nécessite de pouvoir se déplacer de manière orientée vers la proie et la capturer, ce qui implique d'avoir un système sensoriel fonctionnel.

D'une manière générale, les premiers neurones se forment autour de 16 hpf (Metcalf *et al.*, 1990). Le système visuel va quant à lui se développer autour de 72 hpf (Easter et Nicola, 1996). À cet âge là, les larves vont déjà s'orienter en fonction de la lumière (Fleisch et Neuhauss, 2006). Cependant, les mouvements oculaires ainsi que la rétine ne vont réellement se mettre en place qu'entre 96 et 120 hpf, avec une vision identique à celle de l'adulte à 120 hpf (Easter et Nicola, 1997; Fleisch et Neuhauss, 2006). Ainsi, une réponse comportementale à un stimulus visuel simple (comme un changement de lumière) peut être mis en place dès 72 hpf (Easter et Nicola, 1997; Fleisch et Neuhauss, 2006).

Le système olfactif commence à se mettre en place entre 17 et 18 hpf, est connecté au système nerveux à 22 hpf et l'ouverture du nez se fait à 32 hpf (Whitlock et Westerfield, 2000). Enfin, les cellules de Mauthner (indispensables pour les réponses anti-prédateur par

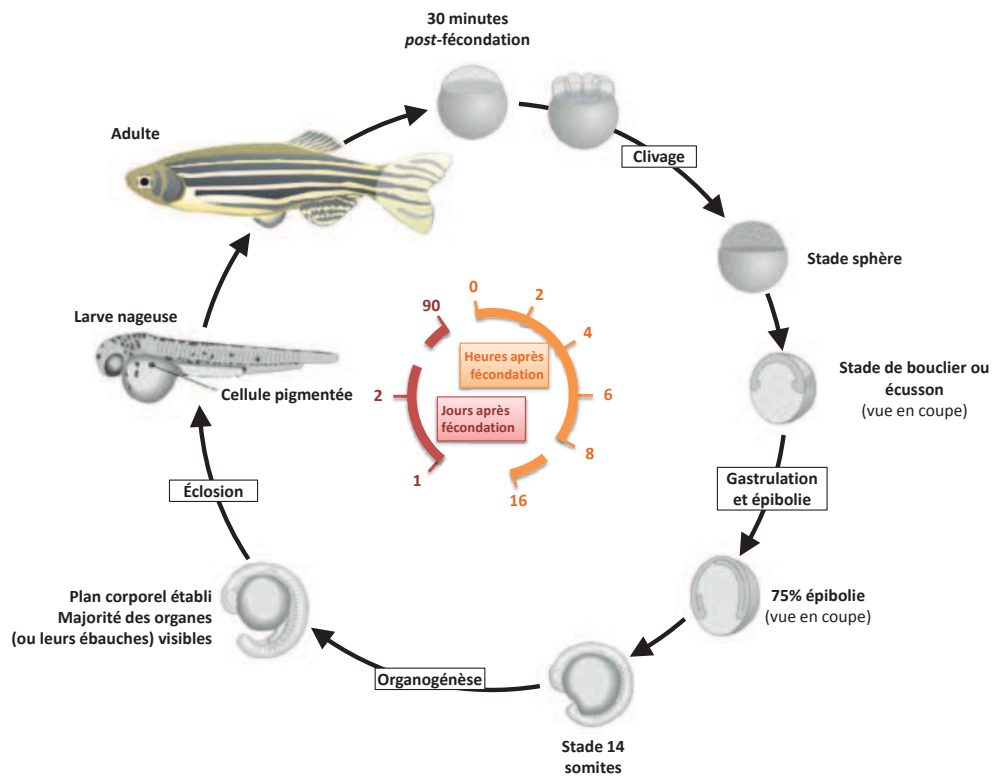


FIGURE 22 – Cycle de vie du poisson zèbre, *Danio rerio*, traduit de Wolpert *et al.* (1997).

stimulation mécano-acoustique) ainsi que le système auditif sont respectivement fonctionnels au quatrième jour (96 hpf, Eaton et Farley, 1973) et cinquième jour de développement (120 hpf, Zeddies et Fay, 2005). Au moment de l'ouverture de la bouche au cinquième jour, l'ensemble des systèmes visuels, olfactifs, auditifs, ainsi que les cellules de Mauthner sont donc normalement parfaitement fonctionnels. Des tests de réponse comportementale à des stimuli visuels, mécano-acoustiques ou olfactifs peuvent donc être mis en place à cet âge afin de vérifier l'intégrité des systèmes sensoriels. Ces tests peuvent être par exemple un suivi de la modification de la locomotion, qui devient coordonnées à 120 hpf (Ali *et al.*, 2011), en réponse à un stimulus ou encore un suivi du comportement alimentaire. La ligne latérale va quant à elle se mettre en place entre le deuxième jour (48 hpf), à partir duquel des tests de réaction comportementale (réponse de fuite) peuvent être mis en place en touchant directement la ligne latérale (Abe *et al.*, 2011), et le 22^e jour (Müller et van Leeuwen, 2004). Une fois fonctionnelle, c'est la ligne latérale qui permettra (avec le système visuel) d'assurer une bonne cohésion lors de la nage en groupe ou en banc polarisé.

La rythmicité circadienne (par exemple l'activité locomotrice) n'est robuste qu'au bout de 10 à 15 jours après fécondation, mais la mise en place commence dès les 96 premières

heures de développement : une absence de lumière ou une lumière constante à 14 hpf induit des arythmies (Pando et Sassone-Corsi, 2002). Au-delà de 15 jours, des expériences plus complexes d'étude des rythmes locomoteurs ou alimentaires sont donc envisageables et ont été décrits par del Pozo *et al.* (2011).

À partir de trois mois, les juvéniles de poissons zèbre sont matures sexuellement et donc capables de se reproduire. La reproduction chez le poisson zèbre est aussi un comportement intéressant car elle est composée de dix étapes successives qui doivent toutes être accomplies pour assurer le succès reproducteur (pour revue, Darrow et Harris, 2004). Darrow et Harris (2004) précisent cependant que ce comportement est très complexe à détailler car les étapes sont très rapides. Les rythmes reproducteurs ont quant à eux été décrits. Les pics de reproduction ont lieu 3 h après l'allumage des lumières Blanco-Vives et Sánchez-Vázquez (2009).

De nombreux tests ont aussi été adaptés d'expériences réalisées sur les souris, par exemple l'utilisation de bassins expérimentaux en forme de T pour effectuer des tests de choix (Champagne *et al.*, 2010). Ces bassins peuvent servir à tester le comportement exploratoire des individus ou servir de tests de cognition en répétant les passages pour chaque individu. En effet, juvéniles et adultes de poissons zèbre sont capables de mémoire associative (Sison et Gerlai, 2010; Gould, 2011). Il est ainsi possible de mettre en place des tests d'apprentissage en associant une zone spatiale à une récompense alimentaire (Ninkovic et Bally-Cuif, 2006), ou une couleur à une récompense (Colwill *et al.*, 2005). Ces tests peuvent s'avérer utiles pour mesurer une altération du système nerveux central.

4.11 Objectifs de la thèse et présentation du manuscrit

Les objectifs de cette thèse sont d'utiliser l'étude de plusieurs comportements afin d'analyser les effets des PCB sur des juvéniles de sole et des adultes de poissons zèbres contaminés par voie trophique, ainsi que sur des larves et des adultes de poissons zèbre contaminés par voie maternelle. Les questions auxquelles cette thèse devra répondre sont donc :


- Quels sont les outils à mettre en place ?
- Existe-t-il un effet des PCB sur le comportement de juvéniles de soles et d'adultes de poissons zèbre contaminés à doses environnementales par voie trophique ?
- Existe-t-il un effet transgénérationnel des PCB ? Observe-t-on des effets des PCB chez une génération fille de poissons zèbres issue de géniteurs contaminés ?

Pour répondre à ces différentes questions, plusieurs études ont été menées tout au long de cette thèse, en se basant sur l'étude de différentes variables comportementales adaptées

au modèle considéré. Les différentes études présentées dans ce manuscrit ont été divisées en deux parties distinctes, selon le plan suivant :

- la **Première partie** vise à détailler les techniques utilisées, ainsi que les outils et protocoles mis en place, selon la structure suivante :
 1. le **Chapitre 1** présente les différentes solutions logicielles de *video tracking* existantes et détaille le fonctionnement du logiciel Ethovision utilisé pendant cette thèse ;
 2. le **Chapitre 2** détaille le fonctionnement du logiciel ODRec (Observational Data RECorder) conçu pendant cette thèse pour le codage de variables comportementales à partir de vidéos, ainsi que de *HeatMap From Stack*, un *plugin* pour le logiciel ImageJ mis en place au cours de cette thèse permettant l'analyse de la répartition spatiale d'individus en groupe ;
 3. le **Chapitre 3** présente la technique de marquage par nano-tags RFID pour le poisson zèbre, et qui a par la suite aussi été utilisé pour la sole commune ;
- la **Deuxième partie** vise à analyser les effets des PCB sur le comportement de la sole commune et du poisson zèbre grâce aux outils présentés dans la première partie, selon la structure suivante :
 1. le **Chapitre 4** présente les différentes expériences réalisées pour évaluer les effets des PCB sur le modèle sole commune après 30 et 60 j de contamination. Les variables comportementales étudiées pendant ces expériences sont l'activité de nage pendant 23 h, la réponse à un challenge d'enfouissement sur fond sableux, ainsi que les capacités d'homochromie sur fonds clairs ou sombres. D'autres variables ont été mesurées comme le poids, le taux de croissance spécifique, l'indice de condition de Fulton, ainsi que la concentration en PCB mesurée dans le muscle ;
 2. le **Chapitre 5** porte sur les effets des PCB sur le comportement locomoteur (activité de nage pendant 23 h et exploration) et sur un challenge de choix de couleur de fond sur une première génération de poisson zèbre contaminée par voie alimentaire pendant 250 j ;
 3. le **Chapitre 6** se focalise sur les effets en seconde génération d'une contamination aux PCB, en étudiant le comportement de larves de poissons zèbres issues des géniteurs contaminés testés dans le Chapitre 5. La locomotion de ces larves contaminées par voie maternelle a été suivie lors d'un challenge lumineux (dont la mise en place est détaillée dans la Première Partie). Ces poissons ont été élevés à l'aliment commercial non contaminé, puis testés à nouveau au stade adulte, le comportement locomoteur a été suivi pendant 24 h en vue zénithale, ainsi qu'en vue frontale afin d'étudier leur répartition horizontale et verticale.

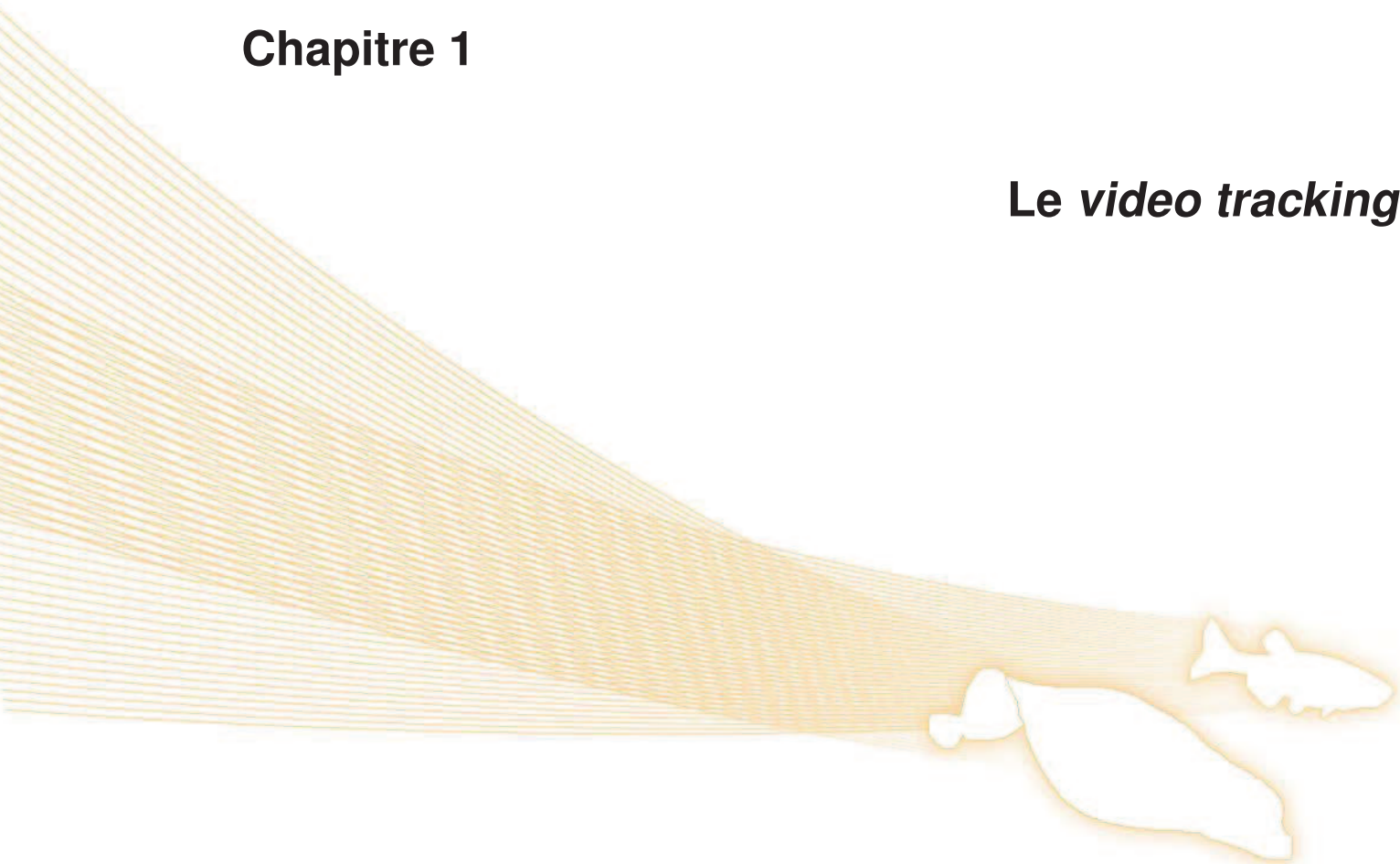
Enfin les parties **Discussion générale** et **Conclusions et perspectives** présenteront une synthèse de l'ensemble des résultats obtenus, en les replaçant dans le contexte écologique actuel.

The background features a series of thin, light-colored wavy lines that create a sense of movement and depth, curving across the middle of the page.

Première partie
Présentation de la méthodologie et
des outils mis en place

Chapitre 1

Le video tracking



L'objectif de ce chapitre n'est pas d'entrer dans les détails complexes du fonctionnement des logiciels de *video tracking* automatiques, mais de présenter de manière simple (mais néanmoins complète) les solutions existantes ainsi que celle retenue : le logiciel *Ethovision XT*[®] (Noldus, The Netherlands). Cette présentation permettra au lecteur de voir les possibilités ainsi que les contraintes techniques liées au *video tracking*, afin de mieux comprendre le choix de certaines expériences de ces travaux de thèse.

1.1 Les outils existants

Différents logiciels permettent de « suivre » un objet en mouvement. Ce suivi consiste en fait à identifier les objets d'intérêt, puis calculer et enregistrer leurs coordonnées pour chaque image d'une vidéo pour obtenir des mesures de distance parcourue, vitesse, etc. Ces logiciels n'ont cependant pas tous les mêmes possibilités, les mêmes coûts, le même fonctionnement. La première des choses qu'il convient de distinguer est l'**automatisation**. En effet, il existe des logiciels qui permettent de réaliser le suivi d'objet de différentes manières :

- **manuelle** : l'observateur devra lui-même cliquer sur les objets à suivre. Le logiciel permettra quant à lui de collecter les coordonnées sous forme de tableau. De nos jours, ces logiciels sont bien souvent gratuits (par exemple, le *plugin*¹ *Manual Track* du logiciel ImageJ, tous deux gratuits et *open source*²);
- **automatique** : grâce à différents algorithmes de traitement de l'image, le logiciel va pouvoir isoler et déterminer les coordonnées des objets dans l'image de manière autonome. Il existe deux types de logiciels de *video tracking* automatiques :
 1. ceux dits *single-object* : ils sont capables de suivre un seul objet par arène³ ;
 2. ceux dits *multi-object* : ils sont capables de suivre plusieurs objets par arène ;

Au-delà du coût et de la capacité à pouvoir suivre un ou plusieurs individus, d'autres notions peuvent aussi être importantes pour l'utilisateur du point de vue de l'ergonomie du logiciel. Par exemple :

- le logiciel nécessite-t-il une formation importante pour la mise en place / l'utilisation ?
- l'utilisateur peut-il manuellement corriger les *tracking* en cas d'erreur du logiciel ?
- le logiciel permet-il d'effectuer un suivi d'individu en temps réel ? Seulement depuis une vidéo enregistrée ? Les deux ?

1. Module d'extension logiciel qui complète un logiciel hôte pour lui apporter de nouvelles fonctionnalités

2. Désignation qui s'applique aux logiciels dont la licence respecte des critères précisément établis par l'*Open Source Initiative*, c'est-à-dire la possibilité de libre redistribution, d'accès au code source et aux travaux dérivés

3. Une arène est un espace délimité, fini, d'où les individus suivis ne peuvent pas sortir, comme un aquarium par exemple.

- les données obtenues sont-elles de simples coordonnées brutes ? Des coordonnées calibrées (c'est-à-dire exprimées dans une unité métrique et non en pixels) ? Des variables déjà calculées (vitesse, distance parcourue, etc.) ?

Le Tab. 1 résume les possibilités de différentes solutions testées durant ces trois ans de thèse. D'une manière générale, un grand nombre d'entre elles nécessite une certaine maîtrise avant de parvenir à des résultats concluants.

Tableau 1 – Comparaison des principales solutions logicielles de *video tracking* automatiques existantes.

Nom	Société et lien internet	Single- ou multi-object	Acquisition en temps réel	Corrections manuelles	Données exportées	Gratuit ou payant ¹
<i>Ethovision</i>	Noldus	Multi-object	Oui	Oui	Variabes calculées	Payant
<i>Danio Track</i>	Loligo	Multi-object	Oui	Non	Variabes calculées	Payant
<i>WINAnalyse</i>	Micromak	Multi-object	Non	Oui	Coordonnées calibrées	Payant
<i>Labtrack</i>	BioRAS	Multi-object	Non	Non	Coordonnées calibrées	Payant
<i>VideoTrack</i>	Viewpoint	Single-object ²	Oui	Non	Coordonnées calibrées	Payant
<i>SwissTrack</i>	École Fédérale Polytechnique de Lausanne	Multi-object	Non	Non	Données calibrées	Gratuit
<i>Biotracking</i>	Georgia Tech BORG Lab	Multi-object	Non	Non	Données calibrées	Gratuit
<i>ImageJ</i> ³	Wayne Rasband, National Institute of Health	Multi-object	Non	Non	Coordonnées calibrées	Gratuit
<i>CTrax</i>	California Institute or Technology ⁴	Multi-object	Non	Oui ⁵	Coordonnées calibrées	Gratuit ⁵

¹ Comme la plupart de ces logiciels ont des prix variables en fonction des options choisies à l'achat, les prix ne seront pas indiqués dans ce document.

² Permet cependant de suivre simultanément plusieurs arènes contenant chacune un individu.

³ Les *plugins ImageJ* permettant de suivre des individus sont *Mtrack2* (Nico Stuurman, Vale Lab, University of California, San Francisco), *Multi-tracker* (Jeffrey Kuhn, University of Texas, Austin), *ObjectTracker* (Wayne Rasband, National Institut of Health) et *ParticuleTracker* (Guy Levy et Janick Cardinale, MOSAIC Group, ETH Zurich).

⁴ Kristin Branson, Alice Robie, John Bender, Michael Dickinson, Pietro Perona.

⁵ La correction des trajectoires est possible grâce à *FixErrors Matlab GUI* qui nécessite une version de Matlab (payant) équivalente ou supérieure à 2008a. Une licence pour *Matlab Image Processing Toolbox* et *Matlab Statistics Toolbox* sont aussi nécessaires. La correction manuelle ne fonctionne que partiellement sur les équivalents gratuits de Matlab.

Pour ceux qui ne disposent pas de possibilité de corriger le *tracking* obtenu automatiquement, il est nécessaire en cas de problème d'affiner les réglages et de recommencer l'analyse intégralement, ce qui peut, à la longue, représenter une perte de temps.

1.2 Présentation de la solution retenue : Ethovision XT® (Noldus, The Netherlands)

Ethovision XT est un logiciel qui permet à la base de ne suivre qu'un seul individu (*single-object*). Cependant, il est possible d'acheter différents modules complémentaires qui pourront permettre par exemple :

- de suivre plusieurs arènes en même temps (jusqu'à 96, module *Multiple arenas*) ;
- de suivre théoriquement jusqu'à 16 individus simultanément par arène à condition qu'ils soient identifiés d'une marque de couleur visible sur l'image (module *Social interaction*) ;
- de suivre plusieurs individus en trois dimensions (à l'aide de deux caméras synchronisées) ;
- d'obtenir plusieurs points par individus (par exemple un point pour la tête et un point pour la queue ou le centre de masse) afin de calculer l'orientation de l'individu (module *Multiple body points*).

La présentation qui suit concerne la version XT 7.1 du logiciel Ethovision avec les modules *Multiple arenas*, qui permet de suivre plusieurs arènes simultanément, et *Social interaction*, qui permet de suivre plusieurs individus situés dans la même arène (théoriquement jusqu'à 16). Ces deux modules sont cumulatifs : il est donc possible de suivre simultanément plusieurs arènes contenant chacune plusieurs individus.

1.2.1 Les options de base

Le choix du nombre d'arènes Dans Ethovision, une arène est une surface qui va être analysée de manière indépendante. Il est possible d'en définir d'une à cent par vidéo, et de les analyser de manière indépendante et simultanée. Ainsi, il est possible par exemple de filmer plusieurs aquariums simultanément et de définir chacun d'eux comme étant une arène, de même avec une plaque de 96 puits où chacun des puits contient une larve de poisson.

Le choix du nombre d'individus à suivre par arènes Chaque arène peut contenir de un à seize individus maximum. Cependant, pour être suivis, les individus doivent être mar-

qués individuellement. Cette option est plus largement discutée dans la partie 1.4.1 Avantages et limitations du *video tracking* automatique, p. 54.

Le choix du centre de masse Plusieurs possibilités s’offrent à l’utilisateur pour la prise en compte du centre de masse des individus suivis :

- par le centre de masse de la surface détectée : il s’agit d’un calcul du barycentre de la surface détectée par le logiciel.
- par une marque de couleur placée sur l’individu : lorsque les individus ont été marqués, la marque peut servir de centre de masse.

Le choix de la source d’image Plusieurs options sont là aussi sélectionnables concernant la source de l’analyse :

- analyse en temps réel (*live tracking*) : en reliant la caméra directement à un ordinateur muni d’Ethovision, il est possible d’obtenir un *tracking* en temps réel.
- analyse en temps réel tout en sauvegardant la vidéo : comme précédemment, mais en plus de l’analyse une vidéo est sauvegardée, ce qui permet de re-visualiser les données du *tracking* et d’être en mesure de corriger les éventuelles erreurs manuellement, voire de ré-effectuer une analyse complète en modifiant les paramètres.
- analyse depuis une vidéo préalablement enregistrée, que ce soit par Ethovision ou un autre logiciel.

1.2.2 L’utilisation des zones

Il est possible de sub-diviser une arène en différentes zones d’intérêt. La détermination des zones se fait de manière très simple en utilisant des outils de dessins classiques : cercles, rectangles, segments etc. Ceci va permettre de calculer les différentes variables (temps de présence, vitesse moyenne, temps d’immobilité, nombre d’entrées, de sorties, etc.) pour chaque zone et donc d’affiner l’analyse spatiale. Il est aussi possible de créer des zones cachées (*Hidden zones*) qui permettront d’indiquer au logiciel les zones de refuge : lorsque l’individu disparaît autour de cette zone, c’est qu’il se trouve dans le refuge (ceci permet d’éviter que le logiciel ne cherche en vain l’individu sur l’écran en créant des artefacts d’analyse).

1.2.3 Le choix de la méthode de détection

Ethovision dispose de plusieurs méthodes permettant d’isoler le ou les individus à suivre sur la vidéo.

Détection par niveaux de gris (*Gray scaling*) La vidéo est convertie en monochrome et l'utilisateur va pouvoir sélectionner un seuil de niveau de gris minimal et un seuil maximal correspondant à l'individu à suivre. Cette technique n'est utilisable que si l'individu à suivre et le fond de l'image sont très contrastés et demande qu'aucun autre élément de la vidéo ne soit d'une couleur située dans la gamme de gris sélectionnée pour enregistrer les déplacements de l'individu.

Détection par soustraction statique du fond (*Static subtraction*) Le logiciel va utiliser une image de référence sans le ou les individus à suivre. Ensuite, pour chaque image de la vidéo à analyser, il va soustraire l'image de référence à l'image actuelle : les pixels qui sont différents de l'image de référence sont considérés comme étant l'objet à suivre (Fig. 23).

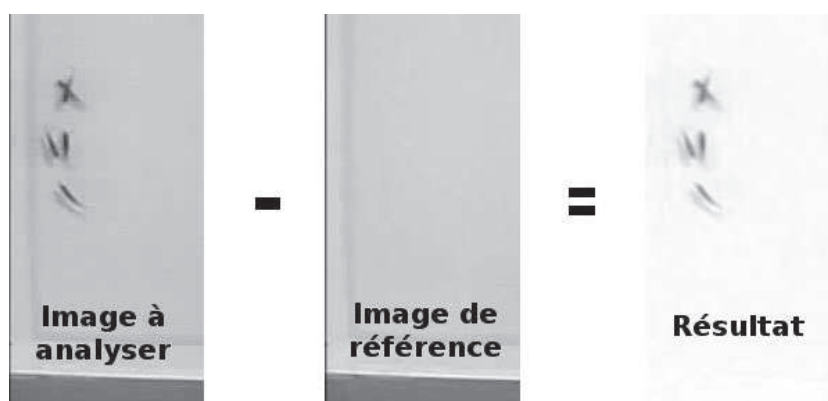


FIGURE 23 – Illustration du traitement d'image par soustraction statique pour ne laisser que les objets à détecter.

Une fois les sujets isolés, il est possible d'affiner la détection en jouant sur différents paramètres :

- les niveaux de gris : en ajustant les valeurs de niveau de gris il est par exemple possible d'éliminer les ombres des individus ;
- la taille maximale / minimale des individus à suivre : permet d'éliminer certaines particules qui peuvent être présentes dans l'eau et mobiles (et donc potentiellement détectables par le logiciel) comme les fèces par exemple. Ceci peut aussi permettre d'éliminer le bruit de fond dû à la compression numérique et/ou à un mauvais éclairage qui peut former une sorte de neige sur la vidéo qui peut altérer la qualité du *tracking* ;

L'avantage de cette technique est qu'elle est beaucoup plus discriminante que la détection par niveau de gris. L'inconvénient majeur est que toute différence entre l'image à analyser et l'image de référence sera détectée comme étant l'individu à suivre. Ainsi,

le bac d'expérimentation et la caméra doivent être parfaitement stables. De même, toute bulle ou particule dans l'eau (comme des fèces par exemple) peuvent être détectés comme un individu à suivre).

Détection par soustraction dynamique (*Dynamic subtraction*) Cette méthode est basée sur la précédente (la soustraction statique), mais avec cette technique, l'image de référence va être constamment mise à jour par rapport aux précédentes images. Ceci est particulièrement pratique dans le cas où l'environnement n'est pas statique (bulles, courant, etc.) et permet ainsi de retirer les éléments mobiles de la vidéo qui ne sont pas des individus à suivre. Cependant, dans le cas où les individus resteraient trop longtemps immobiles (ce qui peut arriver avec les soles, par exemple) ceux-ci vont peu à peu être considérés comme faisant partie du fond et ne plus être détectés.

Détection par différenciation (*Differencing*) Cette méthode est une autre forme de détection dynamique, mais le rafraîchissement de l'image de référence se fait sur l'ensemble des images de la vidéo, avec un coefficient de pondération plus fort sur les dernières images. Le problème des individus immobiles pendant une longue période de temps persiste cependant.

1.3 Le calcul des variables

Il est possible de choisir différentes variables comme : le temps de mobilité, la vitesse, la distance parcourue, la vitesse angulaire, la sinuosité du déplacement, etc. Une fois les variables d'intérêt sélectionnées, elles sont par défaut calculées pour la totalité du temps d'expérimentation et pour toute l'arène. En utilisant un système graphique et intuitif de boîtes, il est possible de demander au logiciel d'affiner le calcul pour obtenir les valeurs moyennes des variables sélectionnées par zones et/ou par intervalles de temps personnalisés, en plus de l'analyse globale. Ethovision permet donc d'obtenir des résultats sub-divisés dans l'espace et dans le temps, à condition de paramétrer correctement l'analyse que l'on veut réaliser.

1.4 Les avantages et limitations du *video tracking* et leurs prises en compte dans les méthodes d'analyse retenues

1.4.1 Avantages et limitations du *video tracking* automatique

Par définition, l'un des premiers avantages du *video tracking* automatique est son automatisation. Lorsqu'un logiciel de ce type est stable, bien maîtrisé, utilisé correctement (c'est-à-dire en accord avec la philosophie de sa conception) et que des moyens matériels ont été mis en œuvre pour assurer une bonne qualité d'acquisition vidéo, celui-ci permettra un gain de temps considérable et une qualité d'analyse proche de la perfection sur les paramètres choisis. Cependant, le moindre écart, que ce soit au niveau du paramétrage ou de la qualité de la source peut avoir des conséquences non négligeables sur la qualité des données obtenues, et donc remettre en cause les conclusions d'une étude toute entière.

Les paramètres à contrôler impérativement au niveau de la prise de vue sont les suivants :

- la caméra doit avoir une résolution permettant de discerner correctement les individus à suivre (taille supérieure à 2 pixels) ;
- la compression numérique utilisée pour l'enregistrement doit permettre de conserver la bonne qualité d'acquisition de la caméra ;
- l'objectif utilisé doit déformer le moins possible l'image afin limiter toute approximation des distances lorsque les individus se déplacent sur les bords de l'image ;
- de même, les vues en perspective, trois quarts ou autre contre-plongée renforcent l'approximation des distances en fonction de la position de l'individu ;
- la caméra, la source d'éclairage (qu'elle soit infra-rouge ou visible) ainsi que les bacs d'expérimentation ne doivent idéalement pas être déplacés d'un enregistrement à l'autre pour éviter d'avoir à reparamétrer systématiquement la zone d'étude, la calibration des distances, l'image de référence, etc. ;
- idéalement, le fond de l'image doit être au plus homogène possible, et les individus à suivre ne doivent pas paraître plus sombres que le fond à un endroit de l'écran puis plus clairs que le fond à un autre (la détection se faisant généralement par contraste) ;
- la source lumineuse (quelle soit infra-rouge ou visible) doit être suffisante pour limiter le bruit de fond qui peut apparaître en cas de sous-éclairage et qui peut créer un pseudo-mouvement du centre de masse d'individus pourtant immobiles ;
- aucune variation de la qualité d'image ne doit apparaître au long de la vidéo, que ce soit au niveau de la source lumineuse (quelle soit infra-rouge ou visible) ou de la

- caméra (comme de la buée qui se forme sur l'objectif dans des salles trop humides) ;
- aucun autre objet ou ombre ne doit être en mouvement dans la zone d'étude autre que l'individu à suivre : les systèmes de bullage ou les circuits d'eau qui pourraient créer des bulles à la surface de l'eau doivent donc être coupés le temps de l'expérimentation ou alors limités (en injectant par exemple l'oxygène directement dans un flux d'eau, qui va lui-même être injecté sous la surface de l'eau afin d'éviter toute turbulence) ;
 - la salle où sont réalisés les enregistrements doit idéalement être dédiée à cette unique fonction, isolée de toute perturbation et doit avoir des systèmes indépendants de thermorégulation et d'éclairage.

Lorsque l'ensemble de ces paramètres sont correctement respectés, les vidéos peuvent généralement être analysées sans grande difficulté par la majorité des logiciels de *video tracking* automatiques.

Un autre paramètre important à prendre en compte est le fait que les poissons évoluent naturellement en trois dimensions, mais l'enregistrement vidéo à partir d'une seule caméra ne permet quant à lui de ne prendre en compte que deux de ces trois dimensions (Fig. 24).

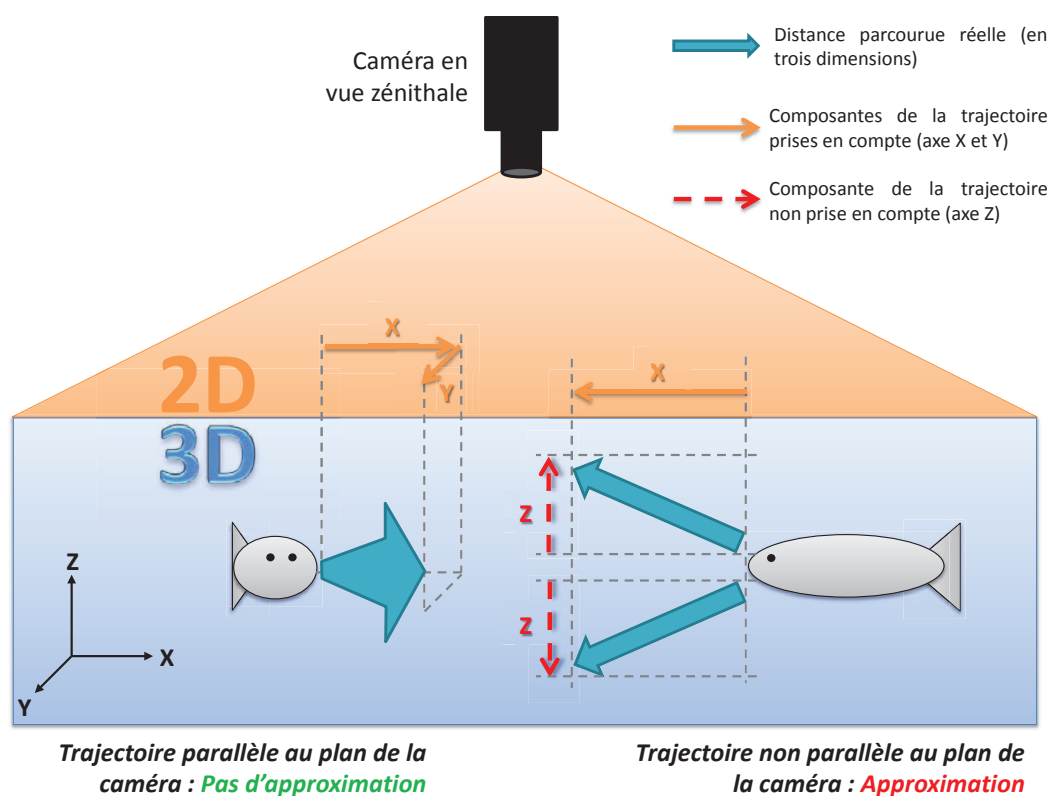


FIGURE 24 – Illustration de l'interprétation de déplacements en 3D dans le plan bidimensionnel d'une caméra.

Dans des conditions d'élevage traditionnelles, la profondeur des bassins ne permet

pas aux individus de nager selon une trajectoire parfaitement verticale, mais les poissons peuvent tout de même nager en avançant « vers le haut » ou « vers le bas » (2.5D). Ainsi, en plaçant la caméra au-dessus du bassin (vue zénithale), l'approximation se fera sur la composante verticale, qui est naturellement plus limitée. Ensuite, pour restreindre encore plus l'approximation sur l'axe vertical, il est préférable de diminuer la hauteur d'eau dans les bassins d'expérimentation, ce qui permet dans le même temps d'augmenter le rapport surface-volume, facilitant ainsi les échanges gazeux entre l'air et l'eau. Il est de cette façon possible de garder des bonnes conditions d'oxygénation de l'eau sans avoir à recourir à un système de bullage qui pourrait perturber l'analyse.

D'une manière générale, les nécessités techniques doivent aussi s'adapter aux besoins de l'espèce étudiée pour arriver à une situation de compromis, qui permet à la fois d'assurer des conditions les moins stressantes possibles pour les individus suivis et une qualité d'analyse optimale. L'analyse automatique des trajectoires d'individus isolés est donc quelque chose de tout à fait réalisable et les résultats obtenus de nos jours sont très satisfaisants. Cependant, la transition de l'analyse individuelle à celle du groupe n'est pas encore complètement assurée sur le modèle poisson.

Lorsque l'on veut suivre plusieurs poissons en même temps, même en limitant le niveau d'eau, ceux-ci vont pouvoir se croiser parfaitement. Les erreurs d'échange d'identité en cas de croisement des individus sont communes à tous les logiciels permettant de faire du *multi-object tracking* sans marquage qui ont pu être testés durant ces trois années de thèse (Tab. 1). Les erreurs d'interprétation couramment observées par les logiciels sont illustrées en Fig. 25. Peu d'entre eux proposent de pouvoir corriger manuellement l'identité des individus.

De son côté, Ethovision possède le module *Social interaction* qui permet de suivre plusieurs individus dans une même arène. Pour éviter toute confusion en cas de croisement, les concepteurs ont pensé à une méthode simple : mettre une marque de couleur sur chaque individu afin de retrouver sans erreur « qui est qui » après chaque croisement.

La limitation est fixée à 16 individus. Cependant, cette limite est très théorique car elle suppose de trouver 16 couleurs parfaitement distinguables sur la vidéo, ce qui est loin d'être une chose aisée. Ce logiciel étant à la base conçu pour analyser le comportement des souris, il suffit de mettre une tâche de couleur sur le dos des individus de cette espèce pour les identifier et donc ce type de marquage n'implique pas d'altération de la locomotion. Chez le poisson cependant, marquer les individus avec de la couleur est plus complexe. En effet, ceci implique soit d'injecter de l'encre sous la peau (ce qui peut amener à la formation de kystes puis de rejet) ou alors de suturer une perle de couleur sur leur dos. Le marquage par une perle de couleur de 0.8 g suturée au niveau de la nageoire dorsale a été effectué par [Jadot et al. \(2005\)](#) sur de relativement gros poissons (*Sarpa salpa*,

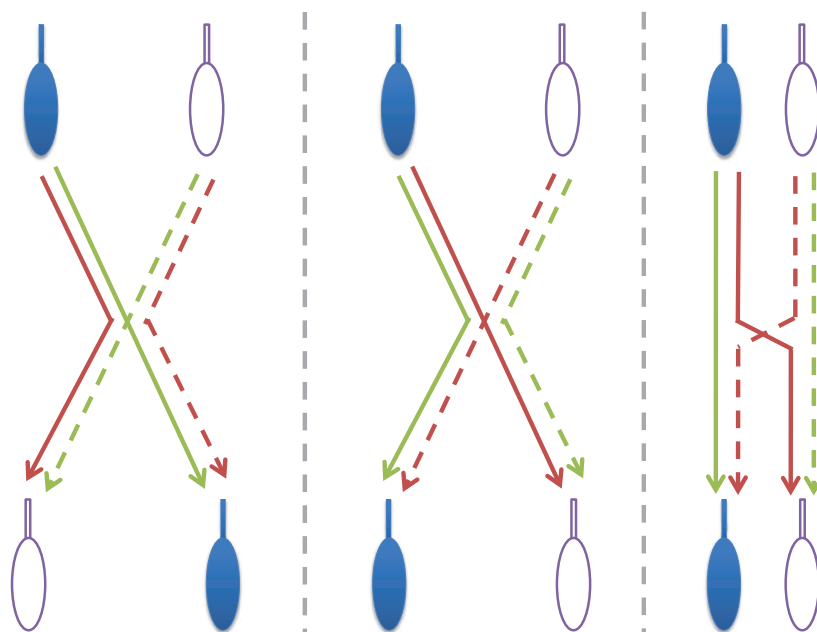


FIGURE 25 – Les trajectoires possibles des poissons et les erreurs d’interprétations des logiciels de *video tracking*, d’après [Delcourt et al. \(2009\)](#). Les traits verts représentent les trajectoires réelles, les traits rouges représentent les erreurs couramment observées dans les logiciels de *video tracking multi-object*.

22.3 ± 2.85 cm). Ce marquage a nécessité une anesthésie (2-phénoxy-éthanol, 0,2 ml.l⁻¹) ainsi qu’une période de 36 h de récupération et seuls deux poissons en même temps ont été filmés. De même, [Ylieff et Poncin \(2003\)](#) ont mesuré la nage en groupe de trois individus en utilisant le marquage perle chez la castagnole (*Chromis chromis*) ou en utilisant les différences de couleurs inter-individuelles naturelles chez le poisson rouge (*Carassius auratus*, rouge ou blanc). Dans le cas de petits poissons comme le poisson zèbre, il semble cependant difficile d’obtenir un marquage non traumatisant et suffisamment visible à la caméra pour que les individus soient correctement discriminés par le logiciel : l’utilisation d’encre ou de perles trop petites ne permettrait pas une bonne discrimination à l’image, alors qu’une perle trop grosse pourrait altérer la locomotion, qui est pourtant le critère qui devait initialement être étudié. De plus, les poissons sont très sensibles à la couleur de leurs congénères ([Gerlai et al., 2009](#)) : l’utilisation de marques de couleur peut donc potentiellement altérer le comportement social, ce qui encore une fois est un problème lorsque le but premier de l’expérience était d’observer la locomotion en groupe. En effet, les conséquences comportementales du marquage par perle de couleur sur le comportement locomoteur ou social des individus n’a pas été testé par [Ylieff et Poncin \(2003\)](#) ou [Jadot et al. \(2005\)](#).

Ethovision permet maintenant d’utiliser le module *Social interaction* sans l’utilisation

de marques externes. Ce mode est encore expérimental et régulièrement, lorsque des individus de même taille se croisent, se touchent ou simplement sont trop près l'un de l'autre, le logiciel perd l'identité des poissons. L'exemple donné en Fig. 26 montre clairement un cas d'échange d'identité entre deux individus.

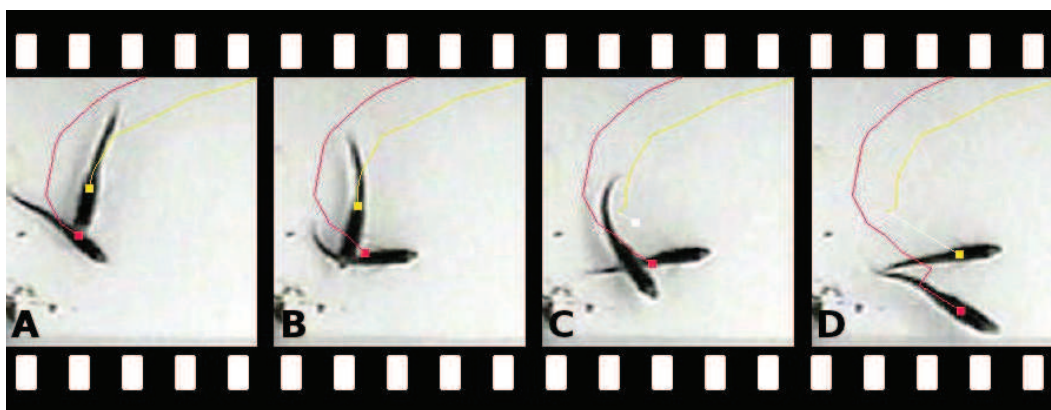


FIGURE 26 – Exemple d'échange d'identités entre deux poissons par le module *Social interaction* du logiciel Ethovision utilisé sans marque externe. **A et B** : Les deux poissons sont tout d'abord correctement détectés (individu 1 en rouge et individu 2 en jaune). **C** : Ils sont ensuite confondus comme un seul individu au moment où ils se croisent (individu 1 en rouge, individu 2 perdu en gris). **D** : Le logiciel reconnaît bien deux individus, mais leurs identités ont été échangées par rapport au début de la séquence analysée (individu 1 en jaune et individu 2 en rouge). Extrait provenant d'une vidéo d'exercice fournie par Noldus.

Comme précisé précédemment, ce mode est expérimental et la philosophie de Noldus vis-à-vis de l'utilisation du module *Social Interaction* est d'utiliser des marques de couleur externes pour éviter ce type d'erreurs. Cependant, comme cette option est maintenant disponible pour tout utilisateur, il paraît nécessaire de la discuter afin d'éviter toute erreur d'analyse.

Tout d'abord, les échanges d'identité n'altèrent en aucun cas une partie des variables analysées, comme la présence ou non dans une zone ou encore la distance inter-individuelle moyenne. De même, dans le cas où l'étude se base sur la différence de comportement d'un groupe appartenant à une condition donnée par rapport à un groupe d'une autre condition, l'étude de la distance parcourue par groupe reste une variable valable, même s'il y a eu par moment des échanges d'identité entre individus.

La limite apparaît lorsque l'on s'intéresse aux variables individuelles, et surtout à leurs variations. La Fig. 27 illustre un cas théorique très simple : dans le cas où deux individus sont suivis, si l'un est quasiment immobile pendant l'ensemble de la séquence analysée, et l'autre est au contraire très mobile et croise son congénère régulièrement, provoquant

une ou plusieurs situations d'échange d'identités, les moyennes de distance parcourue ne diffèrent pas avec l'erreur induite par les inversions d'identité, mais les variations associées sont différentes (les échanges d'identité gommant la variation individuelle naturelle). Cette altération par rapport à la situation réelle est un vrai problème pour le calcul statistique.

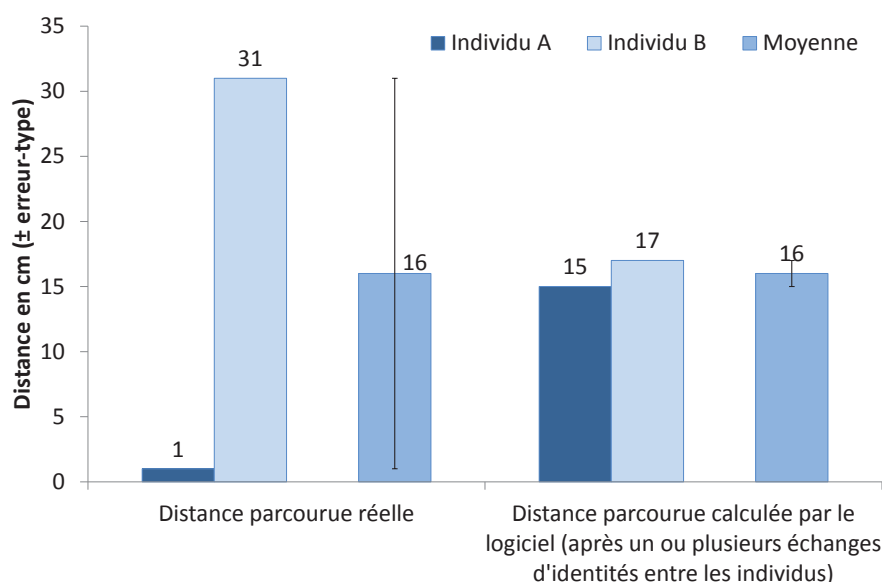


FIGURE 27 – Illustration d'un cas théorique d'erreur de la variation inter-individuelle de la distance parcourue due à une inversion d'identité des individus suivis.

Ethovision propose dans son menu d'édition (*Track Editor*) de pouvoir corriger manuellement l'identité des individus. Cette correction peut cependant être très lourde à mettre en place car elle nécessite de revisualiser chacune des vidéos et de vérifier chaque croisement.

Afin de limiter les erreurs d'identification lors de l'utilisation du module *Social interaction* sans utiliser de marques externes, il convient donc :

- de n'utiliser que deux (maximum trois) individus simultanément ;
- de prendre des individus de taille bien différentes et d'enregistrer la taille de chaque individu dans les paramètres de détection ; cependant, tout comme l'utilisation de marques externes, l'utilisation d'individus de tailles différentes peut elle aussi biaiser les relations sociales.

Même avec de très bons logiciels, capables de prendre en compte les trajectoires individuelles avant et après croisement afin de retrouver l'identité des individus, il restera toujours très difficile d'obtenir des résultats fiables à cause des limitations de la représentation en deux dimensions. Pour palier à ceci, un premier système a été mis en place par

Beeuwkes *et al.* (2008) afin de pouvoir filmer le vol de moustiques (qui ont eux aussi un déplacement très complexe dans les trois dimensions). Ce système utilise deux caméras différentes dont les axes forment un angle de 40° . Un module Ethovision supplémentaire a été mis en place (maintenant commercialisé sous le nom de *Track3D*, Spitzen *et al.* 2008). Le dispositif mis en place est représenté en Fig. 28.

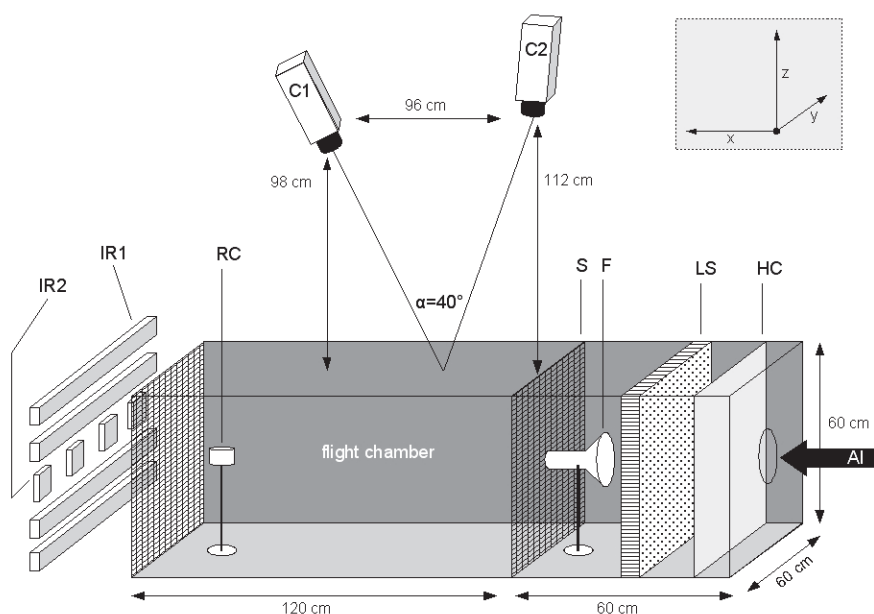


FIGURE 28 – Dispositif mis en place par Beeuwkes *et al.* (2008) pour analyser la trajectoire d'un individu en trois dimensions et commercialisé sous le nom de *Track3D* (Spitzen *et al.*, 2008). Les deux caméras sont placées selon un angle de 40° .

Un dispositif similaire a été mis en place par Delcourt *et al.* (2011) afin d'analyser les trajectoires de quatre poissons simultanément avec des marques de couleur (Fig. 29). Bien que ces systèmes soient encore relativement confidentiels, l'utilisation de deux caméras donne pour l'instant des résultats très fiables (Beeuwkes *et al.*, 2008; Spitzen *et al.*, 2008; Delcourt *et al.*, 2011). À terme, c'est certainement par cette approche qu'il sera possible de réaliser des *video tracking* de plusieurs individus non marqués en limitant les risques d'inversion d'identité.

Obtenir une analyse de type *video tracking* automatique sur des groupes d'individus non marqués permettrait d'obtenir des moyennes individuelles de distances, vitesses, mobilités, etc. Cependant, d'autres paramètres peuvent être extraits pour l'analyse de la nage en groupe sans qu'il soit nécessaire d'identifier les individus tout au long de l'analyse. Ces variables sont :

- la répartition des individus ;
- la distance inter-individuelle pour chaque image donnée.

La section 2.2 HeatMap From Stack : plugin pour le logiciel ImageJ servant à l'analyse de la répartition spatiale en groupe, p.80 du Chapitre 2 présente l'une de ces techniques d'analyse.

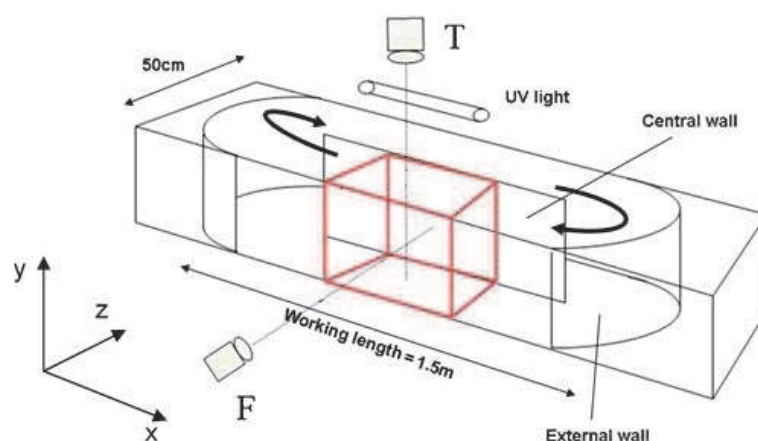


FIGURE 29 – Dispositif mis en place par Delcourt *et al.* (2011) pour analyser la trajectoire de quatre individus simultanément en trois dimensions à l'aide de marques de couleur. Les marques étant des VIE fluorescentes, l'éclairage utilisé est une lampe U.V.. Les deux caméras sont placées selon un angle de 90°.

1.4.2 Les méthodes choisies

Bien qu'elle soit *a priori* plus exigeante, la méthode de soustraction statique est celle qui a été retenue pour l'ensemble des analyses effectuées. En effet, avec l'algorithme de soustraction dynamique, les individus immobiles depuis trop longtemps avaient tendance à être perdus de l'analyse car « imprimés » sur l'image de référence au fur et à mesure du temps. La caméra a été solidement fixée au plafond afin d'éviter tout décalage ou mouvement pendant l'analyse ou entre la capture de l'image de référence et celle de la vidéo à analyser. Avant chaque début d'analyse, l'image de référence a été capturée par le logiciel avant de placer les individus à suivre. Pour éviter la perte de l'image de référence (soit par une mauvaise manipulation, soit par une erreur menant à la corruption du fichier d'analyse), une courte vidéo de quelques secondes du dispositif sans les individus à suivre a été systématiquement prise afin de pouvoir ré-extraire facilement une image de référence *a posteriori* en cas de problème.

1.5 Mise en place du matériel

Afin d'obtenir des conditions d'acquisition optimales, une salle a été dédiée aux expérimentations comportementales vidéo. Cette salle est située dans un sous-sol dans un endroit peu passant du laboratoire, dispose d'une isolation phonique et thermique, et ne dispose d'aucune fenêtre. L'éclairage et la température sont donc ajustés en fonction des besoins expérimentaux. Cette salle a été équipée initialement d'une caméra couleur Panasonic CCTV WV-CL920A, d'un plancher infra-rouge (Noldus, The Netherlands) et de spots halogènes (Philips 80 W, Fig. 30-A). Pour éviter que les bacs expérimentaux ne reposent directement sur le plancher infra-rouge, un support en PVC expansé¹ et polyméthacrylate de méthyle² transparent a été construit : le plancher infra-rouge glisse sous ce support et diffuse les rayons infra-rouge au travers de la plaque de polyméthacrylate de méthyle transparent. Le système est étanche et peut contenir jusqu'à 200 l pour servir directement de bac expérimental pour les gros poissons, sans risquer d'altérer le système infra-rouge.

Les équipements ont peu à peu évolués afin d'obtenir des conditions optimales. Le changement notable est l'achat d'une caméra monochrome Ikegami. En effet, les caméras monochromes sont beaucoup plus sensibles aux rayonnements proches infra-rouge que les caméras couleurs. La caméra couleur Panasonic CCTV WV-CL920A a donc été remplacée par une caméra monochrome Ikegami ICD-48E munie d'un filtre Fujinon 2.7-13.5 mm (F1.3 CS).

En plus de la camera, a été acheté un filtre dit *Visible block / Infra-red pass* (The Imaging Source, Ref. 092) qui permet de ne laisser passer que les rayonnements au-delà de 700 nm (proche infra-rouge). Les éclairages halogènes émettant beaucoup dans l'infra-rouge (et donc n'étant pas occultés par le filtre), ont eux aussi été changés au profit de spots à diodes (Philips MASTER LEDspot PAR 38 - 2700 K, 16 W). En plus d'être plus économiques et d'avoir une durée de vie plus longue, ces spots n'émettent pas de rayonnement dans l'infra-rouge (Fig. 31). Ces spots sont dits *Warm white* : contrairement à des spots à diodes classiques qui ont tendance à donner une lumière bleuâtre, ces spots ont un premier pic d'émission dans le spectre de couleur bleu, et un second pic plus important dans le spectre de couleur jaune-orangé, ce qui leur confère une température de couleur équivalente à celle de lampes à halogènes (2700 K, Fig. 31), plus conforme avec l'éclairage de la salle d'élevage.

L'élimination de la lumière visible des spots par le filtre pour ne garder que l'éclairage provenant du plancher infra-rouge permet avant tout de s'affranchir des problèmes

1. Commercialisé sous le nom de Komacel ou Komatex.

2. Cette matière est un thermoplastique transparent aux rayons infra-rouge. Elle est commercialisée sous différents noms comme Plexiglas, Altuglas, Lucite, Optix (Plaskolite), Crystalite ou Perspex.

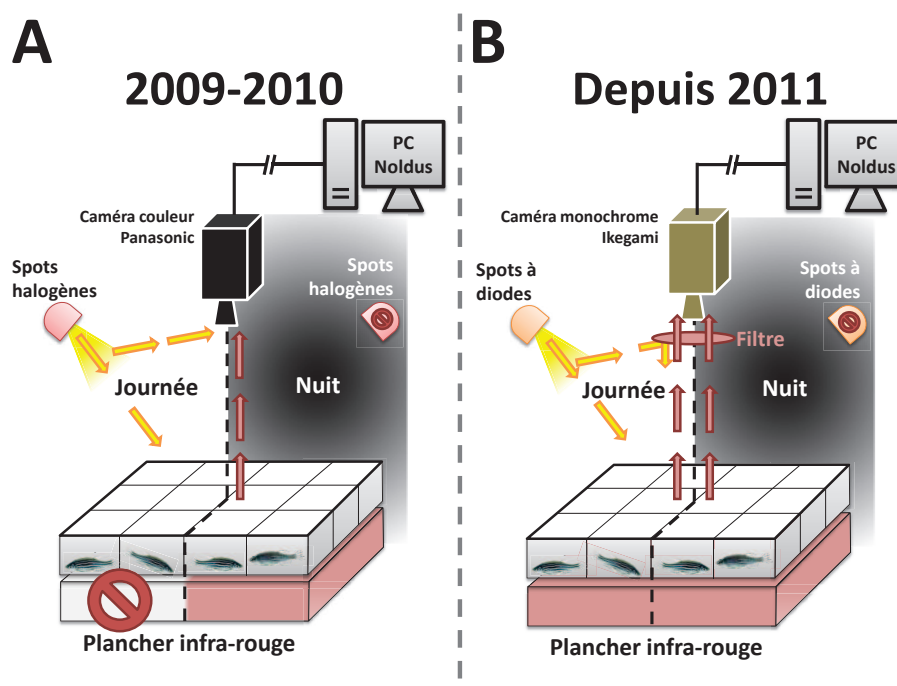


FIGURE 30 – Représentation schématique du dispositif expérimental d'acquisition vidéo ; **A** : en 2009-2010, pendant la journée, seuls les spots halogènes permettent à la caméra couleur Panasonic de filmer les poissons ; la nuit, les spots sont éteints et c'est le plancher infra-rouge qui permet de voir les poissons sur la vidéo ; **B** : depuis 2011, un filtre a été placé sur la caméra monochrome Ikegami permettant d'éliminer le rayonnement des spots à diodes ; de jour comme de nuit, seul l'éclairage par le plancher infra-rouge permet de filmer les individus, l'éclairage à diodes servant uniquement à assurer la photopériode des poissons.

d'ombres, de reflets et de réglages de niveaux de gris. En effet, pour les expériences faites le jour, la source d'éclairage était avant uniquement celle des spots halogènes, qui pouvaient créer à la fois une ombre projetée des individus dans le fond de leurs bacs ou encore des reflets de lumière à la surface de l'eau. Les reflets de lumière pouvaient apparaître lorsqu'un individu se déplaçait très rapidement, créant des ondulations à la surface de l'eau qui reflétaient la lumière des spots lumineux. Ces reflets ondulant avec l'eau et n'étant pas présents dans l'image de référence, ils pouvaient être considérés comme l'individu à suivre. Ces deux problèmes potentiels (ombres et reflets) pouvaient être corrigés en ajustant correctement Ethovision, mais les réglages devaient parfois être très fins et précis pour obtenir un résultat satisfaisant. Avec le nouveau dispositif, le fait de placer les individus à suivre entre la source lumineuse unique (le plancher infra-rouge) et la caméra (Fig. 30-B) permet de beaucoup mieux faire ressortir les individus à suivre par contraste, sans risque d'ombre ou de reflet : même un individu blanc apparaîtra de couleur sombre à l'image (par « ombre chinoise »). Ceci permet de garder des réglages Ethovision équivalents pour tous

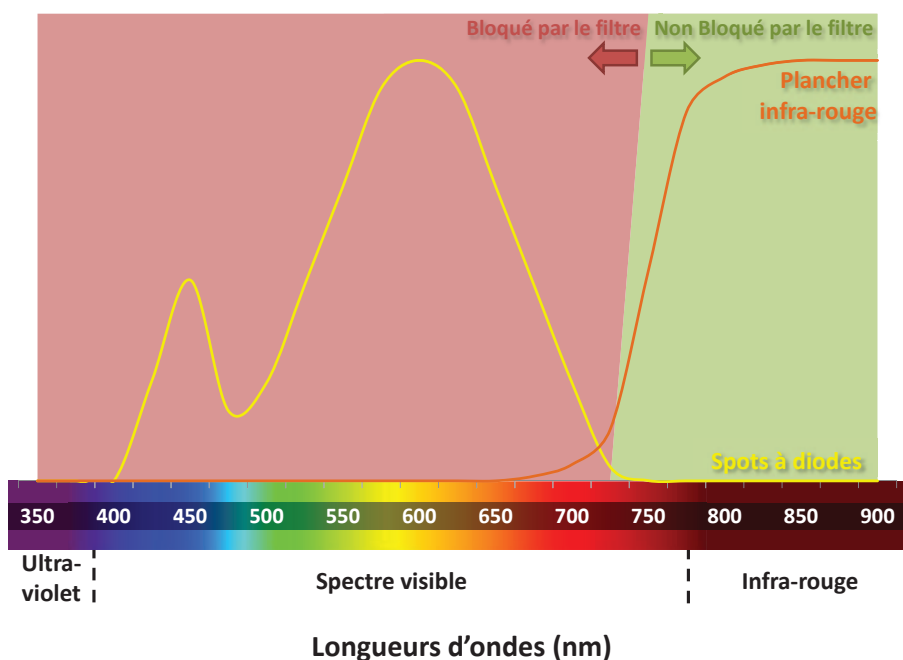


FIGURE 31 – Fonctionnement du filtre *Visible block / IR pass*. Le filtre bloque tout rayonnement émis dans des longueurs d'ondes visibles (< 700 nm, donc celui des spots à diodes) et laisse passer les rayonnements à partir du proche infra-rouge (> 700 nm, donc celui émis par le plancher infra-rouge).

les individus, peu importe leur couleur. De plus, avant la mise en place de ce dispositif, il était nécessaire d'utiliser des réglages de contrastes et luminosité spécifiques pour le jour et d'autres pour la nuit, et donc d'être présent pour changer ces réglages manuellement au moment de chaque extinction ou allumage des spots (22h30 et 8h30 pour les expériences sur le poisson zèbre, 21h00 et 9h00 pour la sole). Depuis, il est possible de filmer en continu car l'allumage et l'extinction des spots n'ont aucun effet sur les réglages de l'acquisition vidéo. Au-delà du confort de l'expérimentateur, ceci a surtout permis d'obtenir des fichiers enregistrés en continu (le changement de réglages demandait une interruption de quelques secondes). Cependant, comme le changement de lumière n'est plus visible à l'image, il convient de vérifier régulièrement si l'horloge réglant la photopériode est toujours fonctionnelle et bien synchronisée avec le dispositif d'enregistrement.

En plus de la salle d'expérimentation dédiée aux juvéniles et adultes, un autre dispositif a été mis en place spécifiquement pour l'analyse du comportement locomoteur des larves de poissons zèbres. Ce dispositif, ainsi que le protocole mis en place pour son bon fonctionnement, sont présentés dans la section suivante.

1.6 Mise en place du protocole de challenge lumineux pour les larves de poisson zèbre

1.6.1 Bref état de l'art

De nombreuses études se basent sur l'étude du comportement locomoteur du poisson zèbre où de sa mise en place (Granato *et al.*, 1996; Drapeau *et al.*, 2002; Brustein *et al.*, 2003; Watkins *et al.*, 2004; Winter *et al.*, 2008a,b; MacPhail *et al.*, 2009; Irons *et al.*, 2010; Zellner *et al.*, *in press*). Certaines approches se sont montrées novatrices, comme Prober *et al.* (2006) et Blin *et al.* (2008) utilisant les plaques multi-puits pour enregistrer le comportement locomoteur de plusieurs individus en même temps ou MacPhail *et al.* (2009). Cependant, aucun challenge précis permettant de diagnostiquer rapidement un grand nombre d'individus n'existe encore. La notion de challenge peut potentiellement renforcer les différences entre deux conditions, en laissant apparaître des différenciation dans l'acclimatation ou la récupération. Dans le cas d'analyse automatique par *video tracking*, un changement brutal de lumière n'induit qu'une courte perturbation pendant quelques images. L'utilisation de la lumière comme stressor permet d'avoir un stimulus facilement répétable et stable d'une expérience à l'autre. Cependant, comme le montre la Fig. 32 (MacPhail *et al.*, 2009), bien que le challenge soit identique pour chaque changements lumineux, la réponse comportementale, quant à elle, varie et est plus forte sur les premiers tests puis la réponse diminue dans le temps.

Cette figure pose cependant la question suivante : la réponse diminue-t-elle à cause de l'heure de la journée ou à cause de la multiplicité des tests ? Un autre test réalisé par (MacPhail *et al.*, 2009) est présenté en Fig. 33 avec des périodes d'obscurité de 10 min toutes les 10 min. Contrairement aux résultats de la figure 32, l'activité dans la première phase d'obscurité est beaucoup plus faible que dans les suivantes.

La mise en place d'un protocole de challenge lumineux nécessite donc certains tests préliminaires afin de s'assurer de la stabilité du protocole. Cette étude a donc pour but de présenter un protocole court, stable et répétable utilisant les variations de lumière afin d'induire une réponse locomotrice chez des larves de poissons zèbre.

1.6.2 Matériel mis en place

Une boîte à lumières permettant de filmer des plaques multi-puits a été construite au sein de notre laboratoire (Fig. 34).

Cette boîte se trouve dans une salle dont la fenêtre a été condamnée afin de permettre de contrôler au mieux les changements lumineux. L'ensemble de la salle est chauffé à 28

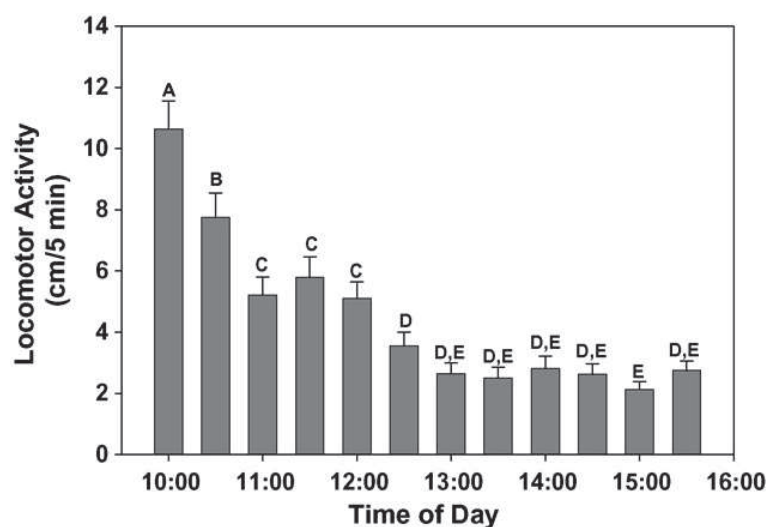


FIGURE 32 – Distance parcourue pendant 5 minutes dans le noir (infra-rouge) en fonction de l’heure de la journée, [MacPhail et al. \(2009\)](#). Les données sont présentées sont des moyennes \pm erreurs-type pendant les 5 minutes de challenge dans le noir réalisés toutes les 30 minutes. Les lettres représentent les différences statistiques.

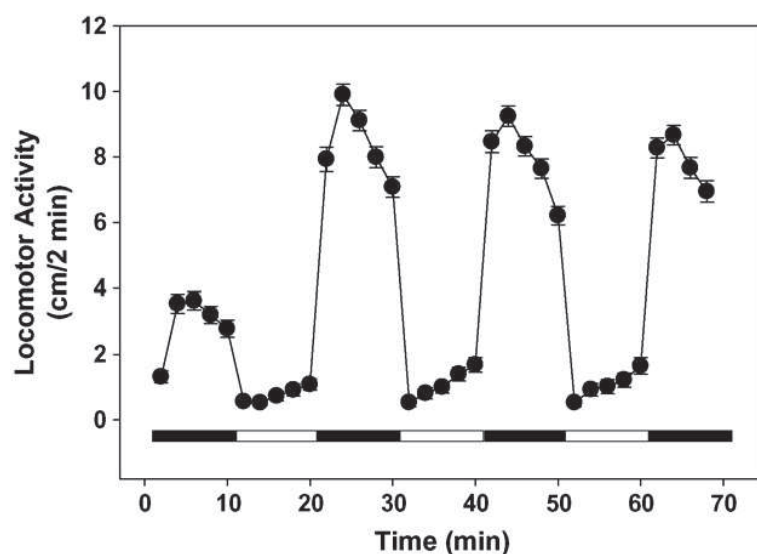


FIGURE 33 – Distance parcourue pendant 10 minutes pendant une série d’extinctions et d’allumage d’éclairage par phases de 10 min, [MacPhail et al. \(2009\)](#). Les données sont présentées sont des moyennes \pm erreurs-type obtenues toutes les 2 min.

°C et les expérimentations se déroulent lumière éteinte. De son côté, la boîte ferme de manière hermétique de façon à éviter tout apport de lumière non contrôlé (par exemple dû à l’écran de l’ordinateur servant à la capture vidéo).

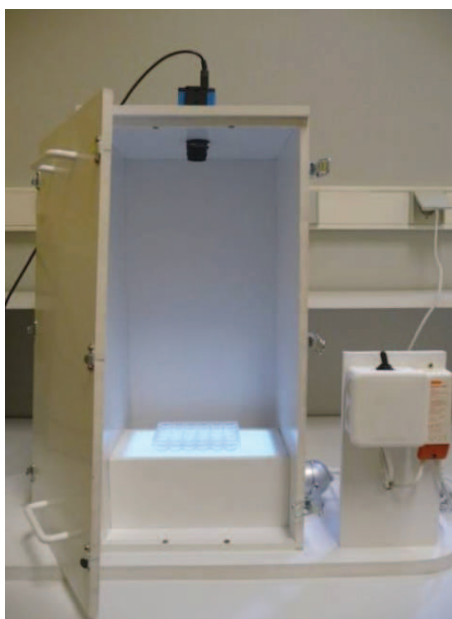


FIGURE 34 – Photo de la boîte à lumière mise en place pour l’analyse du comportement locomoteur des larves de poissons zèbres. Le dispositif permet de filmer une plaque multi-puits et d’appliquer des stress lumineux en alternant lumière visible et lumière infra-rouge grâce à un interrupteur.

Basée sur le système mis en place pour les adultes, cette boîte possède un socle en Plexiglas diffusant qui peut être éclairé soit par de la lumière visible (spot à diode classique) soit par des rayons infra-rouges. Le changement d’une source lumineuse à l’autre se fait par un interrupteur. Bien que l’éclairage par diodes ne dégage pas de chaleur, le culot des spots de lumière visible ou infra-rouge ont tendance à chauffer (car ils sont composés de résistances), tout comme le boîtier de la caméra. C’est pour cette raison qu’ils ont été placés en dehors de l’enceinte hermétique, afin d’éviter que la température n’augmente dans la boîte pendant les tests. La caméra a été placée à une hauteur permettant à la fois d’obtenir une bonne résolution d’image (pour que les larves soient correctement détectées par le logiciel Ethovision) et une faible distorsion sur les bords de la plaque.

Pour éviter que les larves ne puissent se voir d’un puits à l’autre, les premières plaques 24 puits transparentes utilisées ont été modifiées afin que chaque larve soit visuellement isolé des autres, puis d’autres plaques 24 puits en plastique blanc opaque ou seul le fond est transparent ont été achetées. Tout comme dans l’étude de [MacPhail *et al.* \(2009\)](#), les larves ont été testé à 5 dpf . La veille de l’expérience, les larves sont sorties de l’enceinte thermostatée (28°C, photopériode 14 :10) et transférées de leur boîte de Petri à la plaque 24 puits et retourne dans l’enceinte thermostatée pour la nuit. Le jour de l’expérience, chaque plaque est transférée 1 h avant le début de l’enregistrement dans la salle d’expérimentation pour être placée sur un plateau lumineux qui pour une heure d’acclimatation.

Dans un premier temps, le nombre de changements lumineux ainsi que leur durée ont été réduits ; en gardant les 5 min de stress (comme utilisé en Fig. 32) afin d’avoir une expérience rapide. Les poissons étant soumis à une photopériode dès les premiers stades (l’enceinte thermostatée possédant son propre cycle de lumière), il semble plus logique de commencer par une première période de lumière (servant de d’auto-contrôle pour chaque lot de larve) puis d’induire ensuite le ou les changements lumineux vers l’obscurité. De même, finir par une phase lumineuse permettrait de contrôler si l’activité locomotrice revient à son niveau initial.

1.6.3 Mise en place du protocole

La première expérience qui a été réalisée a consisté à alterner 5 min d’obscurité toutes les 5 min (Fig. 35).

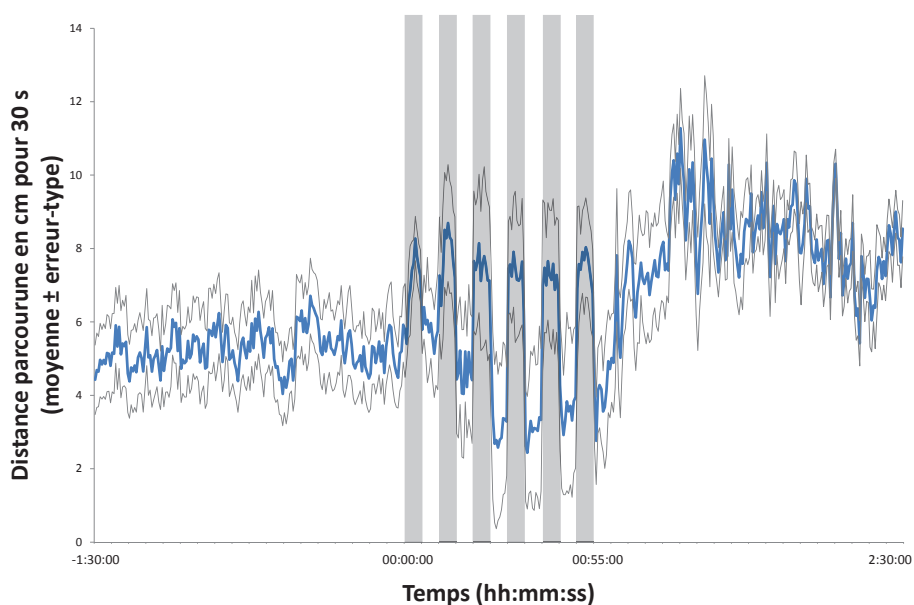


FIGURE 35 – Locomotion moyenne de larves de poissons zèbres (5 dpf) avant, pendant et après une série d’alternance de phases de 5 min d’obscurité (infra-rouge) et de lumière. Les rectangles grisés représentent les périodes de 5 min d’obscurité filmées par infra-rouge, les lignes grises l’erreur type.

La Fig. 35 montre dans un premier temps que l’activité pendant l’heure et demi qui précède la première phase d’obscurité est relativement stable et homogène (entre 4 et 6 cm parcourus chaque 30 s). Ensuite, les niveaux d’activité atteints pendant les phases d’obscurité sont supérieurs à l’heure et demi d’activité d’auto-contrôle. Cependant, au fur et à mesure des phases d’obscurité, la variation augmente de plus en plus (et ce dès la deuxième phase d’obscurité). De plus, après la dernière phase d’obscurité, l’activité

locomotrice augmente très fortement pour atteindre des valeurs supérieures à 10 cm pour 30 s. Une heure et demi après la dernière phase d'obscurité, l'activité locomotrice n'a toujours pas retrouvé son niveau de base et varie très fortement.

Cela signifie qu'une succession trop importante d'alternances de phases de lumière et d'obscurité perturbe de manière importante l'activité locomotrice. Cette conséquence peut avoir des répercussions importantes, notamment si les poissons doivent être utilisés les jours suivants pour d'autres tests : il faut donc considérer que ce type de test peut induire une dépense énergétique importante au cinquième jour, ce qui doit être à considérer.

Un deuxième test a été réalisé afin de savoir à la fois si l'activité locomotrice pouvait varier entre le matin, le début d'après-midi et la fin d'après midi, et aussi montrer les conséquences d'une seule phase lumineuse sur l'activité locomotrice comparée à un groupe contrôle qui ne subit pas de stress lumineux (Fig. 36).

La Fig. 36A montre que le niveau d'activité atteint pendant la phase d'obscurité est bien supérieur au niveau de base. Après la phase d'obscurité l'activité locomotrice remonte peu à peu pendant 30 min sans pour autant devenir plus importante que les niveaux observés avant le stress, contrairement à ce qui a pu être observés lorsque les phases d'obscurité ont été multipliées (Fig. 35).

La Fig. 36B montre les moyennes d'activités des groupes Contrôle et Stress par demi-heures. Une ANOVA factorielle a été réalisée avec le moment de la journée (bloc A, B ou C) et la condition (Contrôle ou Stress) comme facteurs fixes. Il en résulte qu'il n'existe pas d'effet du facteur condition ($F=0.321$, $p=0.571$, $df=1$, $N=5754$), ce qui signifie qu'avant le stress lumineux (blocs A & B), les groupes Contrôle et Stress avaient bien un niveau d'activité comparables, et qu'après le test (bloc C) le groupe Stress a bien retrouvé un niveau d'activité comparable au groupe Contrôle, qui n'a pas subi le stress lumineux.

Il existe cependant bien un effet du moment de la journée ($F=15.995$, $p>0.00001$, $df=2$, $N=5754$). Bien qu'elle varie au cours, l'activité locomotrice moyenne ne passe pas du simple au double d'un moment à l'autre de la journée.

1.6.4 Conclusion et description du protocole retenu

L'activité locomotrice de larves de poisson zèbre varie peu chez les groupes qui ne subissent pas de stress lumineux. La variation de l'activité observée par [MacPhail et al. \(2009\)](#) au cours de la journée semble donc être essentiellement due à la multiplicité des stress lumineux. De la même manière, avec la répétition des stress, nous avons remarqué à la fois une augmentation de l'amplitude de l'activité locomotrice, ainsi qu'une tendance à la baisse dans le temps, mais surtout une augmentation importante de la variation asso-

ciée. Cette augmentation de la variation avec la multiplicité des tests peut masquer une différence entre deux conditions et cette méthode ne semble donc pas être appropriée.

En appliquant un seul stress lumineux, les larves retrouvent rapidement une activité comparable à des larves n'ayant pas subi de stress lumineux. Le protocole choisi est donc le suivant :

- le soir du 4^e jour *post*-fécondation, les larves sont placées dans des plaques multipuits aux parois opaques afin d'éviter qu'elle ne se voit ;
- au 5^e jour, les larves sont transférée dans la salle d'expérimentation (préalablement chauffée et éteinte) 2 h avant le début de l'expérience et placé sur un premier support lumineux afin qu'elles s'acclimatent à la lumière venant d'un plancher ; un intervalle de 20 min est laissé entre le transfert de chaque plaque : le test durant 15 min, ceci permet d'avoir le temps d'intervertir les plaques et d'avoir le même temps d'acclimatation pour chaque individu testé ;
- au moment du test, la plaque est délicatement posée dans la boîte lumineuse, l'enceinte est fermée et l'enregistrement vidéo commence ;
- à 5 min, l'éclairage visible est éteint et les larves ne sont filmées que grâce à la source infra-rouge ;
- à 10 min, la lumière visible est rallumée ;
- à 15 min, la vidéo est arrêtée.

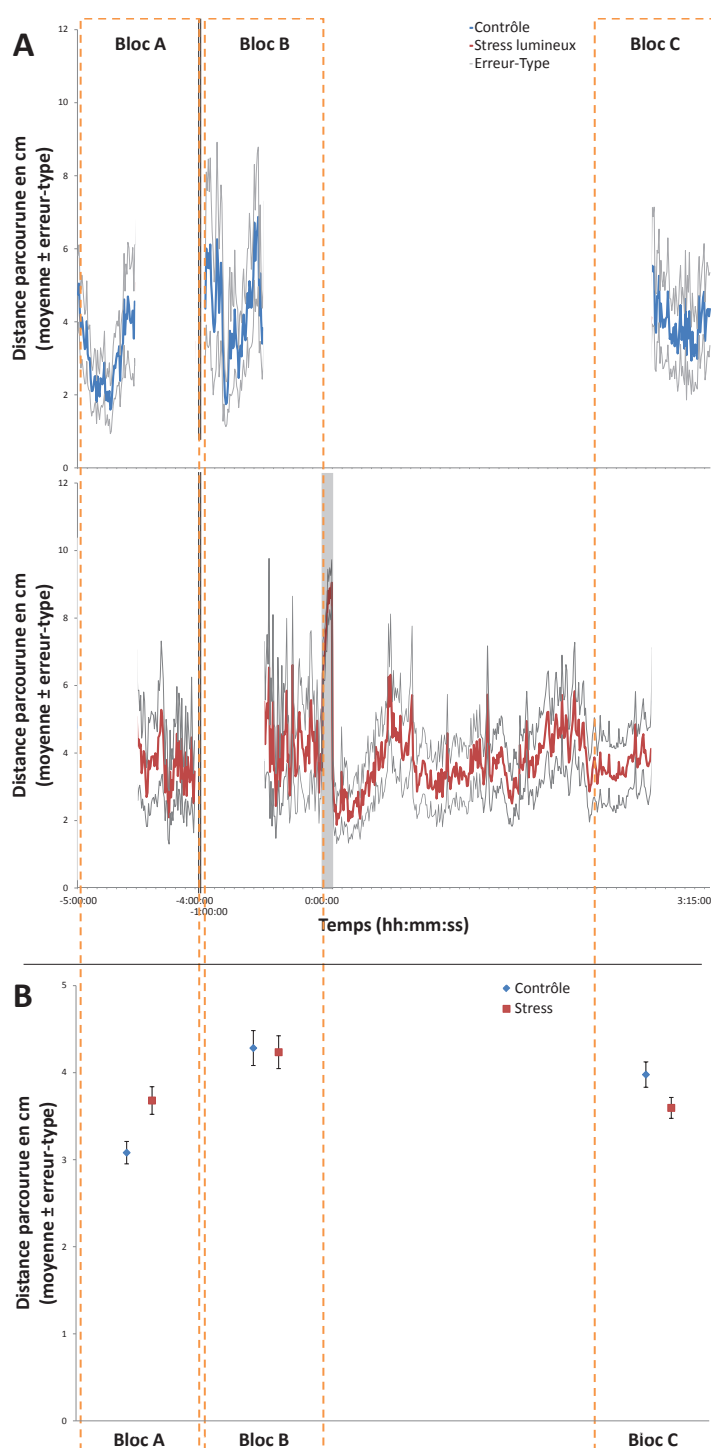


FIGURE 36 – Locomotion moyenne de larves de poissons zèbres (5 dpf) avant, pendant et après une période de 5 min d’obscurité (infra-rouge) et de lumière. **A** : Représentation de l’activité locomotrice des larves témoins (couleur bleue, pas de stress lumineux) et de larves subissant le challenge lumineux (couleur rouge). Le rectangle noir représente les périodes de 5 min d’obscurité filmées par infra-rouge, le lignes pointillées l’erreur type. **B** : Moyennes par demi-heures de l’activité locomotrice des larves témoins (couleur bleue, pas de stress lumineux) et de larves subissant le challenge lumineux (couleur rouge).

Chapitre 2

Présentation du logiciel ODRec (*Observational Data Recorder*) et du *plugin Heatmap From Stack* pour le logiciel ImageJ



Pour mener certains des travaux à réaliser ou cours de cette thèse, différents outils informatiques spécifiques ont dû être mis en place. Ce chapitre vise à présenter deux de ces outils : l'application ODRec (*Observational Data Recorder*), logiciel permettant le codage de séquences comportementales, et *Heatmap From Stack*, un *plugin* pour le logiciel ImageJ servant à analyser la répartition spatiale de groupes d'individus à partir de vidéos transformées en séquences d'images. Ces deux logiciels sont téléchargeables sur le site www.samuelpean.com. Différents résultats obtenus par le logiciel ODRec sont présentés dans ce manuscrit. Le *plugin* pour ImageJ *Heatmap From Stack* a quant à lui été réalisé dans le but d'analyser des séquences de nage en groupe acquises en 2009. Ces séquences concernent des groupes de 6 poissons filmés pendant 2h30 pour 2 conditions de poissons non contaminés et 2 conditions de poissons contaminés aux PCB pendant 250 jours. Cette analyse de la répartition spatiale devait être complémentaire à l'analyse de la distance inter-individuelle moyenne, obtenue par *video tracking*. Cependant, l'ensemble des logiciels de *video tracking* présentés au début de cette partie ont échoué dans le traitement de ces vidéos et l'analyse manuelle n'a pu être mise en place pendant cette thèse au vue du temps considérable qu'il faudrait pour dépouiller toutes les vidéos (12 vidéos – 3 par condition – de 2h30 chacune avec 6 individus sur chaque image). *Heatmap From Stack* étant néanmoins fonctionnel, utilisé dans d'autres expériences (Poster en Fig. 66, Annexe B, p. 216) et répondant en partie aux problèmes de *video tracking* multi-objets soulevés plus tôt, son fonctionnement sera brièvement détaillé dans ce chapitre.

2.1 ODRec : logiciel gratuit et *open source* de codage de séquences comportementales

Comme présenté dans l'introduction générale (voir section 1.2 *La naissance de l'éthologie*, p.5), l'approche par l'étude du comportement est potentiellement non-invasive et non-intrusive (Dawkins, 2007). Ceci est d'autant plus vrai dans le cas où l'acquisition des séquences comportementales ne se fait pas par observation directe (où la présence même de l'observateur pourrait biaiser l'analyse, Martin et Bateson 1993) mais par enregistrement vidéo. Les vidéos acquises doivent ensuite être traitées afin d'en extraire les temps de début et de fin des séquences comportementales, selon un système de codage (Altmann, 1974).

Un bon logiciel de codage de séquences comportementales doit donc être capable d'associer des noms aux différentes séquences d'intérêt, et doit aussi être capable d'en enregistrer les temps de début et de fin. De plus, pour bénéficier pleinement des avantages de l'enregistrement vidéo, l'utilisateur doit être capable de mettre la vidéo en pause, d'avancer ou de revenir en arrière, ou encore d'en changer la vitesse de lecture en l'accélégrant

ou le diminuant.

Différents logiciels existent, mais peu sont longuement maintenus à jour. Leur fonctionnement n'était pas des plus adapté par rapport aux besoins de nos analyses [Hetrick et al. \(1991\)](#); [Tapp et Walden \(1993\)](#); [Tapp et al. \(1995\)](#); [Hänninen et Pastell \(2009\)](#), ou leur coût était très élevé par rapport à l'utilisation que nous allions en faire (The Observer, Noldus, [Noldus, 1991](#); [Noldus et al., 2000](#)).

2.1.1 Description du programme ODRec

Le programme ODRec est écrit en Visual Basic[®], et basé sur les bibliothèques du Lecteur Windows Media[®]. Les bibliothèques dont dépend le programme sont compatibles avec toutes les versions du Lecteur Windows Media[®] des versions 7 à 11. L'utilisation de ces bibliothèques permet au programme ODRec de pouvoir lire tous les formats vidéo qu'est capable de lire le Lecteur Windows Media[®]. Ce programme a été testé sur toutes les versions de Windows[®] suivante : 98 SE, 2000 Pro, XP, Vista and 7.

Le but de ce logiciel est de fournir à l'utilisateur une interface simple et agréable, composée d'une seule fenêtre pour pouvoir gérer à la fois :

- les séquences comportementales à coder ;
- le contrôle de la vidéo.

ODRec se base sur la pression des touches du clavier pour déclencher l'enregistrement des séquences comportementales. Ils est possible d'enregistrer à la fois des comportements ou des évènements externes :

- les séquences comportementales longues, dont le début et la fin sont parfaitement distincts, et pour lesquelles l'utilisateur appliquera une pression de touche pour le début et une seconde pour la fin ;
- les comportements rapides ou les évènements courts, qui ne nécessitent qu'une seule pression de touche pour capturer le moment de leur réalisation.

Le logiciel permet à la fois d'obtenir à la fois la capture la durée d'un comportement, son rythme et sa fréquence.

Un autre des points importants est qu'ODRec ne nécessite aucune installation préalable. Il est donc possible de le copier sur une clé USB et de l'exécuter sur n'importe quel ordinateur fonctionnant sous Windows[®], que l'utilisateur ait les privilèges administrateur ou non. L'interface a aussi été pensée pour être compatible avec les écrans de faible résolution (1024x800 pixels, comme ceux des *netbooks*) mais aussi étirable, afin de pouvoir agrandir la fenêtre vidéo au maximum sur les ordinateurs possédant une résolution plus importante. Pour le moment, seulement neuf types de séquence comportementale sont configurables. Cette limite est essentiellement esthétique, par rapport au placement des



FIGURE 37 – Aperçu de l’interface du logiciel ODRec.

boutons, mais n’est absolument pas une limite technique. Cependant, l’ajout d’un trop grand nombre de séquences comportementales dans ce type d’analyse peut être source d’erreur et différents auteurs préconisent d’en limiter le nombre (Altmann, 1974; Martin et Bateson, 1993).

2.1.2 Utilisation du logiciel ODRec

ODRec est réellement orienté sur la simplicité pour l’utilisateur. Pour lancer une analyse, l’utilisateur devra suivre différentes étapes. Tant que chaque étape n’est pas réalisée correctement, les étapes suivantes resteront grisées, et donc non cliquables pour l’utilisateur.

Étape 1 : Ouvrir un fichier La première étape consiste à cliquer sur le bouton ‘Open a video file’ et à sélectionner le fichier vidéo à analyser.

Étape 2 : Attribution des touches et acquisition Une fois qu’un fichier vidéo a été choisi, le premier type de séquence comportementale est prêt à être configuré. Quand l’utilisateur clique sur le champ de texte, une fenêtre s’ouvre demandant de choisir la

touche qui sera attribuée au déclenchement de l'enregistrement de cette unité comportementale. Cette touche peut être n'importe quelle lettre ou chiffre d'un clavier standard (de type « AZERTY » ou « QWERTY »). L'unité comportementale doit ensuite être nommée (les espaces et les caractères spéciaux dits non latins sont acceptés). Ensuite, si la case *Start-Stop* est cochée, la première pression sur la touche attribuée lancera la capture du début de la séquence comportementale et la deuxième pression en marquera la fin. Si cette case n'est pas cochée, chaque pression sera enregistré indépendamment, ce qui permet de pouvoir enregistrer les comportements soudains ou des événements brefs de la vidéo. Le dernier paramètre configurable est la couleur qui sera attribuée à cette séquence / événement dans le graphique final. Une fois que les paramètres obligatoires (touche du clavier et nom) sont configurés, la deuxième unité comportementale devient à son tour configurable et ainsi de suite jusqu'à la dernière (il est possible de passer à l'étape suivante sans pour autant avoir neuf séquences enregistrées). Une fois que toute cette étape est correctement réalisée, il est possible de sauvegarder l'ensemble de ces paramètres dans un fichier de modèle en cliquant sur *Save as model*. Ce fichier modèle pourra être ouvert lors de l'étude d'une autre vidéo au tout début de l'étape 2, afin d'éviter à l'utilisateur de devoir réaliser à nouveau toute cette étape pour chaque vidéo.

Il est alors possible de commencer l'enregistrement des séquences comportementales. La vidéo peut alors être démarrée. Il est possible, en fonction du format du conteneur de la vidéo (*.AVI, *.MPG, *.WMV, etc.) ou du *codec*¹ d'accélérer la vitesse de lecture du fichier vidéo. L'enregistrement des débuts et des fins des séquences comportementales se fait par la capture du temps de lecture du fichier vidéo au moment où l'utilisateur presse une touche. Ceci peut être effectué indépendamment de la vitesse de lecture du fichier vidéo. Ainsi, pour les séquences très lentes, le fichier vidéo peut être lu en vitesse accélérée sans altération de la capture des séquences. À l'inverse, les séquences comportementales rapides ou les événements furtifs peuvent être acquis à une vitesse réduite de lecture, voire avec le fichier vidéo mis en pause et un défilement en image par image. De même, aucune contrainte n'existe quant à l'ordre d'acquisition des séquences. Une séquence à la fin de la vidéo peut être acquise au début de l'analyse, sans empêcher l'enregistrement des séquences précédentes plus tard.

Deux dispositifs ont été mis en place afin d'éviter les erreurs de manipulation :

- il est impossible d'avoir un temps de fin de séquence situé plus tôt que le temps de début ; un message d'erreur apparaît pour prévenir l'utilisateur, en lui rappelant quel était le temps choisi comme début ;
- lorsque deux parties de la même séquence se chevauchent, un message apparaît pour

1. mot-valise signifiant compression-décompression. Un *codec* permet de compresser un flux vidéo afin d'en réduire le volume (tout en gardant l'information principale), puis de le décompresser en temps réel lors de la lecture.

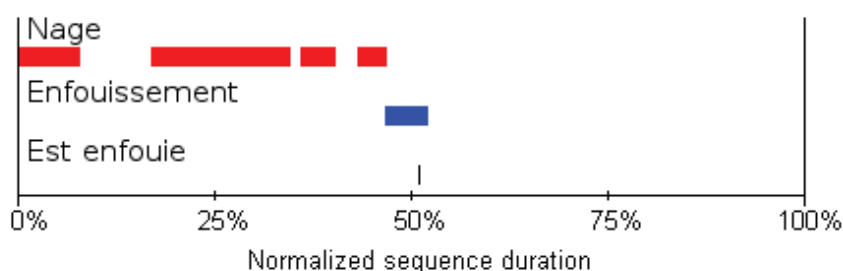
proposer à l'utilisateur de les fusionner ;

Étape 3 : Définir la plage de temps étudiée [Optionnel] Si l'intégralité de la vidéo est à analyser, cette étape peut être omise. Mais dans le cas où l'ensemble de la vidéo n'a pas à être étudié, il est possible de spécifier le temps qui a servi de début d'analyse ainsi que le temps de fin en cliquant sur les boutons *Start xx :xx :xx* et *Stop xx :xx :xx*. Ceci permet à la fois de retrouver le temps total d'analyse (qui sera différent du temps de la vidéo) ainsi que de pouvoir vérifier plus tard si l'analyse a été bien réalisée en retrouvant le temps de début. En cas d'erreur, cette étape peut être annulée en cliquant sur le bouton *Reset*. Cette étape peut être effectuée avant, pendant ou après l'acquisition des séquences comportementales.

Étape 4 : Sauvegarde des données ODrec propose d'enregistrer les données sous différents formats. Le premier est sous forme de graphique (éthogramme au format Bitmap). L'abscisse est normalisée en fonction du temps de la vidéo ou de l'extrait choisi en étape 3. Le second moyen est une sauvegarde des valeurs sous forme de tableau enregistré au format standard *.CSV (*Comma-separated values*). Il s'agit en fait d'un fichier texte dont les valeurs sont séparées par des virgules. Ce type de fichier est dit standard car il est automatiquement reconnu par l'ensemble des logiciels dits « tableurs ». Les premières versions du logiciel permettaient d'enregistrer directement les fichiers au format Excel *.XLS avec un certain nombre de calculs déjà effectués. Cependant, en fonction de la version de Microsoft Excel installée sur l'ordinateur de l'utilisateur, cette étape pouvait échouer. Le format *.CSV n'est quant à lui dépendant d'aucune librairie externe et est plus stable.

2.1.3 Illustration des données obtenues

Dans cette section, l'exemple choisi est celui d'un challenge d'enfouissement de 30 s d'une sole sur un fond sableux. Comme la vidéo était plus longue que la séquence analysée, celle-ci a été raccourcie pour ne commencer qu'à partir du moment où la sole est placée dans le bac expérimental et se termine 30 s plus tard. Dans cet exemple, les temps passés à nager et à s'enfouir sont capturés en tant que séquences comportementales (case *Start-Stop* cochée) et l'instant où la sole est au maximum enfouie (par rapport au reste de la vidéo) est capturé comme événement (case *Start-Stop* non cochée). Les résultats sont affichés en Fig. 38.



	A	B	C	D	E	F
1	Start Time:	00:02.9				
2	Stop Time:	00:32.6				
3						
4	Line#	Nage [Start]	Nage [Stop]	Enfouissement [Start]	Enfouissement [Stop]	Est enfouie
5	1	00:03.0	00:05.3	00:16.8	00:18.4	00:18.0
6	2	00:08.0	00:13.2			
7	3	00:13.6	00:14.9			
8	4	00:15.8	00:16.8			

FIGURE 38 – Graphique et tableau obtenus après traitement d’une vidéo avec le logiciel ODRec.

Un fois ouvert avec un tableur, le fichier *.CSV (38), permet de retrouver quelle partie de la vidéo a été analysée (*Start Time* en cellule B1 et *Stop Time* en cellule B2). Ensuite, les séquences comportementales sont réparties selon les colonnes. Les séquences définies par un temps de départ et de fin sont réparties sur deux colonnes. La fréquence d’un comportement est donc mesurable par le nombre de lignes et la durée moyenne elle aussi calculable par la différence entre le temps *Stop* et le temps *Start* pour chaque ligne.

2.2 HeatMap From Stack : plugin pour le logiciel ImageJ servant à l’analyse de la répartition spatiale en groupe

Comme montré précédemment (voir section 1.4.1 *Avantages et limitations du video tracking automatique*, p.54), analyser automatiquement des vidéos de groupes d’individus peut s’avérer difficile par les techniques de *video tracking*, qui demandent une distinction parfaite de l’identité des individus sur l’ensemble de la vidéo. Cependant, une partie de l’information peut néanmoins être extraite de ces vidéos, indépendamment de la reconnaissance individuelle. Une de ces approches est l’analyse de la répartition spatiale des individus tout au long de la vidéo. Un premier outils (appelé SEE_FISH) a été mis

en place au sein du laboratoire pendant la thèse de Sandie Millot (Lebon, 2007; Millot, 2008), mais celui-ci n'était pas utilisable pour nos expériences (acquisition d'image différente, densité d'individus trop faible dans notre cas, etc.). L'adaptation de cette méthode d'analyse dans notre cas a été rendue possible au travers d'un logiciel d'analyse d'image gratuit et *open source* appelé ImageJ. En plus d'être facilement modifiable par l'ajout de modules complémentaires, le logiciel ImageJ a aussi pour avantage d'être écrit en Java, et donc utilisable sur n'importe quel système d'exploitation (Linux, MacOS ou Windows).

2.2.1 Principe de fonctionnement

Le logiciel va analyser les pixels de chaque image à la recherche des valeurs de gris définies par l'utilisateur. Le score de chaque pixel (en fonction de sa position x,y) est incrémenté pour chaque image où sa valeur de gris correspond à la plage d'intérêt. À la fin de la séquence d'image, un graphique permet de visualiser les pixels qui ont obtenu le plus grand score, et donc les zones où les individus ont passé le plus de temps. En plus du graphique, l'image va être subdivisée en sous-parties de dimensions égales selon le nombre défini par l'utilisateur. Un tableau présentant le nombre de pixels d'intérêt comptés par sous-parties est présenté, ainsi que d'autres statistiques (telles que le score maximal atteint, le nombre total de pixels comptés, etc.).

2.2.2 Pré-requis

L'utilisation du *plugin* nécessite tout d'abord d'avoir le logiciel ImageJ d'installé. De même, il faut que la vidéo soit convertie en séquence d'images. Ceci est possible en passant par le logiciel gratuit *VirtualDub* (tutoriel vidéo disponible dans la section *How to convert a video file to image sequence?* du site www.samuelpean.com). La séquence d'image doit ensuite être ouverte dans le logiciel ImageJ (*File > Import > Image sequence*) et convertie en 8- ou 16-bit (*Image > Type*).

Pour obtenir un meilleur résultat, il est conseillé de supprimer le fond pour l'ensemble de la séquence d'image pour ne garder que les individus à suivre. Ceci est facilement réalisable par soustraction à l'ensemble de la séquence d'une image ne comportant pas les individus. Si toutefois la vidéo ne comporte pas d'images où les individus sont absents, un autre *plugin*, appelé *Image Stack Merger Plus* a été mis en place afin de pouvoir reconstituer une image de fond à partir d'une séquence d'image comportant des individus mobiles. Cet autre *plugin* et un *tutoriel* expliquant son fonctionnement se trouvent également sur le site www.samuelpean.com.

Le *plugin* peut être démarré depuis le menu *Plugins*.

2.2.3 Lancement du *plugin*

Au lancement du *plugin*, différentes options s’offrent à l’utilisateur, réparties sur deux boîtes de dialogue (Figs. 39). La première option configurable est la plage de gris à prendre en compte dans l’analyse. En effet, la gamme de couleur des individus doit être différente de celle du fond de l’image. La plage entrée dans le logiciel doit inclure la couleur des individus tout en excluant la couleur du fond. La deuxième option permet d’entrer les coordonnées de la zone étudiée, dans le cas où l’arène explorée par les individus ne couvrirait pas l’ensemble de l’image. Ensuite, il est possible de déterminer le nombre de sous-divisions de la zone d’étude.

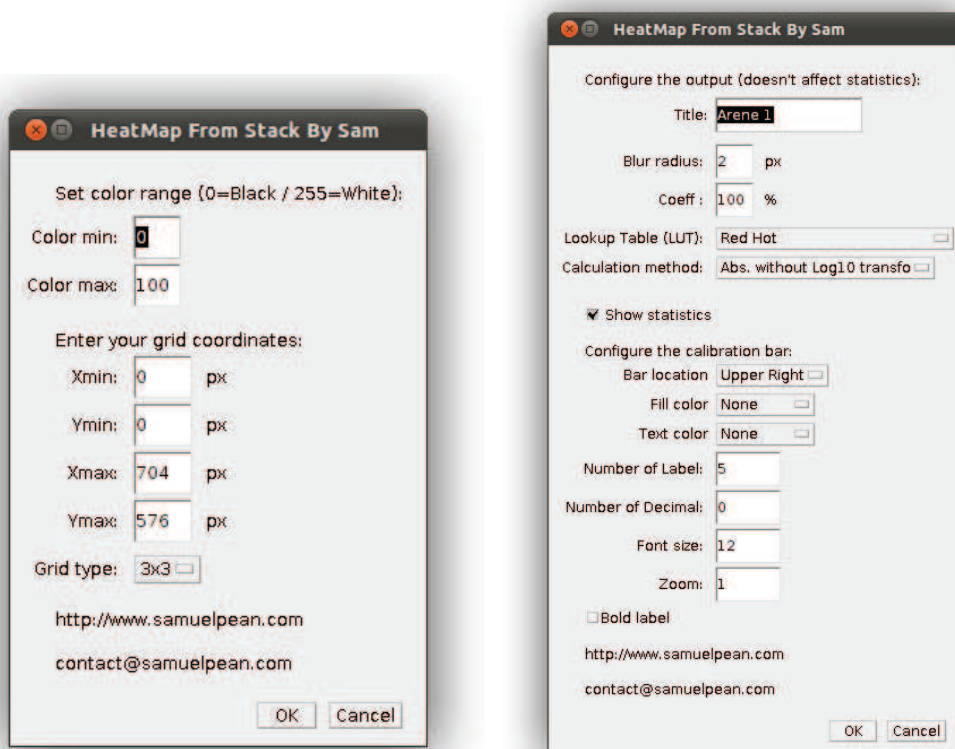


FIGURE 39 – Aperçu des deux fenêtres successives de l’interface du *plugin* pour ImageJ *Heatmap From Stack*

Les options suivantes permettent en premier lieu de donner un nom à l’analyse et de régler le rayon du flou gaussien appliqué sur le graphique final. L’option *Coeff* permet d’augmenter ou diminuer tous les scores selon la valeur indiquée en pourcents au moment de la réalisation du graphique. L’option *Calculation method* propose différentes méthodes de calcul concernant le rendu du graphique final. Il est en effet possible de pondérer le nombre de pixels en fonction :

- du nombre total d’images (méthode dite « absolue ») : avec cette méthode, un pixel apparaîtra avec un score maximal sur le graphique si et seulement si la plage de gris d’intérêt est détecté durant toute la durée de la séquence et donc sur toutes les images ; cette méthode est recommandée pour les études réalisées avec un grand nombre d’individus ;
- du nombre maximal atteint (méthode dite « relative ») : avec cette méthode, le pixel qui a atteint le plus grand score apparaîtra avec un score maximal sur le graphique ; cette méthode est recommandée pour les études réalisées avec un faible nombre d’individus placé dans une grande zone d’étude ; **ATTENTION** : étant donné que cette méthode est relative, il est déconseillé de comparer les graphiques obtenus d’une série d’image à l’autre sans préciser les scores maximaux respectifs.

Pour chacune de ces deux méthodes, une transformation logarithmique peut-être appliquée au moment de l’affichage du graphique afin d’éliminer les valeurs les plus faibles, correspondant au bruit de fond.

L’ensemble de ces réglages (rayon du flou gaussien, coefficient, méthode de calcul relative ou absolue, transformation logarithmique) ne concerne que l’affichage du graphique et non le calcul des valeurs données dans le tableau de comptage et la fenêtre des statistiques. Il s’agit là uniquement de réglage esthétique par rapport au choix de représentation. Les dernières options concernent l’affichage ou non des statistiques et le paramétrage de la barre de calibration.

2.2.4 Résultats obtenus

Les résultats obtenus se composent de trois fenêtres (Fig. 40) :

- le graphique, selon les paramètres choisis par l’utilisateur ;
- le tableau montrant le nombre de pixels comptés par zones (défini par la position de la grille et son nombre de sous-divisiones) ;
- la fenêtre récapitulative, qui permet de connaître les statistiques (nombre de pixel comptés au total, score maximal obtenu, etc.) ainsi qu’un rappel des paramètres utilisés pour cette analyse ;

Dans le cas de l’exemple illustré en Fig. 40, le tableau indique que la zone la plus utilisée est celle est C3 (en bas à droite sur le graphique) avec un score de 36 087 pixels comptés, et celle la moins utilisée est la zone B2 (en haut au centre sur le graphique) avec un score de 130 pixels comptés. La fenêtre de statistiques indique, entre autre, que la surface de l’arène explorée est de 18.4%.

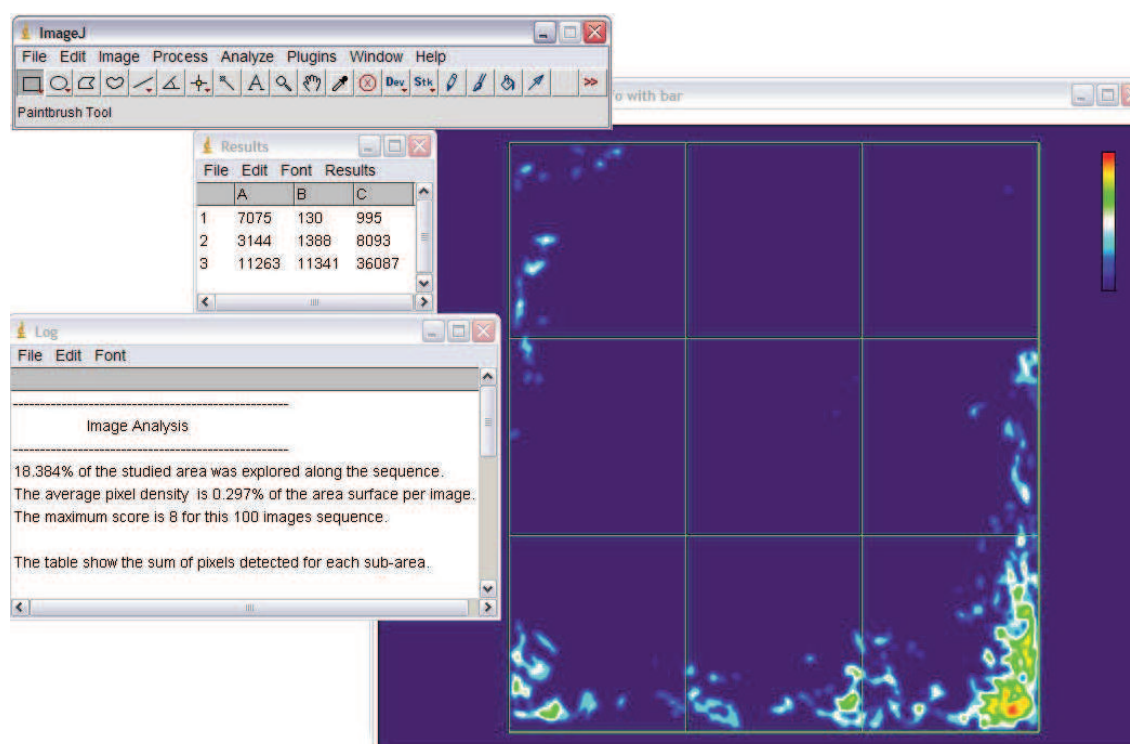
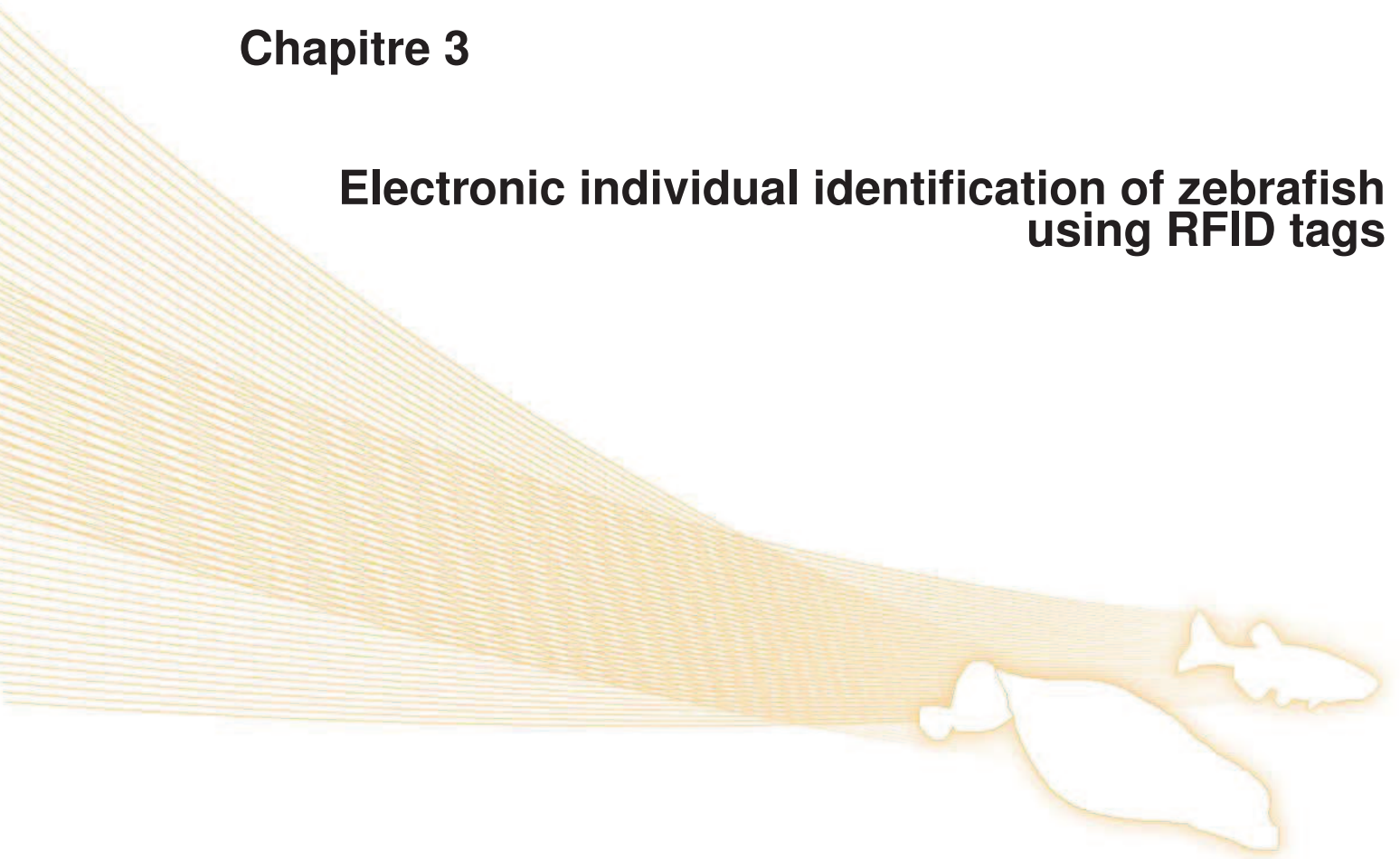


FIGURE 40 – Aperçu des résultats obtenus par le *plugin* pour ImageJ *Heatmap From Stack*.

Chapitre 3

Electronic individual identification of zebrafish using RFID tags



Xavier COUSIN
Tarek DAOUK
Samuel PÉAN
Laura LYPHOUT
Marie-Élise SCHWARTZ
Marie-Laure BÉGOUT

Résumé

Bien que l'utilisation de marques électroniques de type PIT-tags soit courante chez les poissons, elle n'est souvent possible que pour des individus de plus de 60 mm, et inapplicable dans le cas d'individus dont la taille est inférieure à 30 mm, comme le poisson zèbre. Pour la première fois, nous avons utilisé des micro-tags RFID (NONATEC®) afin d'identifier individuellement des juvéniles de poissons zèbres (taille 16-42 mm, poids 138-776 mg). Les marques ont été insérées dans la cavité intra-péritonéale puis différentes variables ont été suivies telles que les taux de survie, de perte de tag, de croissance et de reproduction, ainsi que le comportement exploratoire. À la fois de forts taux de survie (de 82 % à 5.5 mois après le marquage) et une faible perte de marque (11 %) ont été atteints. Le plus petit individu ayant survécu au marquage pesait 178 mg, et le taux de succès de relecture de la marque de la classe de taille moyenne (350-450 mg, 26 mm) était de 73 %. Aucun effet négatif sur la croissance ou la reproduction n'a été observé. De même, l'étude du comportement exploratoire n'a montré aucune différence entre les individus non marqués et ceux marqués depuis deux mois. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que cette méthode de marquage est tout à fait appropriée pour les modèles de petite taille comme le poisson zèbre.

Au vu du fort taux de succès de marquage par micro-marques RFID chez les juvéniles de poissons zèbres, ainsi que son faible impact sur la survie, la croissance et le comportement exploratoire, cette technique a été utilisée sur les juvéniles de soles lors des expériences de contamination aux PCB par voie alimentaire (Chapitre 4, p. 107).

L'utilisation de marques électroniques individuelles permet en effet d'obtenir un suivi individuel pendant une longue durée, et ainsi d'avoir l'historique de croissance d'un individu. Ceci est un atout majeur dans le cas de l'étude d'une contamination par voie alimentaire.

Electronic individual identification of zebrafish using RFID tags

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

Abstract: Although individual electronic tagging using PIT-tags is established, it is mainly for fish > 60 mm length and unsuitable for fish < 30 mm, like zebrafish. We used RFID micro-tags (NONATEC®) to individually identify juvenile zebrafish (size 16-42 mm, mass 138-776 mg) for the first time, and studied the effects of intracoelomic implantation on survival and tag loss, growth, spawning and exploratory behavior. Both high survival (82 % 5.5 mo after tagging) and low tag loss (11 %) were achieved. The smallest surviving fish weighed 178 mg, and success in tag reading was 73 % for the size class 350-450 mg (26 mm). No negative effects on growth were observed and some tagged fish spawned. No significant differences in behavioral responses could be detected between tagged fish and untagged controls after two months. Overall, results suggest the tagging method is highly suitable for fish as small as zebrafish juveniles.

Keywords: swimming activity, generation, ADHD, organic pollutant effects, video analysis

3.1 Introduction

In recent years, the zebrafish, *Danio rerio*, has become a widely used model for vertebrate genetics and developmental biology. Several thousand mutants and transgenic lines have been produced and laboratories commonly rear several of these lines simultaneously. In most cases, these fish cannot be distinguished by eye, meaning that fish from different lines must be kept in different tanks. From a practical viewpoint, this requires laboratories to manage large rearing facilities housing several hundred tanks, which is both costly and time-consuming in terms of husbandry (Sire *et al.*, 2000). Moreover, rearing problems may occur in zebrafish if populations are small because this interferes with shoaling behavior, especially as shoaling in this species has been shown to increase significantly with age (Buske et Gerlai, 2011). Furthermore, because small fish such as zebrafish (<= 30 mm SL) are not aggressive and do not fight when kept in groups, it would be possible to keep numerous similar-sized specimens in a single tank, leading to a drastic reduction in tank numbers. However, recognizing individual fish is impossible unless they can be tagged individually. This problem also applies to other small species (*e.g.*, medaka, guppy) and to juveniles of larger species. The ability to recognize individuals within a large population of similar-sized congeners has long been regarded as useful, notably for

fisheries research (*e.g.*, growth rate estimations), ecology (*e.g.*, migration) and population dynamics studies. It is also the case in experiments when one needs to identify specific lines that have no external phenotypes (*e.g.*, mutant or transgenic lines) or to monitor the same individuals over a long time period (*e.g.*, multiple challenges in behavioral analysis, or monitoring of growth or spawning).

Since the end of the nineteenth century, when the first successful mass marking of fish was reported, various techniques have been developed to tag or mark teleosts. These methods now include several ways of tagging relatively large individuals with different types of external or internal tags, and marks made of a diversity of materials, as well as genetic and chemical markers (Jakobsson, 1970; Parker *et al.*, 1990). For small animals, however, few efficient solutions are available and the situation is even more complicated for fish due to their living medium and skin/scales, which preclude the use of external tagging methods such as conventional painting. Overall, although a wide range of techniques is now available to tag or mark fish (Bégout *et al.*, 2012), they are either difficult to apply to small specimens or the marks are liable to disappear progressively, as is the case with fin ablation. One alternative method with a high marking success rate is scale regeneration following precise removal of a number of scales in a known position (Sire *et al.*, 2000), but this method requires careful observation of the scale pattern under a dissecting microscope and long periods of fish handling, which are hardly compatible with studies that require frequent handling. Subcutaneous ink or acrylic paint injection has also been successful for long-lasting readability on aquatic animals (Herbinger *et al.*, 1990), as have visible implant (VI) elastomer or alphanumeric tags (NMT, WA, USA), which have been reported to be successfully used with small aquatic animals (*e.g.*, shrimps Dinh *et al.*, *in press*; Brown *et al.*, 2003; Imbert *et al.*, 2007; Jensen *et al.*, 2008; Pillai *et al.*, 2009). These tags are inserted under the skin, which needs to be as transparent as possible because the alphanumeric code has to be read through it. In our experience, however, none of these tagging methods was successful with zebrafish: paint tags faded away and VI tags were lost after two to three weeks.

Internal, solid tags have been used as an alternative to external tagging for some time (Buckley et Blankenship, 1990), and more recently small electronic tags (Passive Integrated Transponder, PIT) have been injected into the body cavity in several fish species as monitoring systems and individual identification (Prentice *et al.*, 1990; Baras *et al.*, 2000). The smallest PIT tags are approximately 12 mm long, 2 mm diameter, 95 mg in mass, making them unsuitable for use on specimens less than 60 mm (Baras *et al.*, 2000), but new products are also appearing such as the 'tiny' version of the PIT tag (8 mm long, 1.4 mm in diameter but still 34 mg). A very recent product, which has been used to document behavior in insects (ants Moreau *et al.*, 2011 and bees (Decourtye *et al.*, 2011)) is the RFID micro-tag. These tags are suitable for zebrafish size but have not, to our

knowledge, ever been used on fish. In the present study we tested RFID glass micro-tags (NONATEC[®], Fig. 41) to individually identify juvenile zebrafish and evaluated the effects of intracoelomic implantation on both routine endpoints, such as survival, tag retention and growth, and sublethal effects, such as those on spawning and exploratory swimming behavior. Our study is the first use of these tags for this application and advances research on the surgical implantation of electronic tags in fish, as recommended in the literature (Cooke *et al.*, 2011).

3.2 Methods

3.2.1 Fish and tag insertion

A batch of 6-week-old juvenile zebrafish, *Danio rerio*, was bought from a fish supplier (Elevage de La Grande Rivière, Calluire, France) and acclimated to our facilities for two months before experimentation. Radio frequency identification glass microtags (RFID NONATEC[®], Lutronics Luxembourg) are a new generation of tags that operate at a high frequency (13.56 MHz), allowing the identification of very small individuals using a laboratory bench arm reader on fish under anesthesia. NONATEC[®] tags are 1 mm in diameter and 6 mm in length, with a mass of 10 mg (Fig. 41). For tag insertion, fish were put under mild anesthesia using 50 µl/100 ml Ethyl-p-aminobenzoate (Benzocaine, Sigma: E1501-100G), made from a stock solution consisting of 5 g Benzocaïne dissolved in 50 ml 100 % ethanol. To minimize handling duration, anaesthesia was performed on batches of 10 fish. The glass microtags were cleaned and stored in 70 % ethanol prior to utilization and optimal aseptic conditions were maintained by cleaning the bench and all instruments with 70 % ethanol.

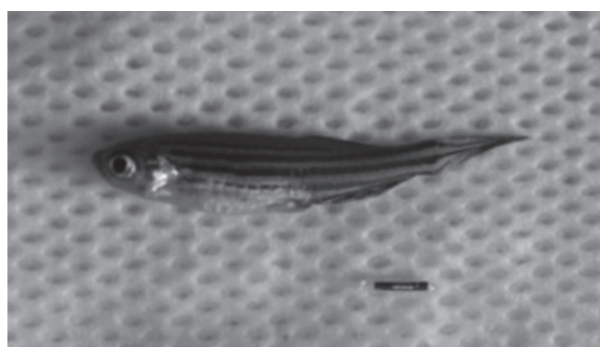


Figure 41: Picture of a zebrafish and a RFID NONATEC[®] glass tag; diameter 1 mm, length 6 mm, mass 10 mg.

After about 30 s anesthesia induction, fish were measured for mass (to the nearest mg)

and length (to the nearest mm) and then placed sideways on the bench. Intracoelomic implantation was then performed by piercing a hole in the abdominal cavity using a 22G needle, taking care only to pierce the body wall muscle and not to insert the needle too far into the cavity so as to avoid damaging any organs. A tag was then transferred from 70 % ethanol to sterile physiologic serum (9 g/l NaCl) for rinsing, picked up with Dumont n°3 forceps and inserted into the abdominal cavity through the hole made earlier, where it was pushed until it was fully inside (see video in Supp Mat). The whole procedure was routinely performed within 30 s and care was taken to limit the time the fish was out of the water to improve experimental success. Fish were then transferred to a tank of clean water for recovery from anesthesia and handling, and allowed 10-15 min resting before being returned to their rearing tanks (20 l glass tanks in a zebra rack). Fish death and tag loss were monitored by daily tank inspection.

Two tagging experiments were conducted: in the first (Exp. 1, 71-days duration), 98 fish were tagged and 34 were used as controls (initial mean mass (\pm SD) 361 ± 117 mg, within the range 139-712 mg). Tagged fish were put into three tanks in groups with similar mean mass and coefficient of variation of mass, control fish were placed in one tank. For the second experiment (Exp. 2, 167-days duration), 140 fish were tagged and 343 were used as controls (initial mean mass of 420 ± 125 mg, within the range 138-776 \pm mg). Tagged fish were divided between 6 tanks and control fish between 14 tanks. We used a comparative approach between the two treatments (control untagged vs. tagged fish) to compare the variables detailed below.

3.2.2 Feeding regime and Growth monitoring

Fish were fed on dried feed (TetraMin® PRO Tropical Crisps), milled for better quantification of the ration, which was set at 1.5 % of wet body mass. Every fortnight, biometric measurements were taken according to a standard protocol: fish were fasted the preceding day, anaesthetized as described above, measured for mass (to the nearest mg) and length (to the nearest mm) and put to recover in fresh clean water before being returned to their respective tanks. During the biometry measurements, tags were read using an arm reader (Lutronics, Luxembourg) connected to a computer, and corresponding mass and length were recorded in a spreadsheet. Occasional tag failure or loss was noted.

Specific growth rate (SGR) was calculated as the mass increase between biometry divided by the time interval between them (days) and expressed in %. For tagged fish, SGR was calculated at the individual level whereas for untagged fish it was calculated at the group level using mean mass.

$$SGR_M(\%) = 100 \cdot \frac{(\ln M_2 - \ln M_1)}{T}$$

where: M_1 is fish mass at date 1
 M_2 is fish mass at date 2
 T is date 2 – date 1, in days
 \ln is natural log

3.2.3 Spawning

To evaluate spawning ability, couples were set up in spawning boxes every 2 weeks over two months, starting 1 mo after tagging. Eggs were collected in the morning and fish tag identities recorded. To evaluate reproductive characteristics, eggs were counted and sorted, unfertilized eggs were counted and removed, and the remaining eggs left to develop.

3.2.4 Behavior

We used swimming behavior as an integrated indicator to evaluate the possible influence of tagging on fish. Control tagged and untagged fish were subjected to an exploratory assay in which fish were put in the start arm of a T-maze, slightly adapted from [Ninkovic et Bally-Cuif \(2006\)](#), in order to monitor swimming characteristics (distance travelled and temporal space use) in either: i) a shallow area, which was 5 cm in water depth, composed of the start arm (46 cm long), the arm leading to the deep area ('correct arm') and the 'wrong arm', in the opposite direction to the deep area (total length of these two arms was 66 cm) or ii) a deep area, which was 10 cm in water depth, 23 cm wide and 23 cm long, had marbles and plastic grass and was considered a favorable zone ([Ninkovic et Bally-Cuif, 2006](#)). Fish were placed individually in a 1-L tank in the experiment room the day before the recording. For each trial, a single fish was removed from its tank and placed in the start area of the longest arm of the T-maze; then exploration activity was immediately recorded for 3 min. All runs were accomplished in one day (10h-19h) and 20 fish were screened per treatment (control untagged vs. tagged fish in sequence). This experiment was conducted 2 months after tagging.

Videos were recorded with an analog camera (Panasonic CCTV WV-CL920A) linked to a PC with an acquisition card. Track extraction and analysis were then performed with Ethovision XT software (Noldus, The Netherlands), images were acquired at 25 frames per second and extracted data nested every 30 s for saving.

The variables chosen to evaluate behavioral performances were as follows:

- time spent (in s) by a fish in the different zones of the T-maze ;
- velocity (in $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$): the distance moved by the centre point of the individual fish per unit time between two consecutive X-Y coordinates acquired. Mean and SEM were calculated for each fish and each zone. Data reported here are of velocity in shallow zone.

3.2.5 Statistical tests

Data were statistically tested using Statistica 9.0 (Statsoft, USA). For each variable, a Shapiro-Wilk test was performed to check the normality, and a Bartlett's test to check the homoscedasticity. As normality and homoscedasticity rules were not respected, Mann-Whitney-*U* or Kruskal-Wallis tests were used (Zar, 1999), followed by multiple comparison rank tests. For survival and growth related variables (mass and SGR) we used Kruskal-Wallis tests to analyze sex and treatments effects. To refine our analyses, we made a class analysis of survival, body mass and SGR in relation to mass at tagging and sex for live tagged fish kept until 167 days post tagging. To this end, we made 100 mg interval classes and used a Kruskal-Wallis test followed by Dunn's *post-hoc* tests to compare body mass gain and SGR within sex and between classes.

For each swimming variables (time spent in each zone, velocity in the shallow zone), Mann-Whitney-*U* tests were performed to compare results between the two treatments (control untagged *vs.* tagged fish). All statistical analyses were carried out at a 95 % level of significance.

3.3 Results

3.3.1 Evaluation of tagging procedure success

Two batches of fish originating from the same initial batch were tagged in two successive experiments (Exp. 1: 98 tagged fish studied for 71 days, Exp. 2: 140 tagged fish studied for 167 days). Experiment 1 was a pilot experiment to evaluate suitability of tag size and insertion procedure. During the entire duration of the experiments, fish death and/or tag loss were monitored daily (Tab. 2), with survival and tagging success, expressed as the number of tagged fish remaining over time and as the percentage of tag retention in relation to sex and fish mass at tagging (Fig. 42).

Table 2: Fish number and growth for untagged control and tagged fish and according to sex. For untagged control and tagged fish of each sex, the first group of rows gives survival in numbers and percentages relative to initial number of fish in each column. The second group of rows gives mass (mean±SEM) on the post-tagging biometry measurement days (Biom1, 5 and 8). The third series of rows gives specific growth rates between biometry measurement days 1 and 5 (SGR1) and 5 and 8 (SGR2). There was no significant difference between control untagged and tagged fish.

	Female		Male	
	Untagged	Tagged	Untagged	Tagged
Initial numbers	216	91	127	49
Dead fish (running sum; (percentage relative to initial number))				
Biom 5	41 (19.0%)	4 (4.4%)	13 (10.2%)	5 (10.2%)
Biom 8	59 (27.3%)	15 (16.5%)	29 (22.3%)	10 (20.4%)
Body mass (mg; mean±SEM)				
Biom 1	521.1±10.6	533.7±13.7	406.9±8.1	423.0±11.3
Biom 5	714.1±15.6	734.8±18.7	512.8±10.2	485.0±14.0
Biom 8	914.8±20.1	958.3±25.8	564.2±14.6	581.6±16.2
Specific growth rates (from mean mass; (calculated from individual values mean±SEM))				
SGR1	0.50	0.51 (0.41±0.03)	0.37	0.22 (0.22±0.04)
SGR2	0.44	0.47 (0.49±0.04)	0.17	0.32 (0.26±0.04)

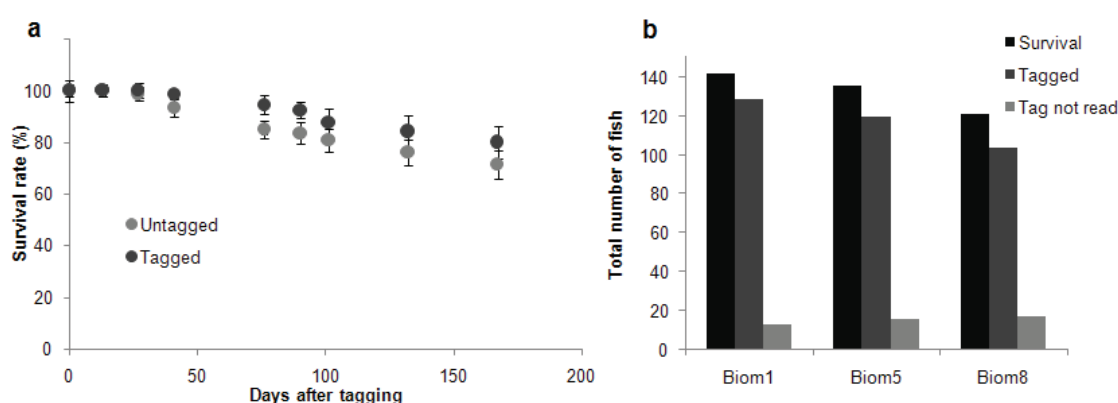


Figure 42: Monitoring of survival and tagging success over time. **A:** Survival rate of untagged control and tagged fish (mean±SEM). No significant difference was observed. **B:** Tagging success was evaluated as the number of fish in which the tag could be read. Failure to obtain a reading was usually due to tag loss but, in a few cases, a tag that could not be read at one biometry measurement session was readable at the next. It should be noted that most tag loss occurred before the first biometry measurement (13 days after tagging).

In the first experiment, some fish death and tag loss occurred, mainly during the first three weeks following tag insertion. After two months there had been a total of 15 fish deaths (15 %) and 28 tags lost or not successfully read (28 %). The smallest surviving fish was 178 mg at tagging. Over the 71 days, survival rate of tagged fish (85 %) was higher than that of control fish (58 %).

For the second experiment, performed later on, we used an improved method in order to shorten the insertion procedure as much as possible and thus limit the period out of water and stress caused. The tagging procedure took around thirty seconds (see Methods section). In this experiment, 140 fish were tagged. The improved methodology and use of slightly heavier fish allowed fish death to be limited to 25 (17.9 %) and tags lost/unreadable to 15 (10.7 %) after 167 days (5.5 mo) (Fig. 42). Survival rate of tagged fish (82 %) was higher than that of control fish (74 %) and no significant effect of sex was observed (survival of tagged fish was 83.5 % for females and 79.6 % for males *vs.* 72.6 % and 77.1 % for control untagged females and males respectively, Tab. 2).

The analysis of survival in relation to mass at tagging and sex showed that there was a trend for a decrease in mortality with increasing initial mass and that this was independent of sex (Tab. 3). A survival of 82 % was obtained for fish from the 350-450 mg mass class.

3.3.2 Growth rate

Mass and length measurements were taken at fortnightly intervals in order to monitor the possible negative effects of tagging on fish growth (Fig. 43).

No significant difference in growth was observed between treatments (control untagged *vs.* tagged fish, Tab. 2). Females were heavier than males in both treatments and this difference increased over time as their gonads matured. This male/female difference was particularly clear for the specific growth rates (SGR), which were higher for females than for males. For control untagged fish, SGR could only be calculated based on mean growth. The same calculation was performed for tagged fish, at the individual level (Tab. 2). Values obtained could not be compared directly using a statistical test, but it appeared that SGR of individual tagged fish were very probably no different from the mean SGR of the untagged controls.

The actual SGR calculated from individual weight is also indicated for tagged fish and some differences can be noticed with the value calculated based on mean mass.

In order to further characterize growth of fish depending on their initial mass, we took the opportunity to monitor fish individually over time, which allowed us to calculate body growth and SGR for each sex and for each fish in the same mass-at-tagging classes as defined in Tab. 3 and Methods section. For each sex, mean mass followed the initial

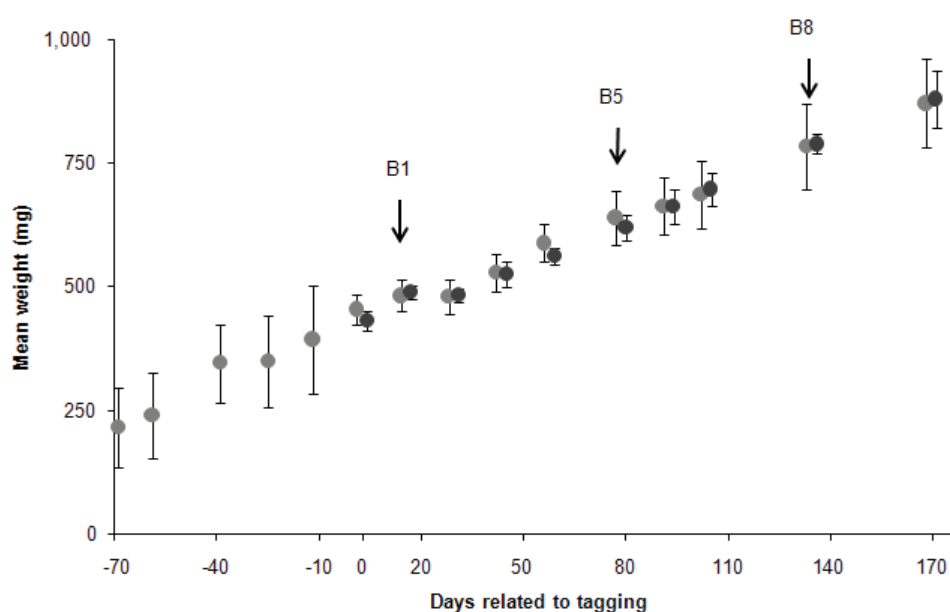


Figure 43: Growth monitoring of control untagged (pale symbols) and tagged fish (dark symbols) over 6 months. Fish growth was monitored for the two months before tagging in order to detect possible deviations of growth rate after tagging. After tagging, weight of control untagged fish and tagged fish are shown for every biometry measurement point and no significant difference can be observed (mean \pm SEM). Biometry measurement points 1, 5 and 8 (13, 76 and 132 days after tagging, respectively), which are given in tables 1 and 2, are indicated by arrows.

grouping but differences between classes diminished gradually. In addition, variation in mass within any one class increased with time, as illustrated by SEM increase. SGR appeared inversely correlated to initial mass but this relationship was only significant for SGR1 of males, due to the very large variation of the other calculated SGR values.

3.3.3 Spawning characteristics

Although fish were handled frequently, spawns were obtained over the course of this experiment. Starting 1 mo after tagging, in fortnightly trials made over two months, we obtained 11 spawns involving 5 different males and 4 different females for Exp. 1 and 20 spawns involving 10 different males and 11 different females for Exp. 2. A similar low number of spawns was obtained with untagged control fish. In all cases, fertilization rate and larval survival were similar to usual levels.

Table 3: Tagged fish numbers and growth according to sex and initial mass. Tagged fish were grouped by sex and mass classes at tagging of 100 mg, except the largest class for female, which ranges from 651 to 850 mg. The first group of rows gives success in tag reading in numbers and percentages relative to initial numbers of fish in each class (differences include both dead fish and failure to read tags). The second group of rows gives mass (mean±SEM) at the post-tagging biometry measurement days (Biom) 1, 5 and 8. The third series of rows indicates specific growth rates (mean±SEM) between biometry measurement days 1 and 5 (SGR1) and 5 and 8 (SGR2). In the Statistical group rows (Stat.group) different letters indicate significant differences between classes, by sex, according to a Kruskal-Wallis test followed by a Dunns *post-hoc* test; $p < 0.05$.

Weight class (mg)	Female					Male			
	0-250	251-350	351-450	451-550	551-650	651-850	251-350	351-450	451-550
Initial numbers	3	13	29	21	18	7	15	27	7
Success in tag reading (number of fish read (percentage of initial number))									
Biom5	2 (66.7%)	9 (69.2%)	27 (93.1%)	21 (100%)	18 (100%)	6 (85.7%)	15 (100%)	24 (88.9%)	7 (100%)
Biom8	2 (66.7%)	7 (53.8%)	24 (82.8%)	19 (90.5%)	14 (77.8%)	6 (85.7%)	10 (66.7%)	17 (63%)	17 (100%)
Body mass (mg; mean±SEM)									
Biom1	269.3±20.3	393.3±21.9	482.8±9.0	554.8±12.5	645.1±13.4	770.1±42.1	352±9.8	438.5±5.6	547.2±14.1
Stat. group	a	a	ab	bc	c	c	a	b	b
Biom5	412.3±77.6	533.8±34.9	632.3±23.3	752±31.5	799.1±30.7	1004±42.9	417.1±23.1	510.4±16.8	595.2±25.6
Stat. group	ab	a	ab	bc	c	c	a	b	b
Biom8	706 ±110	711.3±65.4	876.8±58.9	979.4±51.6	1014±50.5	1146±75.6	545.6±21.7	596.7±24.6	646.2±19.8
Stat. group	ab	b	ab	ab	a	a	a	a	a
Specific growth rates (mean±SEM)									
SGR1	0.7±0.3	0.47±0.12	0.44±0.05	0.49±0.04	0.29±0.04	0.31±0.08	0.35±0.02	0.23±0.04	0.13±0.03
Stat. group	a	a	a	a	a	a	a	ab	b
SGR2	0.96±0.29	0.52±0.16	0.6±0.04	0.41±0.08	0.42±0.06	0.32±0.07	0.3±0.09	0.27±0.05	0.15±0.06
Stat. group	a	a	a	a	a	a	a	a	a

3.3.4 Swimming behavior

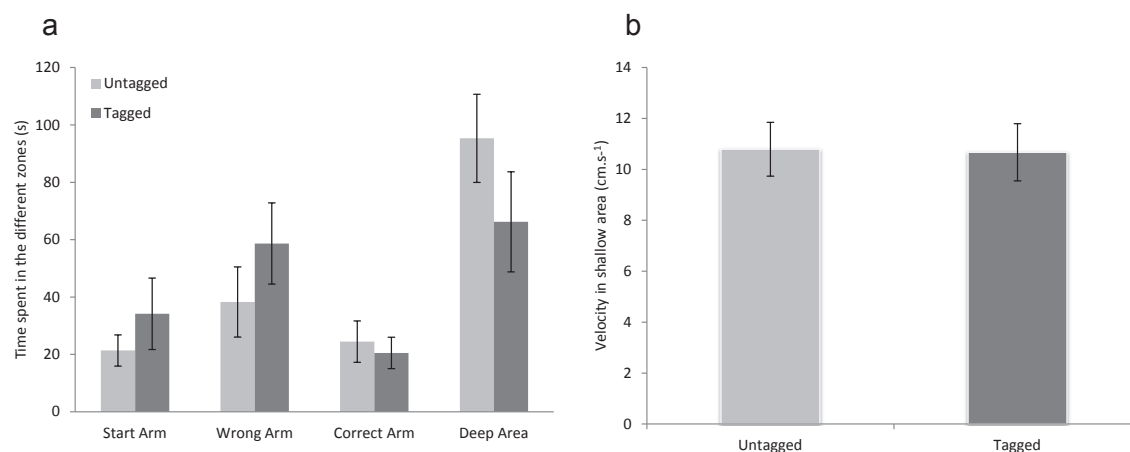


Figure 44: Swimming activity observed in a T-maze challenge. **A:** Fish were introduced in the start arm and had to swim through the correct arm to reach the deep area which is supposedly the preferable one (Ninkovic et Bally-Cuif, 2006). The other three areas are straight and shallow. Time spent in the deep area was longer than that spent in the other three areas. No significant difference could be observed between control untagged and tagged fish in any of the zones (mean±SEM; Mann-Whitney- $U_{\text{Start Arm}}=153$, $p>0.77$; MW- $U_{\text{Wrong Arm}}=124$, $p=0.23$; MW- $U_{\text{Correct Arm}}=159$, $p=0.94$; MW- $U_{\text{Deep area}}=119$, $p=0.17$); **B:** Swimming velocity in the shallow areas was no different between control untagged and tagged fish (mean±SEM; Mann-Whitney- $U=157$, $p=0.87$).

Behavior is now recognized as an integrative indicator of both organism stress response and physiological alterations (Champagne *et al.*, 2010; Steenbergen *et al.*, 2011). Two months after tagging, we compared swimming activity of tagged fish with untagged control fish using an exploratory challenge in a T-maze. This challenge is usually used to measure anxiety and exploration (Ninkovic et Bally-Cuif, 2006) as well as swimming characteristics themselves. No significant modifications were observed for the variables measured (Fig. 44): fish from both treatments used the different zones of the T-maze equally and swimming velocities in the shallow area were similar.

3.4 Discussion

Method choice As described in the introduction, there are several reasons for which tagging a fish could be useful, and requirements may differ depending on specific needs. For short-term use, *e.g.*, for repetition of a challenge with individualized fish within a week,

external tags such as paints can be used, even though this might become complicated if a large number of fish was used. External tagging can also potentially pose problems if the challenge involves social interaction, which may be biased due to mark visibility itself. For long-term experiments, a long-lasting tagging method is required, which precludes painting techniques. Internal electronic tagging is the ideal choice in such cases but, as mentioned above, this has so far been limited to fish above 60 mm in length and 1.67 g in weight (Baras *et al.*, 2000).

Over the course of our projects at our laboratory for which long-lasting tagging was required, we have tried several tagging techniques. Our experience has shown that scale painting and under-skin paint (acrylic) or elastomer injections were not successful, color faded away or injected elastomers were rejected within two weeks of tagging. The same problems occurred with VI alphanumeric tags, even when the tags were cut to make them smaller. As we had practical experience of implanting internal transponder tags in larger fish than zebrafish, we searched for small RFID tags because they make it possible to work simultaneously with a large number of code combinations and provide a long-lasting form of tagging. Nonatec[®] tags were available embedded in resin or in glass. Although the resin tags offered the advantage of being lighter than the glass ones, they had sharp edges and were rapidly lost following intracoelomic implantation. We therefore focused our experiments on Nonatec[®] glass tags.

Tagging success and effects Surgery was adequate for tagging zebrafish, as the mortality of tagged fish was actually lower than that of control untagged fish and was within the range of usual mortality reported for long-term experiments on zebrafish. The overall tagging success in the improved-method experiment after 5.5 mo of tagging was above 82 % for fish survival, among which 11 % lost their tag or had a tag that became unreadable. In the tagging literature, one can often find references to tag size following a recommended ratio of tag mass to fish mass in air limited to 2 % (Winter, 1983). If this "2 %" rule is applied, the recommended lower threshold for zebrafish tagging should be 500 mg. In our experiment, the lightest surviving tagged fish had an initial mass of 178 mg in Exp. 1 and 190 mg in Exp. 2, giving tag to fish mass ratios of 5.6 % and 5.3 %, respectively, which are largely above the recommended ratio (Claireaux et Lefrançois, 1998). However, this "2 %" rule has been successfully challenged by several authors who demonstrated that high tag ratios can be used without causing substantial biases in the long run (Claireaux et Lefrançois, 1998; Brown *et al.*, 1999; Baras *et al.*, 2000). Our findings also agree with this principle, as they show no alteration in feed intake or equilibrium. Furthermore, during the first couple of months following tagging, the smallest fish showed catch-up growth (high SGR) although their tag ratio was still high and hence all initial mass classes exceeded 500 mg after two months. There was, however, a clear increase in success with heavier

initial mass at tagging, with a success probability over 73 % for fish in 350-450 mg class range.

None of the variables tested in the longer experiment showed deviation between treatments, control untagged *vs.* tagged fish. We were able to obtain only a small number of spawns for tagged and untagged fish, which was probably due to the combination of two causes: frequent handling under anesthesia at fortnightly interval and restrictively low food levels. Analysis of the swimming activity in a T-maze indicated that swimming ability as measured two months after tagging was not modified by tagging and that tagging did not induce modification of behavioral traits that could have been interpreted as enforced anxiety (Champagne *et al.*, 2010).

Possible developments of the techniques We have demonstrated that fish as small as 200 mg can survive after the insertion of a 10 mg glass tag. This represents a great decrease in the lower limit for fish to be tagged compared with other tags available on the market and therefore creates the possibility of tagging very young individuals of larger fish species in order to conduct long-term life history monitoring, as well as providing a means of tagging small model species such as zebrafish. However, because of the short reading distance of the arm reader (1 cm) and its functioning mode, some occasional tag reading failures were noted that could not be distinguished from tag loss unless the tag was read at the following session. Also, if frequent monitoring is required as fish grow (*e.g.*, for biometry measurements, challenges) and when working with juvenile of large fish, an additional tagging should be done later on, using regular PIT tags (*e.g.*, when fish are above 5-10 g depending on the species), so as to avoid losing the signal.

An automated identification portal at specific check-points would make an excellent research tool for behavioral challenge monitoring in fish, like the equipment already developed for insects (Decourtye *et al.*, 2011; Moreau *et al.*, 2011), but this would require the arm reader to be waterproof, and improving the detection range and speed, which are currently the weak points because they require a close positioning of the fish for reading.

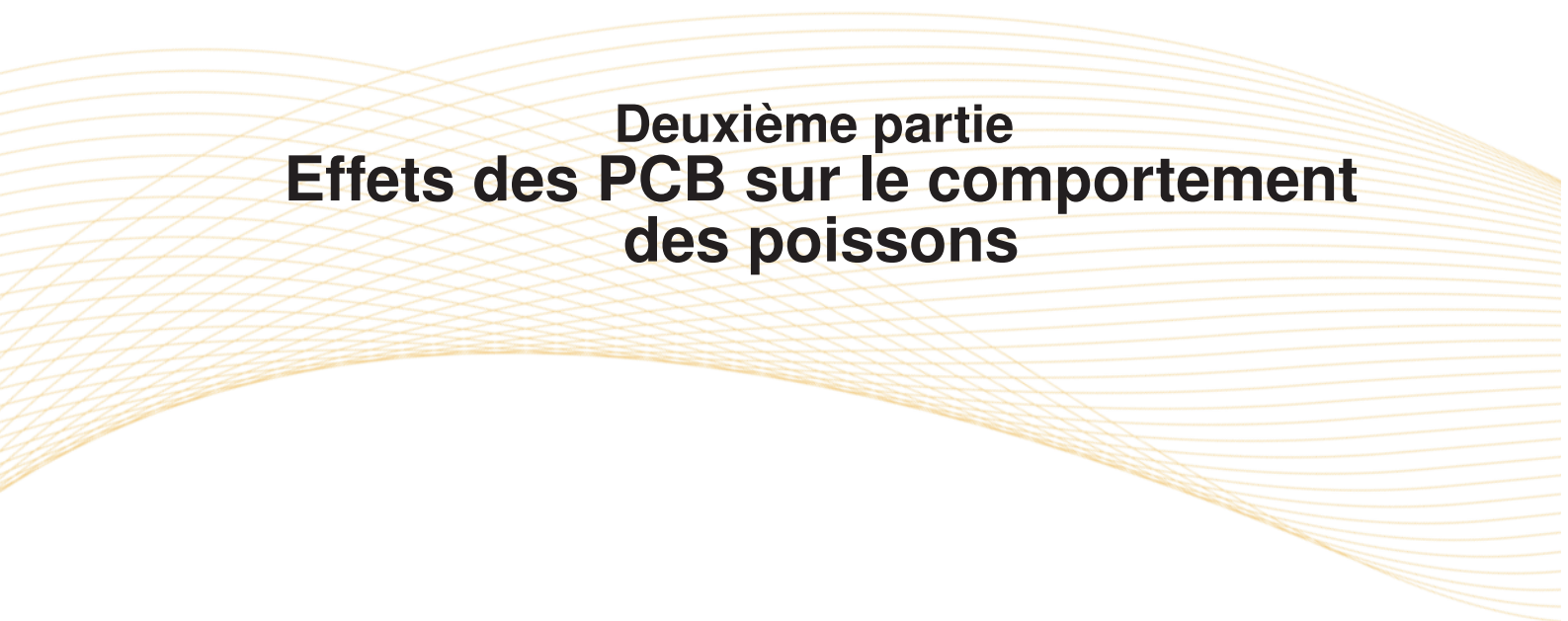
In conclusion, we have demonstrated that long-term tagging of small fish such as zebrafish is now possible using small RFID glass tags. The tagging procedure is simple and fast. None of the tested variables indicated an adverse effect of the tagging procedure or of the tag itself on the long term.

Acknowledgements

This work was performed with the financial support of CNRS-INSU (EC2CO GénérationPOP). County of Charente Maritime and Poitou-Charentes funds supported Tarek Daouk, Samuel Péan and Marie-Élise Schwartz during their PhD along with Ifremer and INRA. We also thank Helen McCombie-Boudry for editing the English of this manuscript.

Author contributions

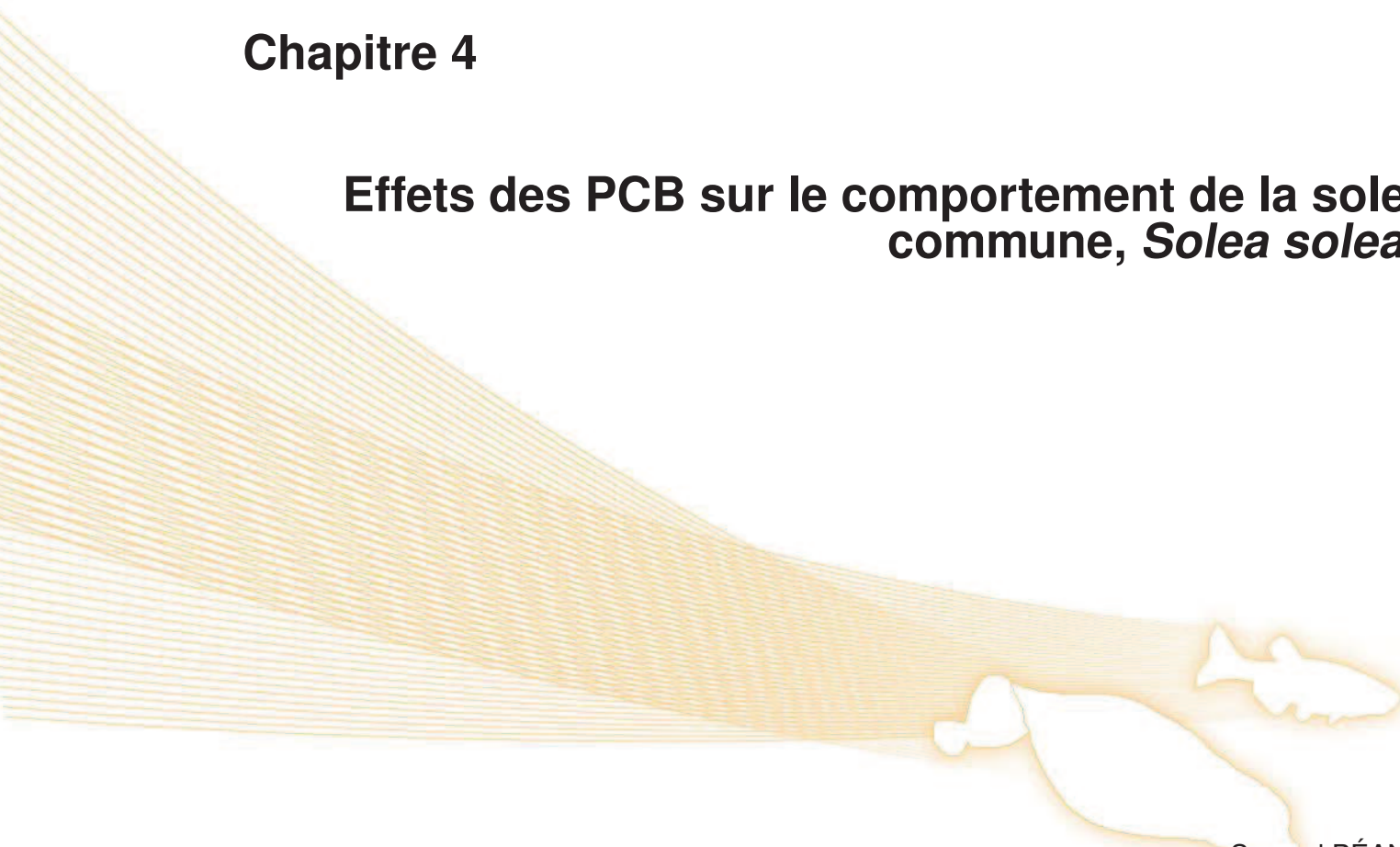
Xavier Cousin, Samuel Péan and Marie-Laure Bégout conceived and designed experiments. Xavier Cousin, Tarek Daouk, Samuel Péan, Laura Lyphout, Marie-Élise Schwartz and Marie-Laure Bégout performed the experiments. Xavier Cousin, Samuel Péan and Marie-Laure Bégout analyzed the data. Xavier Cousin and Marie-Laure Bégout wrote the manuscript and sought funding.

The background features a series of thin, light-colored wavy lines that create a sense of movement and depth, resembling a stylized wave or a series of overlapping curves. These lines are centered horizontally and extend across most of the page width.

Deuxième partie
Effets des PCB sur le comportement
des poissons

Chapitre 4

Effets des PCB sur le comportement de la sole commune, *Solea solea*



Samuel PÉAN
Pierre POITEVIN
Didier LEGUAY
Anne-Lise MAYERAS
Mathieu BESSON
Sébastien FERRARI
Lilian DUCCI
Lucette JOASSARD
Claire ROCANCOURT
Véronique LOIZEAU
Marie-Laure BÉGOUT

Résumé

Durant cette étude, des juvéniles de sole d'âge G0 ont été contaminés par voie alimentaire aux PCB pendant 67 jours, en utilisant des mélanges et des doses réalistes par rapport aux conditions environnementales. Les tests chimiques réalisés à 31 et 67 j ont montré que les taux de contamination correspondaient aux concentrations espérées. Durant les 67 jours de contamination, différents traits comportementaux ont été suivis tels que l'activité de nage pendant 23 h ainsi que l'enfouissement. Le test d'activité de nage pendant 23 h a montré que le groupe moyennement contaminé présentait une prostration importante à 30 j, ce qui n'a pas été retrouvé à 60 j. Le groupe le plus fortement contaminé a présenté quant à lui une moins bonne adaptation à ce nouvel environnement à 30 et 60 j, avec une activité très élevée pendant les premières heures du test. Le challenge d'enfouissement pendant 30 s réalisé à 30 j n'a montré aucune différence significative entre les conditions pour aucune des variables étudiées (nombre d'individus enfouis, temps de mobilité, durée de l'enfouissement, temps de latence avant l'enfouissement). La couleur mesurée à 31 et 67 jours n'a pas montré de différences significatives. Pendant les 26 premiers jours de décontamination, la moitié des individus ont été placés dans un environnement clair pendant 13 j, puis un environnement sombre pendant les 13 j suivants ; l'autre moitié des effectifs a été placé d'abord dans l'environnement sombre, puis dans le clair. Le suivi de la couleur de ces individus a montré que les individus contaminés avaient des difficultés à s'assombrir. Les variables physiologiques telles que le poids, l'indice de condition de Fulton ou le SGR n'ont montré aucune différence entre les conditions, ou des différences qui ne pouvait pas être expliquées par le niveau de contamination. Ces résultats démontrant une altération des comportements locomoteurs et cryptiques seront discutés en rapport avec les conséquences écologiques que cela implique pour l'espèce.

Cette première étude montre qu'une contamination aux PCB chez la sole, à des doses réalistes par rapport aux concentrations rencontrées dans l'environnement, induit des effets à 30 et 60 j sur le comportement locomoteur, ainsi que sur les capacités de mimétisme pendant les 26 jours suivant la fin de la contamination. L'utilisation de ces différents challenges a permis de montrer des réponses différentielles selon les niveaux de contamination.

4.1 Introduction

Les zones côtières, bien que restreintes et instables, représentent un espace d'échanges d'intérêt écologique majeur entre les territoires marins et terrestres. Les zones estuariennes en sont un exemple particulier, où les fleuves et rivières vont enrichir le milieu marin en nutriments. Ces apports d'origine terrestre constituent un enjeu biologique pour de nombreuses espèces marines, qui vont y établir leurs zones de nurricerie. Certaines de ces espèces peuvent avoir un intérêt économique majeur : c'est le cas de la sole. Le caractère déterminant de ces zones pour la survie et la croissance de ces juvéniles permet de considérer la dégradation des milieux côtiers comme une des causes majeures de diminution du recrutement (et donc de la taille des populations marines) en liens avec ces habitats (Morin *et al.*, 2006).

Les nurriceries sont des zones géographiques limitées où se concentrent les juvéniles de nombreuses espèces de poissons pour s'y nourrir et grandir pendant leur(s) première(s) année(s) d'existence (Beck *et al.*, 2001). Selon ces auteurs, un habitat peut être considéré comme une nurricerie si sa contribution à la production d'individus est supérieure à celles des autres habitats. Les pertuis Charentais, l'estuaire de la Loire et de la Gironde, forment les plus importantes nurriceries de la côte atlantique, en termes de surfaces potentiellement disponibles et de densité de juvéniles observés, en particulier pour la sole (Le Pape *et al.* (2003). Elles représentent alors un habitat essentiel pour cette espèce, dans le sens où celui-ci est nécessaire à la réalisation complète de son cycle de vie. Les pertuis Charentais ont une superficie d'environ 1300 km², dont 343 km² de vasières situées à moins de 5 m de profondeur. Ils sont aussi très proches d'une frayère importante pour la sole, celle de Rochebonne (Arbault *et al.*, 1986). La conjonction de ces deux éléments favorise probablement la colonisation des juvéniles.

Cependant, depuis le début du XX^e siècle, l'industrialisation a conduit à la production de milliers de substances chimiques pouvant à tout moment être libérées dans l'environnement. Jusqu'à ces dernières années, ces produits ont été mis sur le marché et utilisés en grande quantité alors que leurs effets à long terme sur l'environnement et les organismes vivants n'ont été révélés que plus tardivement. Parmi ces substances, les polluants organiques persistants (POP) connaissent un regain d'intérêt à cause de la récente réévaluation de leur toxicité (neurotoxiques, perturbateurs endocriniens ; van der Oost *et al.* 2003). Ces matières sont chimiquement stables, faiblement biodégradables et lipophiles, ce qui leur confère un fort potentiel bio-accumulateur. Parmi les POP, les polychlorobiphényles (PCB) sont sans doute les molécules les plus connues. Ces composés aromatiques organochlorés exclusivement d'origine anthropique ont été synthétisés pour la première fois en 1881, puis produits industriellement à partir de 1929 par la société MONSANTO (HSPH (2001). Ils ont été utilisés massivement entre les années 1950 et 1970 et cela pour leurs

propriétés suivantes :

- un faible point de volatilité ;
- une bonne résistance au feu ;
- une faible solubilité dans l'eau ;
- une haute solubilité dans les solvants organiques ;
- une bonne stabilité dans le temps, sans aucune détérioration due à l'utilisation.

Depuis 1987, la réglementation française a décrété l'arrêt total de la production, de la vente et de l'utilisation des PCB (décret n°87-59 du 02/02/87). Cependant, ces composés ayant une demi-vie excédant 100 ans (Ramade, 1992), leur présence dans l'environnement reste un vrai problème : leur rémanence dans les sols, ou plus ponctuellement, le déversement sauvage d'appareils contenant des PCB sont autant de sources de contamination pour le milieu naturel. Cela se vérifie d'autant plus en zones estuariennes et péri-estuariennes, fortement soumises aux apports d'eau douce à forte teneur en matières organiques potentiellement polluées. Une fois introduits dans l'environnement, les PCB sont stockés dans tous les compartiments de l'écosystème. Les organismes vivants peuvent être contaminés : i) par simple contact avec un milieu pollué (voie cutanée et/ou respiratoire) ; ii) par l'ingestion de proies contaminées (voie trophique) ; iii) parfois les deux à la fois. Cette contamination débute par le passage des polluants à travers la membrane des cellules par diffusion, ils s'installent ensuite dans leur vacuole, s'accumulant dans les organismes planctoniques. Ces êtres vivants sont ensuite consommés par les prédateurs qui vont accumuler les PCB dans les lipides, le foie, les branchies, le cerveau et les muscles. Peu métabolisables, leur concentration va augmenter à mesure que l'on monte dans les niveaux trophiques. On peut alors parler, en plus de bioaccumulation, de bioamplification (Ramade, 1992), les plus fortes concentrations étant relevées chez les grands prédateurs.

Ces polluants ont des effets délétères sur la physiologie, la reproduction, la croissance et le système immunitaire de nombreux organismes (Holene *et al.*, 1998; Crofton *et al.*, 2000; Safe, 2005; Zimmer *et al.*, 2009; Schell et Gallo, 2010), autant de phénomènes pouvant potentiellement intervenir dans le déclin de certaines populations naturelles. En plus de cet aspect écologique, il semble important de s'interroger sur la consommation de produits d'origine aquatique par les Hommes. Cela semble particulièrement important quand on connaît les conséquences des PCB sur la santé humaine. En effet, ils sont promoteurs dans les processus cancérogènes, peuvent entraîner une dégradation des systèmes immunitaire et endocrinien, des tumeurs cutanées, hépatiques et digestives, des dérèglements enzymatiques, des troubles oculaires et respiratoires etc. (Carpenter, 2006) ainsi que le syndrome d'ADHD chez l'enfant (« *attention deficit / hyperactivity disorder* », Eubig *et al.*, 2010).

Il est donc nécessaire de trouver des indicateurs écologiques témoignant de la qualité du milieu. C'est ce qu'a entrepris l'Union Européenne en mettant en place la directive

Habitat (92/43/EC), la directive cadre sur l'eau (2000/60/EC) et le programme de gestion intégrée de la zone côtière. C'est dans ce contexte que s'inscrivait le programme SOLE-Bémol-pop dont l'objectif était de comprendre l'effet des polluants organiques persistants (PCB, HAP¹, PBDE²), d'origine anthropique, sur les performances écologiques des populations naturelles de sole commune.

Au cours de cette étude, les expériences menées en laboratoire ont permis de bénéficier de conditions contrôlées sans interaction avec d'autres composantes biotiques ou abiotiques de l'environnement afin d'étudier l'effet de l'exposition aux PCB sur de nombreux aspects physiologiques et biochimiques, mais aussi sur le comportement des soles juvéniles. Si un grand nombre d'études a démontré l'effet des PCB sur la physiologie des poissons *Collins et al. (1977)*; *Örn et al. (1998)*; *Schmidt et al. (2005)*; *Nakayama et al. (2005a)*; *Lerner et al. (2007)*; *Daouk et al. (2011)*, très peu se sont concentrées sur le comportement. Pourtant, le répertoire comportemental est l'une des caractéristiques que l'individu modifie en réponse à une cascade métabolique « silencieuse ». L'objectif de cette étude est de définir l'effet de l'exposition aux PCB sur les comportements anti-prédateur et locomoteur des juvéniles de sole commune. Pour échapper aux prédateurs, les soles utilisent différentes stratégies telles que l'enfouissement et le camouflage. Le comportement locomoteur est pour sa part essentiel quant au choix d'habitat (exploration) et à la recherche de proies. Réaliser correctement ces deux comportements peut entre autre conférer de bonnes performances écologiques individuelles, ce qui offre un avantage en terme de survie.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Matériel biologique et contamination

Les individus testés ont été importés au stade œuf de la ferme aquacole Solea-BV (Pays-Bas) et ont ensuite été élevés pendant 10 mois du centre Ifremer de Brest. Ils ont été ensuite transférés sur la plate-forme expérimentale de la station Ifremer de L'Houmeau. Les individus au début de l'expérience pesaient en moyenne 17 g. Les soles ont été marquées individuellement à l'aide de puces RFID³ de la marque Nonatec® (Lutronic, Luxembourg ; voir Chapitre 3, p. 87 & Fig. 67, Annexe C, p.217), insérées en sous-cutané dans la partie antérieure de la face aveugle.

Aucune sole testée ne souffrait d'albinisme, n'était borgne ou sénestre de manière à ne

-
1. Hydrocarbures aromatiques polycycliques
 2. Polybromodiphényléther
 3. Radio frequency identification

pas créer de biais dans nos résultats. Les poissons testés ont été élevés par groupes de 50 individus dans des bassins sub-carrés de 450 litres.

Quatre lots de poissons homogènes en nombre et en poids moyens ont été constitués lors de la première biométrie (D0), puis les soles ont été exposées aux PCB par voie alimentaire pendant 67 j. Quatre types de granulés ont été préparés au sein du centre Ifremer de Brest :

- témoin (*Plain*), aliment commercial non contaminé ;
- solvant (*Solvent*) ;
- solvant + PCB à dose moyenne (*PCB medium*)
- solvant + PCB à plus forte dose (*PCB high*)

Étant donné que l'inclusion des PCB dans l'aliment ne peut se faire qu'en ajoutant un solvant (isooctane), la condition *Solvent* contient la même dose d'isooctane que le groupe *PCB high*.

Un mélange de quatre congénères de PCB a été fabriqué : le CB-105, le CB-118, le CB-149 et le CB-153. Les concentrations ciblées par conditions sont les suivantes :

- pour la condition *PCB medium* : CB-105 : 80 ng.g⁻¹, CB-118 : 150 ng.g⁻¹, CB-149 : 150 ng.g⁻¹, CB-153 : 300 ng.g⁻¹, soit un total de $\Sigma\text{CB}=680$ ng.g⁻¹ ;
- pour la condition *PCB high* : CB-105 : 300 ng.g⁻¹, CB-118 : 580 ng.g⁻¹, CB-149 : 450 ng.g⁻¹, CB-153 : 1000 ng.g⁻¹, soit un total de $\Sigma\text{CB}=2330$ ng.g⁻¹ ;

Ces concentrations correspondent toutes les deux à des doses environnementales mesurées dans la chair de soles prélevées respectivement dans les estuaires de la Loire et de la Seine, et la distribution des congénères de PCB est proportionnelle à celle trouvée en milieu naturel. Les animaux ont été nourris suivant un taux journalier de 1% de leur biomasse (ajusté à chaque biométrie). Cette ration a été répartie sur trois à cinq repas par jour (entre 9 h et 18 h) en fonction de la motivation des poissons à s'alimenter.

Les bassins contenant les individus dont l'alimentation était contaminée par des PCB ont été isolés et possédaient leur propre système de filtration et de thermorégulation. Les bassins des deux autres conditions étaient connectés au circuit général, lui aussi fermé et thermorégulé. Les soles ont été soumises à une photopériode de 12 h de jour et 12 h de nuit. L'eau a été maintenue à une température de 19°C et une salinité d'environ 30 ‰ pour l'ensemble des bacs. Un suivi des taux de nitrate, nitrite et ammonium a été effectué régulièrement afin de contrôler la qualité de l'eau ainsi qu'une purge de 20 à 30 % de l'eau des bacs pour assurer de bonnes conditions d'élevage.

4.2.2 Acquisition des données

4.2.2.1 Phase de contamination

Données biométriques et chromatiques Le marquage a permis de faire un suivi individuel précis pour les mesures biométriques et comportementales. Durant les 60 premiers jours, l'ensemble des poissons ont été pesés et mesurés (longueur standard) à cinq reprises (D0, D15, D31, D48, D67) et leur couleur a été vérifiée au cours de trois d'entre elles (D0, D31, D67) en comparant la couleur des soles à une gamme de Munsell (table 2.5Y, Ellis *et al.* 1997). Cette gamme permet de décomposer une couleur selon trois paramètres (Fig. 68, Annexe D, p. 218) : sa luminosité (*Value*), sa nuance (*Hue*) et sa pureté (*Chroma*). Seule la *Value* a été mesurée. Pour chaque biométrie, les poissons ont été anesthésiés avec de l'eugénol à une faible dose (0.01 mL.L⁻¹) pour une simple sédation. Les données de poids et de taille ont permis le calcul de différents indices. Le premier est le taux de croissance spécifique ($SGR_M(\%)$), calculé selon la formule suivante :

$$SGR_M(\%) = 100 \cdot \frac{(\ln M_f - \ln M_i)}{T} \quad \text{avec : } \begin{array}{l} M_f, \text{ masse finale en g} \\ M_i, \text{ masse initiale en g} \\ T, \text{ temps en j} \end{array}$$

Le second est l'indice de condition de Fulton (K), calculé comme suit :

$$F = 100 \cdot \frac{M}{L^3} \quad \text{avec : } \begin{array}{l} M, \text{ masse en g} \\ L, \text{ longueur standard en cm} \end{array}$$

Dosages chimiques Lors des biométries à D31 et D67, 15 individus ont été sacrifiés afin d'effectuer des dosages chimiques : 3 individus de la condition *Plain*, 2 de la condition *Solvent* et 5 pour chacune des conditions *PCB medium* et *PCB high*.

Les prélèvements ont été effectués sur des individus sélectionnés selon leur $SGR_M(\%)$ en prenant soin de prélever pour chaque condition un individu dans la moyenne, un individu au niveau le plus bas, un au plus haut et les deux derniers ont été choisis aléatoirement, ceci dans le but de mettre en évidence les variations de contamination qu'il pouvait exister au sein d'un groupe en lien avec la croissance (la contamination étant alimentaire dans notre cas). Les dosages de PCB ont été effectués sur des échantillons de muscles selon le protocole de Eichinger *et al.* (2010) par Véronique Loizeau (Ifremer LBCO, Brest).

Expérience nage 23 h Pour cette expérience les poissons ont été placés dans une salle totalement isolée de toute source de lumière extérieure et soumis à une photopériode de

12 heures de jour et 12 heures de nuit, synchronisée avec celle de la salle d'élevage. Cette salle est équipée de trois projecteurs à LED de 16 W chacun éclairant de manière homogène la zone expérimentale durant les heures de jour, d'un plancher infra-rouge (Noldus, Pays-Bas) placé sous les bacs expérimentaux et d'une caméra équipée d'un filtre permettant d'éliminer la lumière visible. Le filtre placé sur la caméra ne laissant passer que la lumière du plancher-infra rouge, les projecteurs de lumière visible servent uniquement à assurer la photophase.

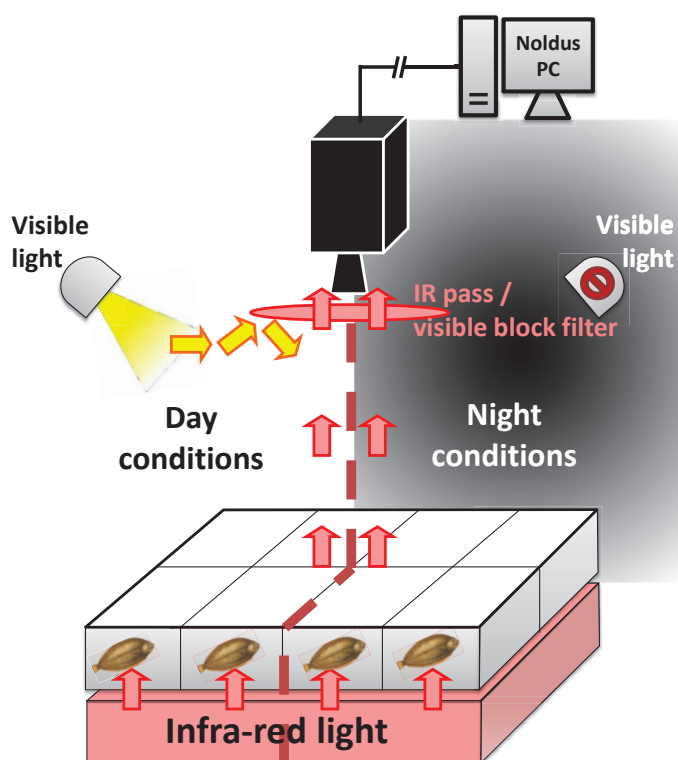


FIGURE 45 – Montage expérimental pour la mesure de l'activité de nage pendant 23 h chez des soles d'âge 0 contaminées pendant 30 et 60 j. Les poissons sont détectés grâce au plancher infrarouge ; la lumière visible est éliminée grâce à un filtre placé sur la caméra.

Les poissons ont été filmés par groupes de huit individus (deux individus par condition) répartis aléatoirement chacun dans un aquarium en verre (matière transparente aux infrarouges) de 20 x 40 x 30 cm (Fig. 45). Les parois extérieures de chaque aquarium ont été occultées afin d'empêcher les individus de se voir. La hauteur d'eau dans les aquariums était de 7.5 cm afin d'optimiser les échanges gazeux air/eau et de limiter les biais liés à la profondeur (la caméra ne prenant en compte les déplacements que sur 2 dimensions). Chaque session durait 23 h, avec un début d'enregistrement à 12 h (au moment où les poissons étaient placés dans les bacs d'expérimentation) et une fin le lendemain à 11 h. Durant l'heure séparant chaque session, les poissons ont été extraits des aquariums,

l'eau de chaque bac a été changée, puis à 12 h de nouveaux poissons ont été placés aléatoirement sans acclimatation dans les huit arènes (après vérification de leur marque afin d'éviter qu'un individu ne passe deux fois). Entre les jours 27 et 33, puis entre les jours 57 et 63, six sessions ont été effectuées pour porter à 12 le nombre d'individus enregistrés par condition. Les positions des aquariums, des éclairages (visibles et infrarouges) ainsi que de la caméra restent inchangées afin d'éviter les variations de détection d'un jour sur l'autre par le logiciel d'analyse d'image. Les vidéos ainsi obtenues sont à la fois enregistrées sur le disque dur et les trajectoires individuelles sont traitées en temps réel par le logiciel Ethovision® (Noldus, Pays-Bas).

Expérience d'enfouissement Cette expérience consiste en un challenge d'enfouissement de 30 s dans un aquarium contenant un fond de sable (100 à 300 µm de diamètre, Durieux *et al.* 2010). Vingt quatre heures avant le début de l'expérience ce même sable a été passé au four à 400°C pour limiter au maximum les risques d'apport d'agents pathogènes dans l'élevage. Trente soles par condition ont été testées lors de cette expérience à D30 et D60. Les résultats à D60 étant encore en cours d'analyse, seuls ceux de D30 seront présentés dans ce manuscrit. Chaque poisson est placé pendant 30 s dans un aquarium de 20 litres contenant une couche de 2 cm de sable, disposée de manière homogène sur le fond. L'arène de test est soumise à des conditions constantes de lumière et une caméra fixée au-dessus de l'aquarium a permis de filmer les soles durant toute la durée du test. Les vidéos ont été enregistrées directement sur ordinateur, puis analysées manuellement, à l'aide du logiciel ODRec (<http://www.samuelpean.com>).

4.2.2.2 Phase de décontamination

Après 67 jours de contamination alimentaire aux PCB, les individus des conditions *Solvent*, *PCB medium* et *PCB high* ont été conservés et nourris à l'aliment commercial (*Plain*) pendant 40 j supplémentaires. Pendant les 26 premiers jours de la décontamination (annotés D'0 et D'26), les soles ont été soumises à des environnements de couleurs différentes (claires et sombres) afin de solliciter leurs capacités d'adaptation chromatique.

Homochromie Six bacs d'élevage ont été aménagés pour accueillir des cuves de couleur. Trois d'entre eux ont été équipés de cuves blanches, et les trois autres de cuves noires. Les cuves ont été perforées afin d'altérer le moins possible l'hydrodynamisme des bacs. Pendant les 13 premiers jours, les effectifs de chaque condition ont été divisés en deux groupes, l'un étant placé dans un environnement sombre, l'autre dans un environnement clair (Fig. 46). Au 13^e j, les individus préalablement soumis à un environnement clair ont été transférés dans les bacs sombres, et inversement. Les soles sont restées 13 j de plus

dans cet environnement. Durant les 3 premiers jours de chaque adaptation à la nouvelle couleur d'environnement (au moment où la valeur de champ chromatique évolue le plus rapidement Ellis *et al.* 1997), les valeurs chromatiques ont été relevées quotidiennement, puis tous les 2 à 3 j afin de limiter le stress des poissons dû à la manipulation.

Données biométriques Les poissons ont été pesés et mesurés afin de calculer leurs taux de croissance et les indices de condition aux jour D'0 et D'26.

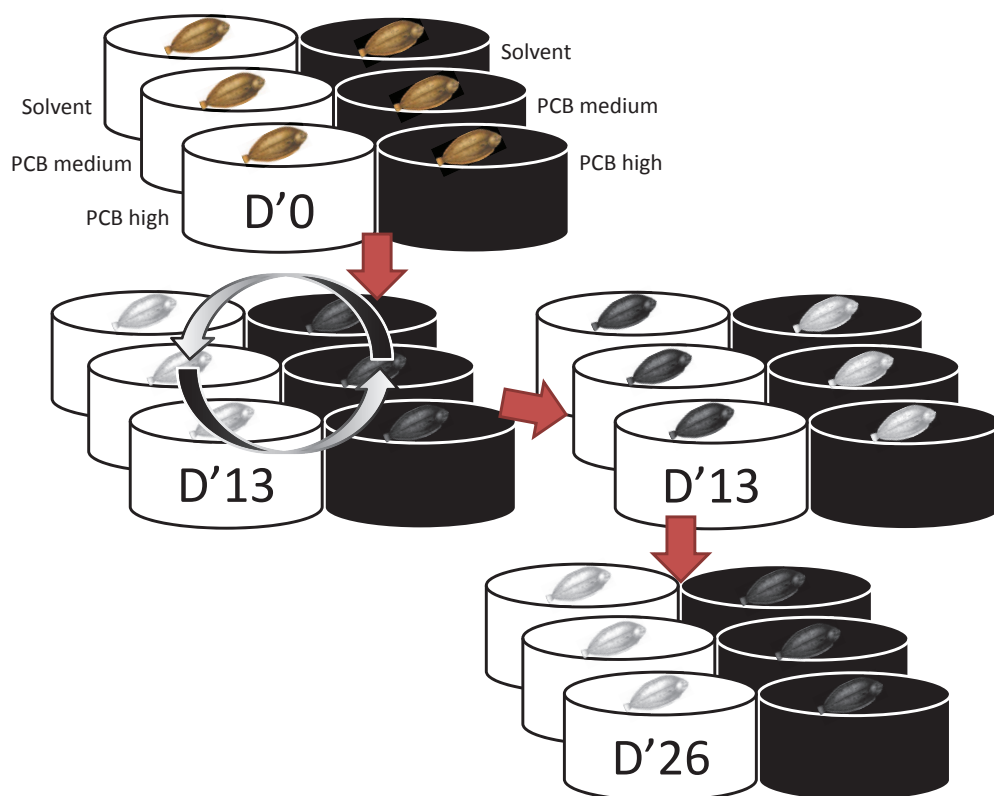


FIGURE 46 – Détail de l'expérience d'homochromie pour les 26 premiers jours de décontamination des soles : pendant 13 j la moitié des individus de chaque condition (*Solvent*, *PCB medium* et *PCB high*) est placée sur fond clair et l'autre moitié sur fond sombre. Au 13^e j, les poissons sont placés dans l'environnement de l'autre couleur pendant encore 13 j.

Analyse de données Les variables utilisées pour l'ensemble des expériences sont les suivantes :

1. Pour les données biométriques : le poids, le taux de croissance spécifique, l'indice de condition de Fulton ;
2. Pour les données chimiques, la concentration en ng.g^{-1} de poids sec.

3. Pour les données chromatiques, les valeurs obtenues par comparaison avec le paramètre *Value* d'une gamme de Munsell (table 2.5Y) ;
4. Pour les données de *video tracking*, la distance parcourue toute les 30 min a été analysées par blocs de 3 h ;
5. Pour les données d'enfouissement :
 - la proportion d'individus qui se sont enfouis ;
 - le temps de mobilité, calculé séparément pour les individus enfouis et non enfouis ;
 - la durée de l'enfouissement ;
 - la temps passé entre le début du challenge et la fin de l'enfouissement (appelé latence avant enfouissement) ;

Les données ont été statistiquement testées à l'aide du logiciel Statistica 9.0 (Statsoft, USA). Pour le nombre d'individus ayant répondu au challenge d'enfouissement à 30 jours, un test de χ^2 a été réalisé afin de vérifier si le nombre d'individus enfouis et non enfouis étaient statistiquement équivalents.

Pour chacune des autres variables, un test de Shapiro-Wilk a été réalisé afin de tester la normalité des données, suivi d'un test de Bartlett pour tester leur homoscedasticité. Ces deux tests n'étant pas satisfaits, des tests de Mann-Whitney ont été réalisés pour comparer les différences entre les jours de la mesure (D30, D60) au sein de chaque condition, et des tests de Kruskal-Wallis (Zar, 1999), suivis de test de comparaisons de rang multiples, ont été réalisés pour comparer les résultats entre les quatre traitements (*Plain*, *Solvent*, *PCB medium* et *PCB high*) pour chaque point de mesure (D30, D60).

Pour les données d'activité de nage sur 23 h, les distances parcourues obtenues toutes les 30 min ont été regroupées par bloc de 3 h pour le premier jour et la nuit, puis un bloc de 2 h pour le deuxième jour. Au sein de chaque période (8 au total), les tests de Kruskal-Wallis ont été utilisés pour comparer les distances parcourues entre chaque traitement. Les analyses statistiques ont été réalisées avec une significativité de 95%.

4.3 Résultats

4.3.1 Phase de contamination

4.3.1.1 Données biométriques

Pour chacune des dates de mesure, les poids ne présentent pas de différences statistiques significatives entre les conditions (Fig. 47A ; Tab. 4) sur l'ensemble des 67 jours de contamination. Les taux de croissance spécifique $SGR_M(\%)$ présentent quant à eux une

différence statistique significative au dernier point de mesure, c'est-à-dire à D67, pour lequel les individus des conditions *Solvent* et *PCB high* présentent un taux de croissance journalier significativement plus élevé que la condition *Plain*. Les individus de la condition *PCB high* présentent aussi un taux de croissance plus élevé que ceux de la condition *PCB medium*. L'indice de condition de Fulton montre une différence à D0 de la contamination entre les individus de la condition *Plain* et ceux de la condition *PCB medium*.

TABLE 4 – Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données biométriques des soles contaminées aux PCB pendant 60 j présentées en Fig. 47. Les valeurs en **gras** représentent les différences statistiques significatives entre les quatre conditions *Plain*, *Solvent*, *PCB medium* et *PCB high*

Variable	Jour / période	Résultat du test (<i>ddl</i> , <i>N</i>)	Valeur de <i>p</i>
Poids	D0	K-W : $H_{(3, 164)}=7.247$	0.064
	D14	K-W : $H_{(3, 164)}=5.320$	0.150
	D31	K-W : $H_{(3, 164)}=4.445$	0.217
	D48	K-W : $H_{(3, 164)}=1.416$	0.702
	D67	K-W : $H_{(3, 164)}=0.625$	0.891
<i>SGR_M</i> (%)	D0-D14	K-W : $H_{(3, 164)}=2.296$	0.513
	D14-D31	K-W : $H_{(3, 164)}=4.401$	0.221
	D31-D48	K-W : $H_{(3, 164)}=7.299$	0.063
	D48-D67	K-W : $H_{(3, 164)}=24.603$	<0.001
Indice de Fulton	D0	K-W : $H_{(3, 164)}=12.631$	0.005
	D14	K-W : $H_{(3, 164)}=4.560$	0.207
	D31	K-W : $H_{(3, 164)}=1.105$	0.776
	D48	K-W : $H_{(3, 164)}=0.300$	0.960
	D67	K-W : $H_{(3, 164)}=3.414$	0.332

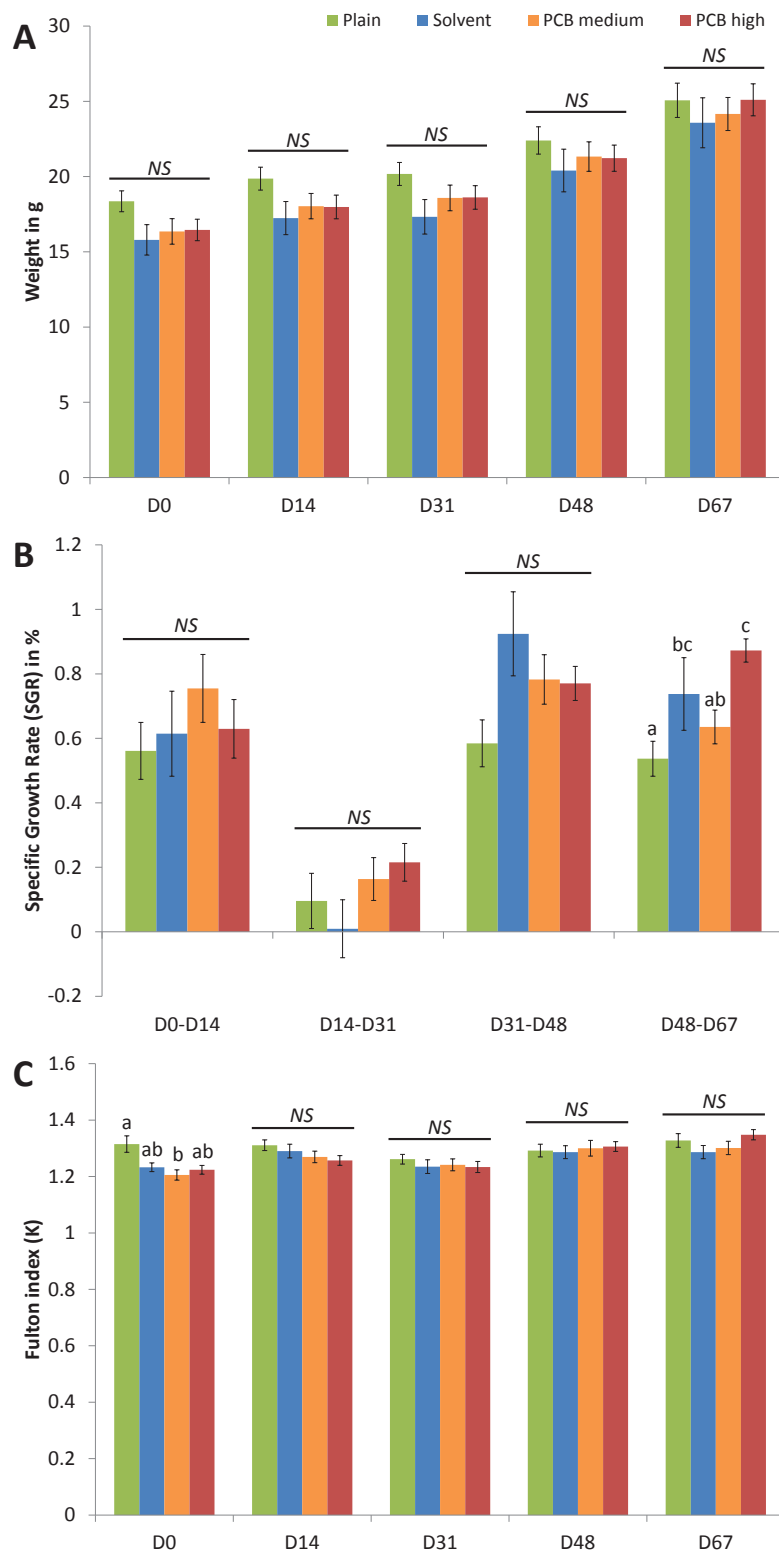


FIGURE 47 – Données biométriques des soles pendant les 60 j de contamination aux PCB. **A** : Poids en g ; **B** : Taux de croissance spécifique $SGR_M(\%)$; **C** : Indice de condition de Fulton. Les données exprimées sont des moyennes \pm erreur-type. Les lettres représentent les différences statistiques (Kruskal-Wallis) avec NS pour les différences non-significatives.

4.3.1.2 Dosages chimiques

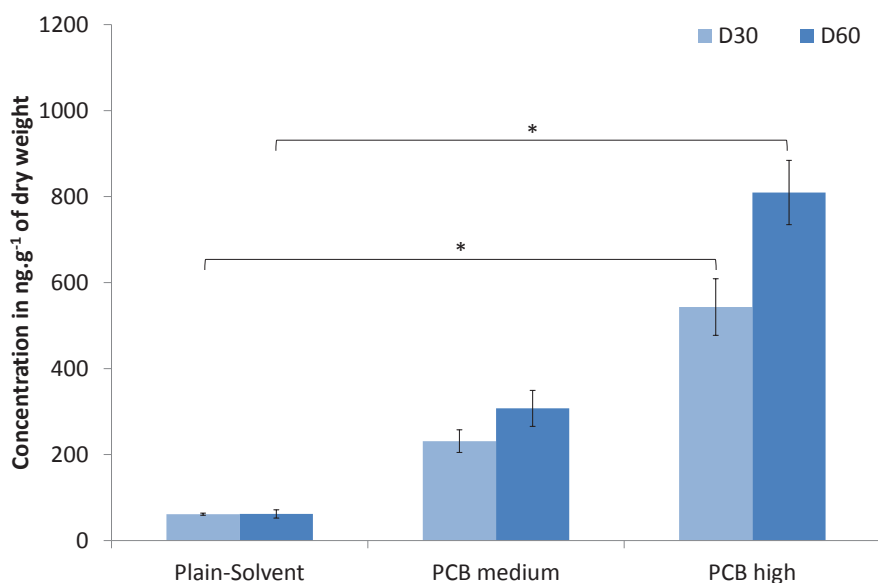


FIGURE 48 – Dosages chimiques dans les muscles de sole après 30 et 60 j de contamination aux PCB. Les données représentées sont des moyennes \pm erreur type. Les astérisques représentent les différences significatives entre les conditions.

Les profils de contamination montrent que les individus de la condition *Plain* n'étaient pas différents de ceux de la condition *Solvent* à D30 (M-W : $Z_{1,11}=0.436$, $p=0.662$) et à D60 (M-W : $Z_{1,11}=-0.289$, $p=0.773$), les effectifs de ces deux conditions ont été regroupés (détail des congénères en Fig. 69, Annexe E, p.219). Au sein de chaque condition (*Plain-Solvent*, *PCB medium* et *PCB high*), les différences de concentration entre D30 et D60 ne sont pas significatives (Fig. 48 ; Tab. 5). Au sein de chaque date (D30, D60), la condition *Plain-Solvent* est dans les deux cas significativement inférieure à la condition *PCB high*.

TABLE 5 – Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données chimique des soles contaminées aux PCB pendant 30 et 60 j présentées en Fig. 48. Les valeurs en **gras** représentent les différences statistiques significatives entre les trois conditions *Plain-Solvent*, *PCB medium* et *PCB high*.

Effet	Label	Résultat du test (<i>ddl</i> , <i>N</i>)	Valeur de <i>p</i>
Jour	<i>Plain-Solvent</i>	M-W : $Z_{(1, 11)}=0.000$	1.000
	<i>PCB medium</i>	M-W : $Z_{(1, 10)}=1.464$	0.144
	<i>PCB high</i>	M-W : $Z_{(1, 10)}=1.671$	0.095
Condition	D30	K-W : $H_{(2, 15)}=12.500$	<0.002
	D60	K-W : $H_{(2, 15)}=12.922$	<0.002

4.3.1.3 Valeurs de champ chromatique

Les valeurs de Munsell correspondant au champ chromatique des soles pendant les 67 j de contamination ne montrent aucune différence significative entre les différents groupes de contamination (Fig. 49 & Tab. 6).

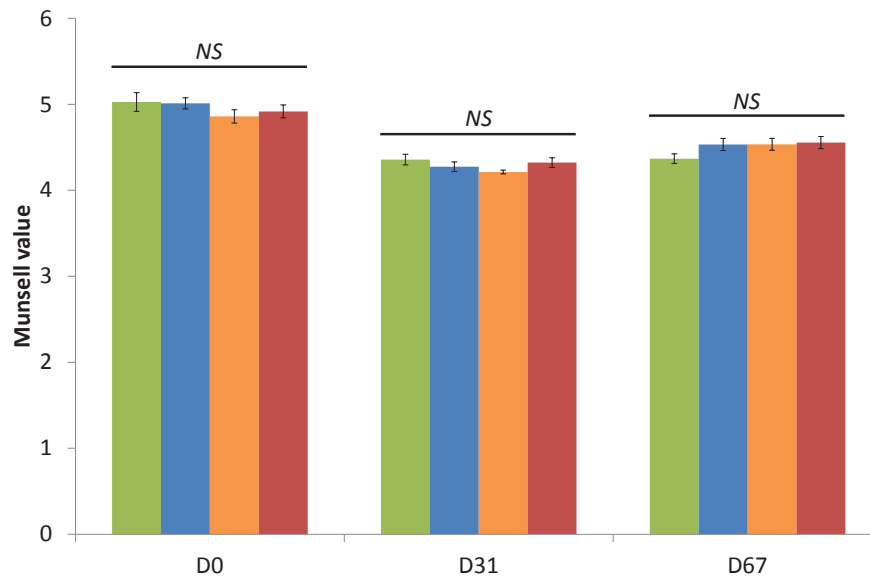


FIGURE 49 – Valeurs de champ chromatique des soles pendant les 60 j de contamination aux PCB obtenues à partir d’une gamme de Munsell. Les données exprimées sont des moyennes \pm erreur-type. Les lettres représentent les différences statistiques (Kruskal-Wallis) avec *NS* pour les différences non-significatives.

TABLE 6 – Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des valeurs des champs chromatiques des soles contaminées au PCB pendant 60 j présentées en Fig. 49. Les valeurs en **gras** représentent les différences statistiques significatives.

Jour	Résultat du test (<i>ddl, N</i>)	Valeur de <i>p</i>
D0	K-W : $H_{(3, 164)}=1.654$	0.647
D31	K-W : $H_{(3, 164)}=5.581$	0.134
D67	K-W : $H_{(3, 164)}=5.841$	0.120

4.3.1.4 Activité de nage pendant 23 h

Concernant la première partie de l'expérience, après 30 j de contamination (Fig. 50A ; Tab. 7), pendant les premières heures du test (de 12 h à 18 h) les individus du groupe *PCB high* présentent une activité locomotrice significativement plus élevée que les autres conditions. Durant les 3 h suivantes (18 h à 21 h), les individus de la condition *PCB high* présentent une activité significativement plus élevée que ceux de la condition *PCB medium*. Pendant la nuit, entre 21 h et 6 h, les individus de la condition *Solvent* présentent une activité significativement plus élevée que les autres (Fig. 50A ; Tab. 7). Durant l'ensemble de la nuit (de 21 h à 9 h), les individus de la condition *PCB medium* ont quant à eux une activité de nage significativement moins importante que les individus des autres conditions. Lors de la reprise de la lumière (de 9 h à 11 h), seuls les individus de la condition *Plain* présentent une activité significativement plus importante que la condition *PCB medium*.

Après 60 j de contamination (Fig. 50B ; Tab. 7), les individus de la condition *Plain* sont significativement moins actifs que ceux des autres conditions entre 12 h et 18 h. Durant l'ensemble de la nuit (de 21 h à 9 h), les individus de la condition *Solvent* ont une activité significativement plus élevée que ceux des autres conditions, sauf pour la période 0 h-3 h où les soles de la condition *PCB high* ont un niveau d'activité comparable. À la reprise de la lumière (de 9 h à 11 h), seuls les individus de la condition *Plain* présentent une activité significativement moins importante que les autres.

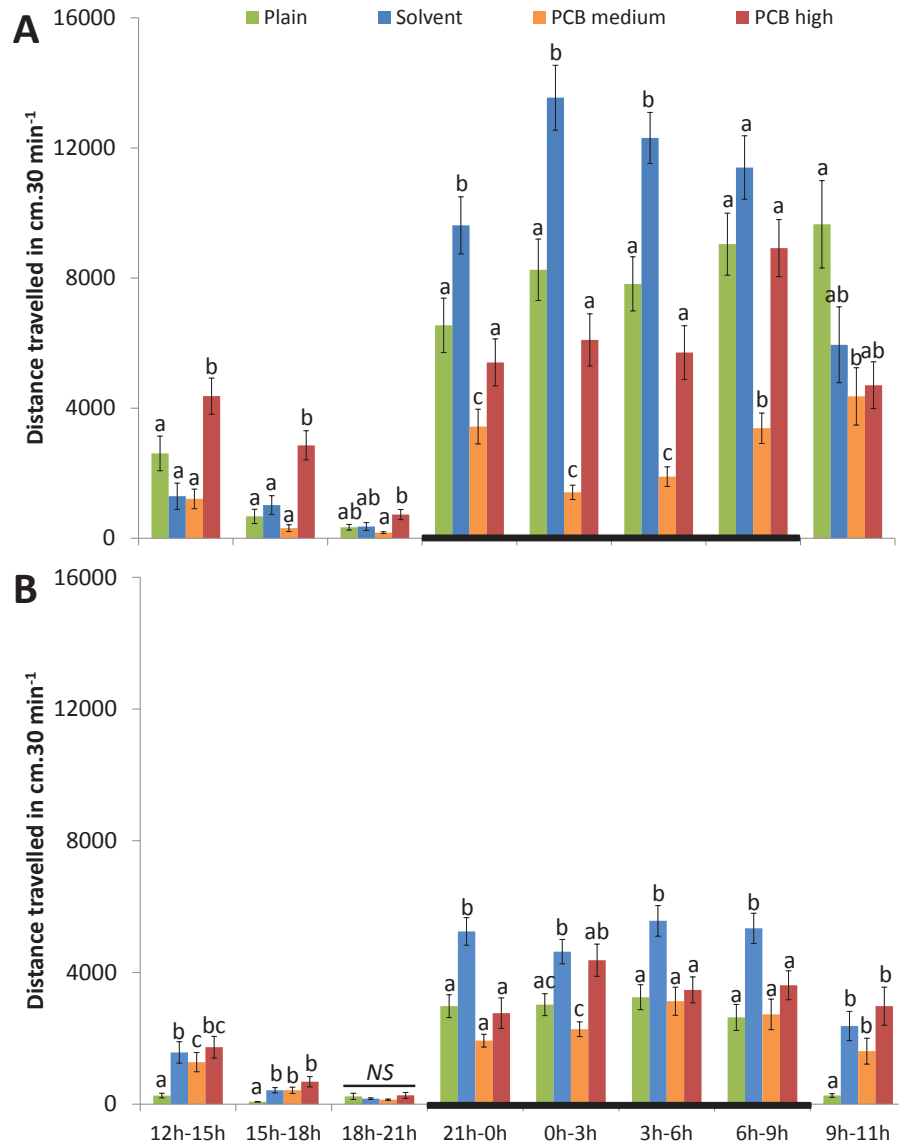


FIGURE 50 – Distance parcourue pendant 23 h par les soles après 30 et 60 j de contamination alimentaire aux PCB. **A** : Distance parcourue après 30 j de contamination ; **B** : Distance parcourue après 60 j de contamination. Les barres noires sur l'axe des abscisses symbolisent les heures de nuit. Les données exprimées sont des moyennes \pm erreur-type. Les lettres représentent les différences statistiques (Kruskal-Wallis) avec *NS* pour les différences non-significatives.

TABLE 7 – Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données d'activité de nage pendant 23 h des soles contaminées aux PCB pendant 30 puis 60 j en Fig. 50. Les valeurs en **gras** représentent les différences statistiques significatives.

Jour	Période de la journée	Résultat du test (<i>ddl</i> , <i>N</i>)	Valeur de <i>p</i>
D30	12 h-15 h	K-W : $H_{(3, 288)}=34.129$	<0.001
	15 h-18 h	K-W : $H_{(3, 288)}=39.697$	<0.001
	18 h-21 h	K-W : $H_{(3, 288)}=9.656$	0.022
	21 h-0 h	K-W : $H_{(3, 288)}=41.330$	<0.001
	0 h-3 h	K-W : $H_{(3, 288)}=99.786$	<0.001
	3 h-6 h	K-W : $H_{(3, 288)}=96.446$	<0.001
	6 h-9 h	K-W : $H_{(3, 288)}=46.685$	<0.001
	9 h-11 h	K-W : $H_{(3, 182)}=8.849$	<0.031
D60	12 h-15 h	K-W : $H_{(3, 276)}=47.574$	<0.001
	15 h-18 h	K-W : $H_{(3, 276)}=71.653$	<0.001
	18 h-21 h	K-W : $H_{(3, 276)}=6.380$	0.094
	21 h-0 h	K-W : $H_{(3, 276)}=46.881$	<0.001
	0 h-3 h	K-W : $H_{(3, 276)}=25.101$	<0.001
	3 h-6 h	K-W : $H_{(3, 276)}=27.951$	<0.001
	6 h-9 h	K-W : $H_{(3, 276)}=33.182$	<0.001
	9 h-11 h	K-W : $H_{(3, 184)}=38.926$	<0.001

4.3.1.5 Challenge d'enfouissement sur fond sableux

Après 30 jours de contamination alimentaire, le nombre d'individus enfouis pendant le challenge n'est pas significativement différent d'une condition à l'autre (Fig.51 ; test de Khi^2 , $\chi^2_{(ddl=3, N=8)} = 4.907$, $p = 0.179$). De même, pendant ce challenge, les temps de mobilité des soles non enfouies ou enfouies, la durée de l'enfouissement ainsi que le temps de latence entre le début du challenge et la fin de l'enfouissement, ne diffère pas significativement entre les différentes conditions (Fig. 52 & Tab. 8).

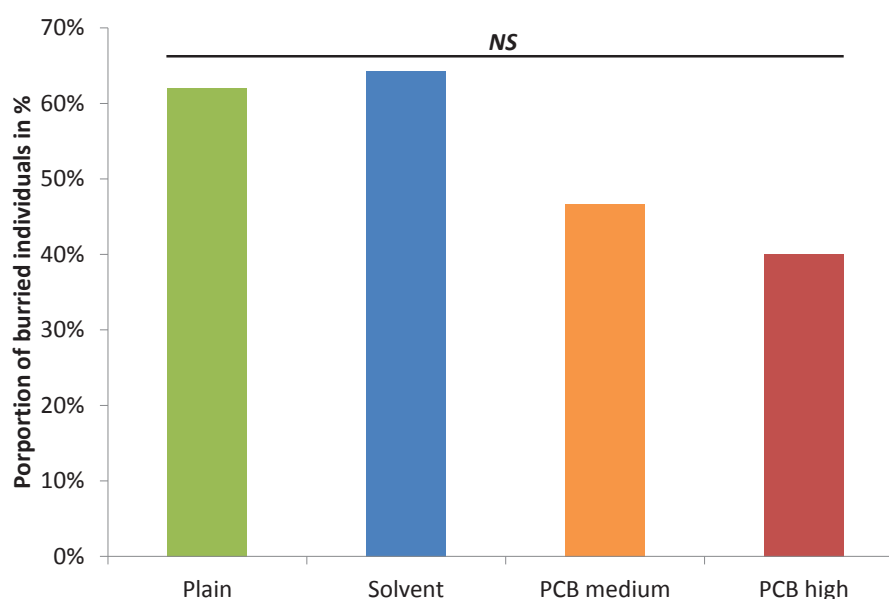


FIGURE 51 – Pourcentages de soles enfouies après 31 jours de contamination aux PCB. Les lettres représentent les différences statistiques (Khi^2) avec *NS* pour les différences non-significatives.

TABLE 8 – Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données du challenge d'enfouissement pendant 30 s sur des soles contaminées au PCB pendant 30 j présentées en Fig. 52. Les valeurs en **gras** représentent les différences statistiques significatives.

Jour	Période de la journée	Résultat du test (<i>ddl</i> , <i>N</i>)	Valeur de <i>p</i>
D30	Mobilité (ind. non enfouis)	K-W : $H_{(3, 55)}=2.530$	0.470
	Mobilité (ind. enfouis)	K-W : $H_{(3, 62)}=3.177$	0.365
	Durée enfouissement	K-W : $H_{(3, 62)}=0.559$	0.906
	Latence enfouissement	K-W : $H_{(3, 62)}=1.051$	0.789

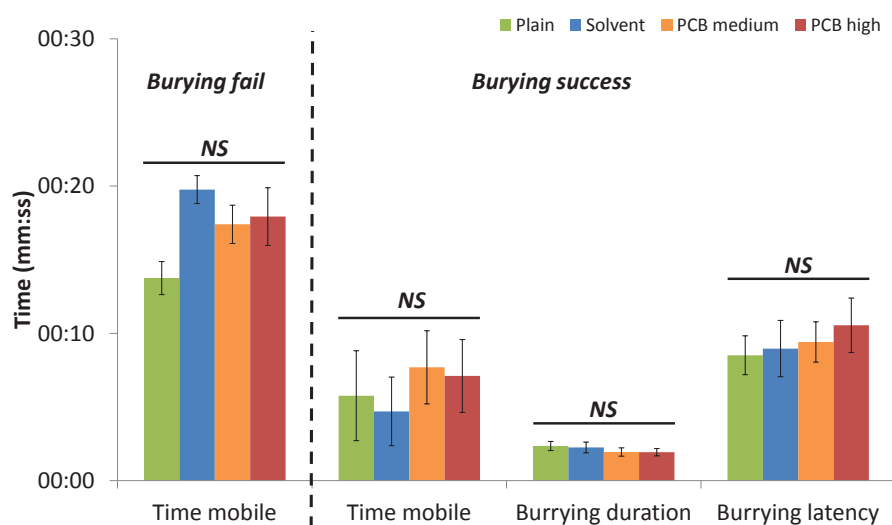


FIGURE 52 – Temps de mobilité (pour les soles non enfouies et enfouies), d’enfouissement et de latence avant enfouissement. Les données exprimées sont des moyennes \pm erreur-type. Les lettres représentent les différences statistiques (Kruskal-Wallis) avec *NS* pour les différences non-significatives.

4.3.2 Phase de décontamination

4.3.2.1 Données biométriques

Les poids mesurés entre le premier jour de décontamination (D’0) et le dernier jour (D’26) ne montrent aucune différence significative entre les trois conditions (respectivement $H_{(2, 33)}=0.8124$, $p=0.666$, et $H_{(2, 33)}=0.400$, $p=0.819$), de même pour le $SGR_M(\%)$ ($H_{(2, 33)}=2.102$, $p=0.350$).

4.3.2.2 Homochromie

Pendant l’expérience d’homochromie (Fig. 53 & Tab. 9), les résultats statistiques montrent qu’à D’0 et D’2, les individus de la condition *PCB high* placés sur fond noir sont significativement plus clairs que ceux de la condition *Solvent*. À D’3, toujours pour le groupe sur fond noir, ce sont à la fois les individus des conditions *PCB medium* et *PCB high* qui sont plus clairs que les individus *Solvent*. Pour le groupe d’individus ayant commencé sur fond clair, aucune différence statistique ne se dégage sur la partie sur fond blanc. En revanche, lorsque se groupe passe sur fond noir, les individus de la condition *PCB high* sont significativement plus clairs que ceux de la condition *Solvent* et à D’26, ce sont ceux de la condition *PCB medium* qui sont plus clairs que ceux de la condition *Solvent*. Les différences statistiques données par le test de Kruskal-Wallis à D’14 sur

fond noir et à D'26 sur fond blanc ne se retrouvent pas dans les post-test de comparaisons multiples.

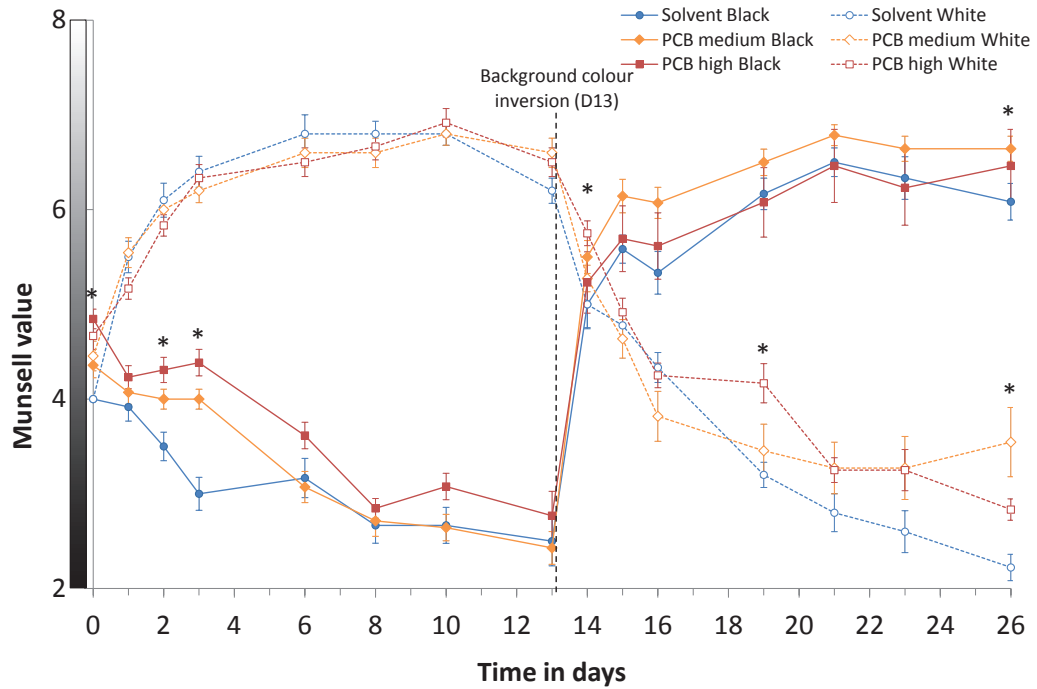


FIGURE 53 – Valeurs de Munsell de soles soumises à des environnements clairs ou sombres après 60 j de contamination aux PCB. Les astérisques identifient les point de mesure pour lesquels des différences statistiques significatives ont été observées.

TABLE 9 – Récapitulatif des tests statistiques réalisés à partir des données du test d'homochromie pendant 26 j sur des soles après une contamination aux PCB pendant 67 j présentées en Fig. 53. B : blanc ; N : noir ; S : Solvent ; Pm : PCB medium ; Ph : PCB high. Les valeurs en **gras** représentent les différences statistiques significatives.

Jour	Lot B>N	Résultat du test (<i>ddl</i> , <i>N</i>)	Valeur de <i>p</i>	Post-test	Lot N>B	Résultat du test (<i>ddl</i> , <i>N</i>)	Valeur de <i>p</i>	Post-test
D'0	B	K-W : $H_{(2,33)}=10.092$	0.064	-	Noir	K-W : $H_{(2,39)}=18.240$	<0.001	Ph>S
D'1	B	K-W : $H_{(2,33)}=4.000$	0.135	-	N	K-W : $H_{(2,39)}=2.594$	0.273	-
D'2	B	K-W : $H_{(2,33)}=2.556$	0.279	-	N	K-W : $H_{(2,39)}=13.309$	0.001	Ph>S
D'3	B	K-W : $H_{(2,32)}=0.939$	0.625	-	N	K-W : $H_{(2,39)}=23.218$	<0.001	Ph & Pm > S
D'6	B	K-W : $H_{(2,32)}=1.354$	0.508	-	N	K-W : $H_{(2,39)}=5.355$	0.068	-
D'8	B	K-W : $H_{(2,32)}=0.939$	0.625	-	N	K-W : $H_{(2,39)}=1.045$	0.593	-
D'10	B	K-W : $H_{(2,32)}=0.422$	0.810	-	N	K-W : $H_{(2,39)}=4.777$	0.091	-
D'13	B-N	K-W : $H_{(2,32)}=3.444$	0.179	-	N-B	K-W : $H_{(2,39)}=2.474$	0.290	-
D'14	N	K-W : $H_{(2,33)}=7.206$	0.027	-	B	K-W : $H_{(2,39)}=4.638$	0.098	-
D'15	N	K-W : $H_{(2,33)}=1.684$	0.431	-	B	K-W : $H_{(2,39)}=6.244$	0.044	-
D'16	N	K-W : $H_{(2,32)}=5.541$	0.063	-	B	K-W : $H_{(2,39)}=2.051$	0.358	-
D'19	N	K-W : $H_{(2,32)}=10.780$	0.005	Ph>S	B	K-W : $H_{(2,39)}=2.051$	0.358	-
D'21	N	K-W : $H_{(2,33)}=4.303$	0.116	-	B	K-W : $H_{(2,39)}=2.576$	0.275	-
D'23	N	K-W : $H_{(2,32)}=4.281$	0.118	-	B	K-W : $H_{(2,39)}=0.913$	0.633	-
D'26	N	K-W : $H_{(2,32)}=16.022$	<0.001	Pm>S	B	K-W : $H_{(2,39)}=7.064$	0.029	-

4.4 Discussion

Les variables biométriques mesurées (poids, $SGR_M(\%)$, indice de Fulton) permettent dans un premier temps d'affirmer que les PCB n'ont pas produit d'effets sur la croissance des individus, et, dans un second temps, permettent de confirmer que les conditions restent bien comparables entre elles en terme de poids et de taille pour les expériences suivantes. Concernant le taux de croissance spécifique journalier, la baisse importante mesurée entre les jours D14 et D31 pour l'ensemble des conditions s'explique par un traitement lié à une pathologie contractée durant cette période. La pathologie a particulièrement touché les individus de la condition *Solvent* mais toutes les conditions ont reçu le même traitement (2 h de balnéation dans de l'OTC à 0.02 g.L^{-1} tous les 2 jours pendant 10 j). Suite au traitement, l'ensemble des conditions montre un taux de croissance journalier faible, mais néanmoins positif. Le taux de croissance journalier de périodes suivantes (D31-D48 et D48-D67) est comparable à celui obtenu avant la pathologie (D0-D14), ce qui montre une bonne récupération.

Les résultats des analyses chimiques montrent que les individus contaminés par voie alimentaire (*PCB medium* et *PCB high*) présentent bien une contamination aux PCB plus importante que les individus des conditions *Plain* et *Solvent*. Toutefois, les individus des conditions *Plain* et *Solvent* présentent tout de même des concentrations en PCB dans le muscle aux jours 31 et 67, sans qu'il y ait pour autant d'augmentation entre ces deux points. Des analyses chimiques complémentaires ont été réalisées sur ces deux conditions afin d'expliquer l'origine de ce bruit de fond. Ces analyses ont montré que le profil de concentration des congénères retrouvés dans le muscle des individus de ces deux conditions était différents de celui des congénères présents dans les granulés. L'origine de ce bruit de fond pourrait donc être lié aux structures d'élevage en elle-mêmes. Les profils de concentration observés entre conditions ou entre congénères au sein d'une même condition correspondent bien aux profils de concentration attendus : la condition *PCB medium* possède bien un niveau de concentration intermédiaire situé entre celui des groupes *Plain / Solvent* et *PCB high*.

L'augmentation de concentration des congénères entre les jours 31 et 67 n'est cependant pas linéaire, et ne suit pas l'augmentation de la croissance dans un système en conditions constantes de température (19°C). Cette cinétique de contamination est comparable à celle obtenue par [Eichinger et al. \(2010\)](#) sur des soles de même âge, contaminées avec le même aliment et le même mélange de PCB. Elle peut s'expliquer par la mise en place de mécanismes de détoxification au delà de 30 jours de contamination. Les plus faibles valeurs mesurées par [Eichinger et al. \(2010\)](#) autour de 30 et 60 jours de contamination comparées aux nôtres peuvent s'expliquer par le taux de croissance particulièrement élevé des soles durant notre expérience.

D'une manière générale, la contamination mesurée dans les soles durant cette expérience correspond à la contamination attendue au moment de la fabrication des aliments.

Les mesures chromatiques effectuées pendant la contamination n'ont montré aucune différence significative entre les conditions à aucune des dates de mesure.

Concernant les expériences de locomotion, l'ensemble des conditions présente une activité plus élevée la nuit que le jour. Ceci confirme le caractère nocturne des soles (Kruuk, 1963), y compris en situation d'élevage, c'est-à-dire sans pression de prédation ainsi qu'un nourrissage forcé le jour. De plus, l'ensemble des conditions présente une activité plus élevée au jour 30 qu'au jour 60. Ceci peut s'expliquer par le traitement lié à la pathologie, qui a pu augmenter la recherche alimentaire (suite à un déficit de croissance) ou influencer directement sur l'activité. Une hypothèse alternative, ou cumulative, serait qu'avec leur croissance, l'arène est devenue plus réduite, ce qui aurait pu renforcer l'effet confinement et réduire l'activité locomotrice. Lors des deux tests, les individus de la condition *Solvent* présentent une activité anormalement élevée, particulièrement lors du premier test. Ceci peut être aussi attribué à la maladie qui les a touché. Pour cette raison, l'interprétation des résultats de cette expérience se basera plutôt sur les différences entre les conditions *PCB medium* et *PCB high* et la condition *Plain*.

Lors du premier test au 30^e jour, la condition *PCB high* présente une activité significativement plus élevée que les autres durant les 6 premières heures du test (de 12 à 18 h) qui peut être expliquée par un temps d'adaptation plus long au nouvel environnement et une récupération altérée suite au stress lié au transfert du bac d'élevage à celui d'expérimentation. Lors du deuxième test à 60 j, ceci se produit à nouveau, avec les conditions *PCB medium* et *PCB high* qui présentent une activité significativement plus élevée que la condition *Plain*.

La condition *PCB medium* est significativement moins active pendant l'ensemble de la nuit (de 21 h à 9 h) du test à 30 j. Cette différence ne se retrouve pas lors du deuxième test. Ceci peut s'expliquer par deux raisons :

- la première étant que les soles ont eu une croissance importante (50% en moyenne) et avaient donc moins d'espace dans l'enceinte à D67 qu'à D31 ;
- la deuxième étant que la perte de croissance engendrée par le traitement lié à la pathologie peut augmenter l'activité locomotrice pour la recherche d'aliments ;

À D30, il y a une moins bonne acclimatation de la condition *PCB high* et une prostration renforcée de la condition *PCB medium* lors du premier test. Alors que le problème d'adaptation reste visible sur les 6 premières heures du test à 60 j (cette fois-ci pour les deux conditions contaminées), la plus faible activité nocturne des *PCB medium* n'est plus significative.

Les challenges d'enfouissement après 30 j de contamination sur 30 s n'ont quant à eux


montré aucune différence significative entre les conditions.

Pendant la phase de décontamination, le test d'homochromie réalisé pendant 26 jours a montré une moins bonne adaptation des conditions *PCB medium* et *PCB high* chez les individus disposés sur un fond sombre. Ces résultats ont été retrouvés à la fin du test chez les individus ayant été préalablement placés sur fond sombre. La différence entre les conditions observées entre le dernier jour de la phase de contamination (D67) et le premier jour de la phase de décontamination (D'0) s'explique par le fait que les lots constitués à D'0 constituent un sous-échantillonnage de D67. De plus, le manipulateur est resté le même pour les points D0, D31, D67, mais c'est une autre personne qui a réalisé les mesures de D'0 à D'67.

Les individus contaminés semblent donc s'adapter plus facilement aux fonds de couleur clairs qu'à ceux de couleur sombre. Une première hypothèse expliquant cette difficulté à changer de couleur serait une moins bonne perception visuelle, mais aucune étude jusqu'à présent n'a mis en évidence d'effet des PCB sur la vision, auquel cas le problème aurait dû se présenter aussi lors du passage sur fond clair, ce qui n'est pas arrivé. L'explication la plus plausible serait liée au fait que l'assombrissement des soles se fait à court terme par dilatation des chromatophores puis par synthèse de pigment, contrairement à l'éclaircissement [Burton \(2002\)](#). Cette synthèse représentant un coût métabolique et donc un état physiologique correct ce qui pourrait ne pas être le cas chez les soles contaminées, dont une partie de l'énergie métabolique est allouée à la détoxification.


L'altération de l'activité locomotrice et des capacités des soles à s'assombrir avait déjà été mise en évidence dans une première étude menée en 2009 (Fig. 54) sur un nombre d'individus moindre et dans des conditions d'élevage différentes (individus placés par groupes de 8 dans des aquarium de 60 L). Cette expérience avait montré une baisse significative du comportement exploratoire des soles de la condition la plus contaminée (« PCB fort », équivalente à la condition *PCB high* de notre expérience) après 30 jours de contamination. De plus, une préférence plus importante des individus contaminés pour un environnement sombre a été montrée, bien que leur capacité à s'assombrir soit aussi altérée lors de cette étude. Enfin, les individus contaminés avaient aussi montré des capacités une altération des capacités d'enfouissement.

ifremer



Effets des polluants organiques sur le comportement des poissons

Étude présentée :
Effets des PCB sur le comportement de la sole
 Samuel PÉAN¹, Anne-Lise MAYERAS¹, Véronique LOIZEAU², Marie-Laure BÉGOUT¹
 1 – IFREMER, place Gaby Coll BP 5, 17137 L'Hommeau - FRANCE
 2 – IFREMER, Z.I. Pointe du Diable BP 70, 29280 Plouzané - FRANCE



Agence Nationale de la Recherche
ANR
 VMC / SoleBEMol

Que sont les PCB ?

Les PCB sont des polluants dits « organiques », créés par l'Homme, très stables dans l'environnement (demi-vie de 2700 ans). Ces composés hydrophobes sont très présents dans les sédiments marins et s'accumulent dans les organismes vivants.

Pourquoi étudier le comportement ?

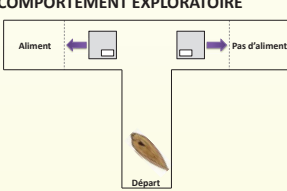
L'étude du comportement est une approche non invasive et non destructrice, qui permet d'obtenir une grande quantité d'information par simple observation. L'utilisation d'outils informatiques (comme les logiciels d'analyse d'images) permet d'obtenir des données de plus en plus précises.

Pourquoi choisir la sole ?

La sole commune *Solea solea* est une espèce d'intérêt économique. C'est une espèce benthique (=« qui vit au fond »). Cette espèce est donc très exposée aux sédiments contaminés.

Voici les expériences qui ont été menées sur des soles juvéniles, après 30 jours de contamination aux PCB par voie alimentaire. Quatre groupes ont été constitués, en fonction de leurs aliments : **Témoin** : aliment commercial standard, non contaminé; **Solvant** : aliment contenant uniquement du solvant (isooctane), nécessaire pour intégrer les PCB dans l'aliment; **PCB_{faible}** : aliment contenant du solvant et une faible dose de PCB; **PCB_{forte}** : aliment contenant du solvant et une forte dose de PCB (équivalent à la concentration observée en Baie de Seine).

COMPORTEMENT EXPLORATOIRE



Cette expérience a pour but de suivre l'évolution d'un poisson dans un labyrinthe (fig.1) pendant 2h grâce à une caméra et un logiciel de détection de mouvements (Noldus Ethovision).

Plusieurs variables ont été analysées (temps pour atteindre la zone d'alimentation, temps de mobilité, etc.). Le plus représentatif d'entre eux est la distance parcourue moyenne (fig.2) qui montre que le groupe PCB_{forte} se déplace significativement moins que les autres.

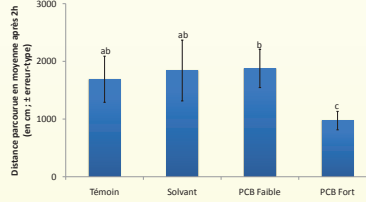



Figure 2 : Distance parcourue moyenne (en cm). Les lettres représentent les différences entre traitements (Kruskal-Wallis – $p < 0.05$ –Dunn's post-test)

CHOIX DE COULEUR DE FOND



Pendant 2h, cinq soles sont filmées sur un substrat bicolore (noir vs blanc ; fig.3). Les vidéos sont traitées par le plugin MTrack du logiciel ImageJ (tracking manuel). Ceci permet d'obtenir les coordonnées de chaque individu, et donc de calculer leur position exacte dans le bac ainsi que la distance qui les sépare les uns des autres.

Le niveau de contamination n'explique pas la variation du coefficient de dispersion (fig.4). En revanche, plus le niveau de contamination augmente, plus les individus passent du temps en zone noire (fig.4).

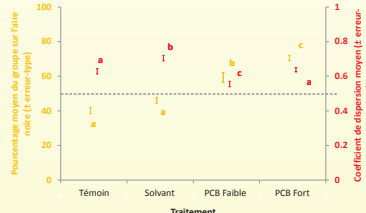
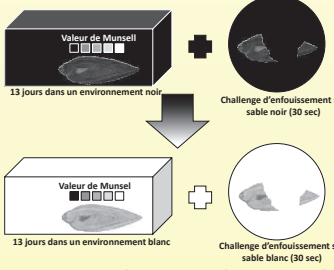


Figure 4 : Pourcentage du groupe sur fond noir et coefficient de dispersion. Les lettres représentent les différences entre traitements (Kruskal-Wallis – $p < 0.05$ –Dunn's post-test)

CAPACITÉS CRYPTIQUES ET ENFOUSSEMENT



Durant 13 jours, les soles sont placées dans un environnement noir (fig.5). Régulièrement, leur pigmentation est comparée à une gamme de Munsell® (table 2.5Y). Immédiatement après, un challenge d'enfouissement dans du sable noir est effectué. Les 13 jours suivants, elles sont placées dans un environnement blanc, et challengées dans du sable clair.

Les résultats montrent qu'en terme de cinétique de pigmentation (fig.6), le groupe PCB_{forte} se pigmente plus difficilement que le groupe Témoin en environnement noir et se dépigmente plus facilement sur environnement blanc.

Au niveau des capacités d'enfouissement (fig.7), le groupe PCB_{forte} met significativement plus de temps à s'enfouir que le groupe Témoin.

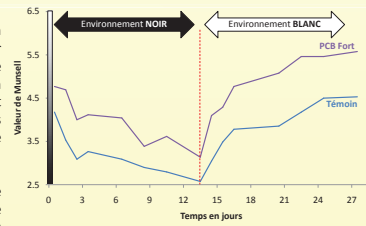


Figure 6 : Evolution de la valeur de Munsell® moyenne (table 2.5Y)

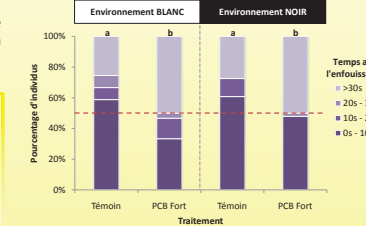


Figure 7 : Proportions d'individus pour chaque classe de latence d'enfouissement en fonction de la couleur de fond. Les lettres représentent les différences entre traitements et environnements (Test de K χ^2)

CONCLUSION

En conclusion une exposition à une forte dose de PCB : i) **diminue** la distance parcourue lors de l'exploration d'un nouveau milieu (fig.2) ; ii) **diminue** les capacités de pigmentation (fig.6) et d'enfouissement (fig.7) et iii) **augmente** la préférence pour les milieux de couleur noire (fig.4). Les individus contaminés préfèrent les couleurs sombres mais ont une pigmentation plus claire : ces deux résultats peuvent s'expliquer par le stress métabolique dû aux phénomènes de décontamination.

A cause de leurs capacités cryptiques réduites, les individus contaminés peuvent donc être plus facilement visibles par leurs prédateurs, ce qui peut avoir des conséquences négatives quant à la survie de la population.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Didier LEGUAY et Michel PRINEAU, sans qui l'aménagement de la salle d'expérimentation n'aurait pas été possible.

FIGURE 54 – Résultats obtenus après une première expérience de contamination sur 30 j. Poster présenté dans le cadre de la Journée des Doctorants de l'Université de La Rochelle en 2010.

132

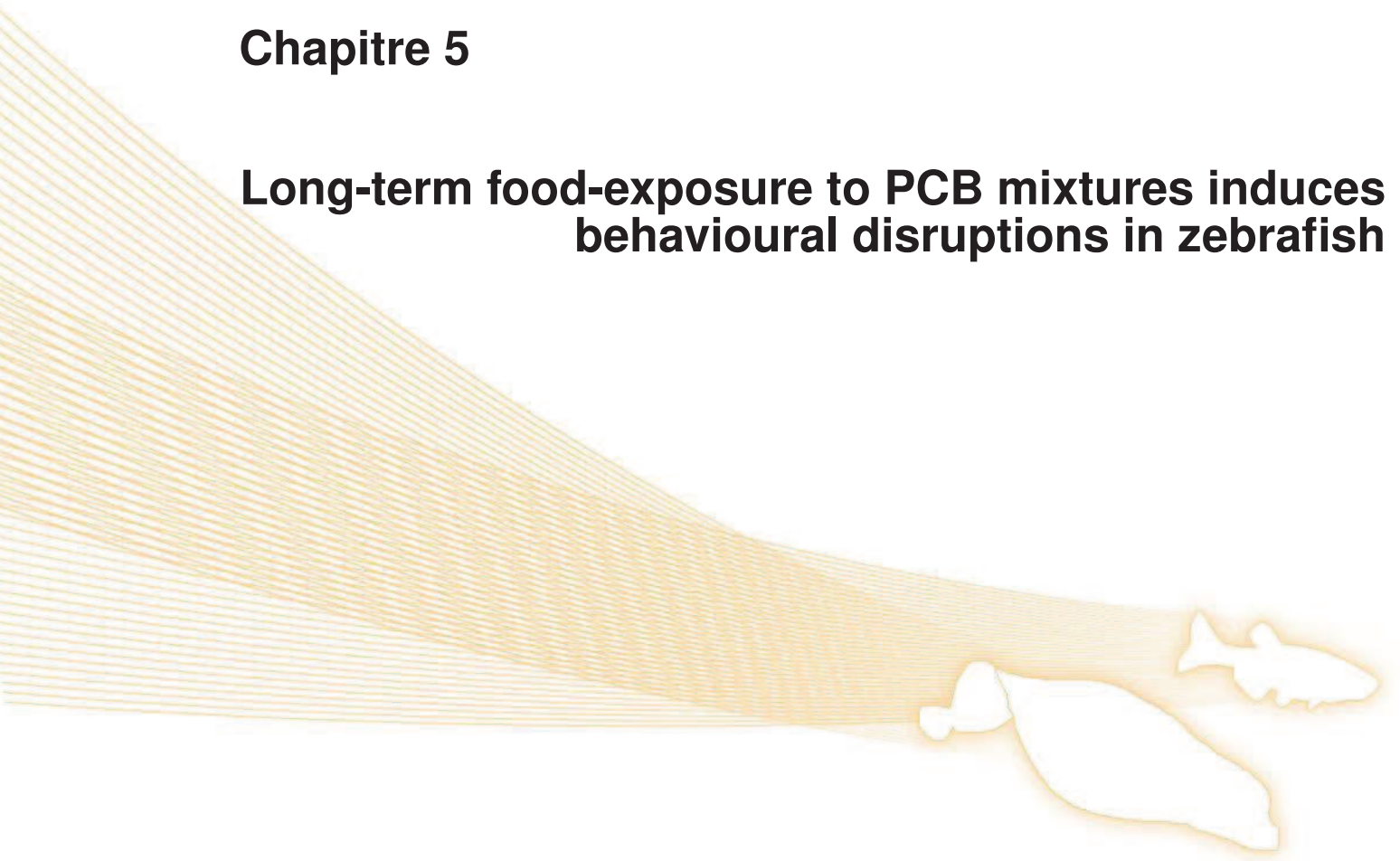
4.5 Conclusions

Cette étude a montré une différence significative du temps d'adaptation d'individus contaminés aux PCB à un nouvel environnement après 30 et 60 j de contamination. Pendant la nuit, les individus contaminés à dose intermédiaire (*PCB medium*) ont montré une prostration importante après 30 j de contamination, vraisemblablement renforcée par le stress induit par le traitement médicamenteux appliqué à l'ensemble des conditions entre 30 et 60 j. Les individus contaminés ont aussi montré de plus grandes difficultés à s'assombrir lors du challenge sur fond noir, sans pour autant rencontrer de problème pour s'éclaircir. Aucune différence significative n'a été montrée dans cette étude quant à un effet des PCB sur le poids, le taux de croissance, l'indice de condition ou encore les capacités d'enfouissement mesurées à 30 jours.

D'une manière générale, l'altération du comportement locomoteur ainsi que des capacités cryptiques par les PCB peut avoir des conséquences écologiques importantes. En effet, concernant la locomotion, une activité réduite aura pour conséquences de diminuer la recherche alimentaire, alors qu'une capacité d'adaptation chromatique limitée pourra augmenter la vulnérabilité des soles vis-à-vis des prédateurs.

Chapitre 5

Long-term food-exposure to PCB mixtures induces behavioural disruptions in zebrafish



Samuel PÉAN
Tarek DAOUK
Laura LYPHOUT
Didier LEGUAY
Véronique LOIZEAU
Xavier COUSIN
Marie-Laure BÉGOUT

Résumé

Les poissons zèbres utilisés dans cette étude ont été préalablement contaminés pendant 250 jours par voie alimentaire aux PCB, en utilisant des doses et des mélanges existants dans l'environnement. Différents traits comportementaux ont été étudiés, tels que le choix de la couleur de fond, l'exploration lors d'un challenge en *T-maze* ou encore l'activité de nage pendant 24 h. Les individus appartenant à la condition la plus contaminée (équivalente à celle trouvée en baie de Seine) ont montré une augmentation de l'activité locomotrice en fin de nuit. Les poissons appartenant à la condition de contamination intermédiaire ont montré une altération comportementale proche du syndrome d'hyperactivité et de manque d'attention (ADHD) déjà observé chez des Hommes contaminés aux PCB. Les potentielles conséquences écologiques de ces résultats sont discutées en lien avec les questions de reproduction, de *fitness* populationnelle et de survie. Ces résultats montrent que les poissons zèbres peuvent aussi servir comme modèle pour mieux comprendre les mécanismes provoquant ces syndromes ADHD induits par les PCB chez l'Homme.

Cette étude sur une première génération de poisson zèbre a permis de mettre en place un premier lot d'expériences permettant de détecter une altération comportementale liée à une contamination aux PCB. D'un point de vue méthodologique, les expériences basées sur le suivi de la locomotion par video tracking sont adaptées pour mesurer une altération comportementale liée aux PCB.

Long-term food-exposure to PCB mixtures induces behavioural disruptions in zebrafish

Samuel Péan, Tarek Daouk, Laura Lyphout, Véronique Loizeau, Xavier Cousin,
Marie-Laure Bégout

Abstract: Use of polychlorinated biphenyls (PCBs) has been banned for several decades but these compounds are still present in the environment and can be transferred up through the trophic chain, including to humans. Field analyses and experimental exposures have established links between PCB exposure and alterations in animal physiology and behaviour. In the present study, several behavioural traits were monitored after long-term exposure of zebrafish to a PCB mixture mimicking known environmental contamination levels and congener composition. Fish exposed to the highest dose (equivalent to that found in the Seine Estuary) displayed an increased swimming activity during the period at the end of the night. Fish exposed to an intermediate dose (equivalent to that found in the Loire estuary) displayed behavioural disruption analogous to hyperactivity that showed some similarities to a human behavioural deficit syndrome known as attention deficit / hyperactivity disorder (ADHD), which can be observed in humans after exposure to PCBs. Potential ecological consequences are discussed with regard to reproduction, fitness and survival. These findings suggest that zebrafish could also serve as a model to better understand mechanisms underpinning behavioural disruptions and potentially be used to screen for drugs to alleviate PCB-induced ADHD in humans.

Keywords: background colour preference, exploration, swimming activity, organic pollutant effects, video analysis.

5.1 Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) are synthetic molecules composed of a biphenyl nucleus with chlorine at any or all of the 10 available sites (McFarland et Clarke, 1989). The ortho, meta, and para positions are important in determining the chemical properties of PCB, such as non-flammability, hydrophobic quality and chemical stability. The usefulness of these properties led PCBs to be used for a wide range of applications from the 1930s onwards (Breivik et al., 2002; Beyer et Biziuk, 2009). However, as their toxicity became recognised, PCBs were progressively banned in most developed countries during the 1980s (Letz, 1983). Nevertheless, due to their massive production, extensive use and environmental persistence, these compounds had accumulated in many ecosystems all over the world, including those of aquatic environments, where they were trapped in the sediments. Contaminations continue to occur because PCBs can be transferred from the sediment to the lower trophic levels of an ecosystem and then to the higher ones. They can also be released when sediments are re-suspended as a consequence of human activ-

ities (e.g., trawling or dredging) or natural events (floods). The long biological half-life and high liposolubility of PCBs can lead to their bioaccumulation and biomagnification through food chains over a wide range of trophic levels, leading to a potential risk for high trophic level predators (Fisk *et al.*, 1998; Borgå *et al.*, 2001; Fisk *et al.*, 2001; Nfon et Cousins, 2006). For human and fish populations, dietary intake, especially the consumption of marine organisms, is considered one of the most important sources of exposure to PCBs (Johansen *et al.*, 1996; Muir *et al.*, 2003; Nyman *et al.*, 2002; Pompa *et al.*, 2003). Consequently, many recommendations have been published by local or national agencies to limit human consumption of fish and shellfish in coastal or freshwater water bodies.

Data from epidemiologic studies and from the field have suggested that exposure to PCBs may have adverse effects on the physiology of animals, including humans. Experimental exposures have been performed in recent decades in order to understand PCB toxicity and its underlying mechanisms. These analyses have demonstrated alteration of reproductive, hepatic, renal and endocrine functions in animal models and humans (Holene *et al.*, 1998; Crofton *et al.*, 2000; Safe, 2005; Zimmer *et al.*, 2009; Schell et Gallo, 2010). The use of model fish species, such as medaka or zebrafish, for ecotoxicology studies has developed rapidly over the last decade (Spitsbergen et Kent, 2003; Hill *et al.*, 2005; Hinton *et al.*, 2005). These models demonstrated several alterations in physiology after PCB exposure, including changes to development and reproduction (Billsson *et al.*, 1998; Örn *et al.*, 1998; Grimes *et al.*, 2008; Lyche *et al.*, 2010; Nakayama *et al.*, 2005b; Daouk *et al.*, 2011; Nakayama *et al.*, 2011).

Quantitative behaviour analysis is now considered to be a good indicator of organism stress response. It can be used to test a wide set of chemical stressors in pharmacology, toxicology and ecotoxicology testing and the use of fish models in this context is now widely accepted (Creton, 2009; Champagne *et al.*, 2010; Norton et Bally-Cuif, 2010; Steenbergen *et al.*, 2011). Furthermore, in the particular context of ecotoxicology, individual responses are situated at the interface between ecological relevance and the understanding of toxicity mechanisms, making individual behaviour a particularly relevant and integrative indicator of pollutant effects (Scherer, 1992; Linney *et al.*, 2004; Hinton *et al.*, 2005; Blechinger *et al.*, 2007; MacPhail *et al.*, 2009).

Several studies have demonstrated that exposure to PCBs can modify certain behavioural traits in animals and humans (Berger *et al.*, 2001; Rice, 2000; Eubig *et al.*, 2010; Sagiv *et al.*, 2010). More recently, acute exposure to PCBs has been demonstrated to modify behaviour in fish (Lerner *et al.*, 2007; Nakayama *et al.*, 2004, 2005a; Schmidt *et al.*, 2005).

In this study, we wanted to use contamination conditions as close as possible to environmental situations to identify behavioural effects of long term exposure to PCB mixtures through diet. For this purpose, zebrafish were fed contaminated diets over more than 8

months, using PCB mixtures similar in doses and composition to those measured in European coastal molluscs. Several behavioural tests (background colour preference, T-maze exploration and swimming activity over 24 h) were used to assess exploratory and locomotion behaviour, which are essential components of fish behaviour in the wild (e.g., searching for food and congeners, predator avoidance, etc.) and are indicative of the type of behavioural disruption that may be observed in humans.

5.2 Materials and methods

5.2.1 Rearing conditions and PCB exposure

The present behavioural experiments were part of a larger trial, described in full by [Daouk *et al.* \(2011\)](#). Wild type zebrafish (*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 $300 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. 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 10 l tanks in a rack. Water was automatically changed every hour leading to an exchange rate of $4\text{L}\cdot\text{day}^{-1}\cdot\text{tank}^{-1}$. 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 Gouessant (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). Two diets were prepared: PCB-medium and PCB-high for which cumulated congeners concentrations were respectively $514.8 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ $2302 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively ([Daouk *et al.*, 2011](#)). These concentrations correspond to the one

monitored in medium and highly contaminated sites (respectively Loire and Seine estuaries; data from French coastal chemical contamination survey network – ROCCH). 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. More details about doses of each congener are available in [Daouk *et al.* \(2011\)](#).

5.2.2 Behavioural experiments

Behavioural experiments were performed after 250 d of contamination and were done in a dedicated room, kept at 27 ± 1 °C with a 14:10 light:dark photoperiod synchronized with the rearing room in order to minimize unwanted correlated effects. Daylight was started at 8:30 and there were no twilight periods. Only females were used for the background colour preference and T-Maze exploration tests. For the 24-h swimming activity test, 6 females and 6 males were used per treatment to evaluate a possible sex-effect on daily activity.

Background colour preference During this experiment, fish were individually placed in a 3 l (24.5 x 15 x 13.5 cm, Aquabox[®] 3, AQUA SCHWARTZ GmbH, Göttingen, Germany) filled with the water used in the system. These tanks were divided equally into two parts: one with white bottom and walls, exposed to light, and one with black bottom and walls, kept in shadow. Twelve fish were tested per treatment. Recording sessions lasted 10 min and 4 tanks were recorded during each session (one fish from each treatment). Between each session, the water in each tank was changed, and relative position of the fish from the different treatments was changed at random.

T-maze exploration This experiment was adapted from [Ninkovic et Bally-Cuif \(2006\)](#). The T-maze was built with four arms (Fig. 55A). For each trial, one of the long arms was blocked with a removable partition and the other was used as start area, permitting half of a treatment (N=6) to be tested in the deep area on the left and half of a treatment (N=6) in deep area on the right (Fig. 55B), thus testing for laterality bias.

The T-maze was subdivided in 2 areas:

- the deep area, which was 10 cm in water depth, 23 cm wide and 23 cm long and which had black walls, marbles, plastic grass and an opaque plastic tube that could be used as a shelter; this area was considered a favourable zone ([Ninkovic et Bally-Cuif, 2006](#)) ;

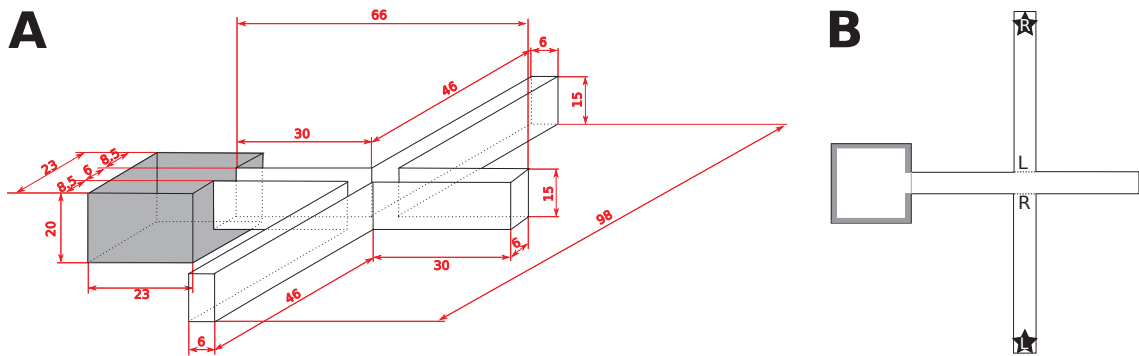


Figure 55: Scheme of the T-maze used to measure exploratory ability of zebrafish. The deeper area has black walls represented in grey. **A**: 3-D view. All dimensions are given in centimetres. **B**: View from above. Stars represent the start areas for the right (R) or left (L) sides. Dotted lines represent the removable partition used to block the arm in front of the start area. The letter by the partition indicates the one inserted when the deep area is on the left or the right.

- the shallow area, which was 5 cm in water depth, composed of the start arm (46 cm long), the arm leading to the deep area and the wrong arm, in the opposite direction to the deep area (total length of these two arms was 66 cm).

Fish were placed individually in a 1 L tank in the experiment room the day before the experiment. For each trial, a single fish was removed from its tank and placed in the start area of the longest arm of the T-maze and exploration activity was immediately recorded for 5 min.

24h swimming activity For each session, fish from each treatment were placed randomly (to avoid tank position and session bias) in the same 3 L tanks as used for the background colour preference tests, filled with 1.5 L of system water. The 12 tanks (4 treatments with 3 fish each) were isolated from neighbouring tanks by opaque walls. The whole set-up was placed on top of an infrared apparatus (IR floor 1x1 m, Noldus, The Netherlands). During the day, the room was lit with 2 halogen spotlights (Philips 80 W). During the night, the spotlights were turned off and infrared light from the floor was used to allow recordings of fish movements. Fish were placed in their tanks at 18:00 the day before the experiment, for one night of acclimatization. Recording started the next day at 12:30 and lasted 24 h. Four sessions were conducted, giving a total of 12 fish tested per treatment. The water was changed after each session.

5.2.3 Data recording and analysis

Videos for the T-maze and the 24-h swimming activity experiments were recorded with an analog camera (Panasonic CCTV WV-CL920A) linked to a PC with an acquisition card. Track extraction and analysis were then performed with Ethovision 6.1 software (Noldus, The Netherlands). Data were acquired by Ethovision at 25 frames per second and extracted data nested every 30 s for saving.

As the background colour preference videos were uneven, automatic video tracking analysis was not possible. Thus, videos were acquired in the same way as above but analysed manually using the "Observational Data Recorder (ODRec)" freeware (Samuel Péan, <http://www.samuelpean.com/odrec>).

5.2.4 Measured variables and statistical analysis

The variables chosen to evaluate behavioural performances were the following:

- time spent (in s) by a fish over the black or white area in the background colour preference test and number of passages between the two areas;
- Velocity (in $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$): the distance moved by the centre point of the individual fish per unit time between two consecutive X-Y coordinates acquired;
- time mobile (in s): the total duration of movement of the fish expressed as proportion of time mobile (%) for each 30-s interval;
- binary coding for reaching the deep area: 0 (failure) and 1 (success);
- time to reach deep area (in s): the time between the beginning of the trial and the first entry in the deep area.
- distance moved (in cm): the distance travelled by the centre point of the subject between two consecutive X-Y coordinates acquired, nested over 30 s intervals and then summed over a 30 min period for the 24 h experiment;

Data were statistically tested using Statistica 9.0 (Statsoft, United States of America). For each variable, Shapiro-Wilk test was performed first to check the normality and followed by a Bartlett's test to check the homoscedasticity. When normality and homoscedasticity rules were respected, t-test or ANOVA was chosen, else Mann-Whitney or Kruskal-Wallis tests (Zar, 1999), followed by multiple comparisons rank tests were performed to compare resulting variables between the four groups (Plain, Solvent, PCB-medium, PCB-high). For the 24h swimming activity experiment, transition periods induced an exacerbated pattern; it was thus necessary to analyse these 30 min "Light-off" and "Light-on" periods separately. Remaining day and night periods were divided into blocks of 6 or 7 30 min period (for day 1: D1-1 to D1-3, for night: N1-1 to N1-3 and, finally, D2-1). Within each period (of which there were 10 in total), Kruskal-Wallis tests

were used to compare the distances moved (summed per 30 min) between the different treatments. All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance.

5.3 Results

The experiments assessed some behavioural responses of zebrafish exposed to two levels of a PCB mixture (PCB-medium and PCB-high) via a spiked diet at two levels, compared with a control treatment containing solvent (Solvent) alone and a fourth group of fish fed an unaltered diet (Plain). This approach made it possible to detect differences caused by the solvent alone. No mortality occurred during the course of the behavioural experiments. Fish weight and length were not significantly different between treatment groups (weight: 750 ± 75.3 mg, $KW_{(3,144)}=1.624$, $p=0.654$; length: 2.1 ± 0.3 cm, $KW_{(3,144)}=0.023$, $p=0.991$).

5.3.1 Background colour preference

Fish from all treatments spent more than 65% of the time in the black area (Fig. 56A). However, the Kruskal-Wallis test showed a significant treatment effect ($KW_{(3,48)}=17.069$, $p<0.01$) and post-hoc multiple comparisons showed that PCB-medium fish spent significantly less time in the black area (6.98 ± 0.35 min) than fish from Solvent (9.15 ± 0.20 min) and PCB-high (8.6 ± 0.37 min) treatments. PCB-medium fish also showed a significantly higher number of passages from one zone to the other, corresponding to double that of fish from the Solvent treatment (85.2 ± 9.51 versus 41.3 ± 5.28 ; $KW_{(3,48)}=11.804$, $p=0.0081$; Fig. 56B). The number of passages for fish from other treatments was intermediate and in this latter case, Solvent treatment differed from Plain treatment and this is the only occurrence of such a difference between Solvent and Plain fish.

5.3.2 T-maze exploration

The first part of the T-maze results focuses on the shallow area and, therefore, concerns all the fish.

The mean velocity was significantly different between treatments ($KW=19.895$, $p<0.01$, $df=3$, $N=48$, Fig. 57A). Multiple comparison post-hoc tests showed that velocity for the PCB-medium fish was significantly higher (21.2 ± 2.7 cm.s⁻¹) than for Solvent (9.8 ± 1.2 cm.s⁻¹), Plain (8.3 ± 1.3 cm.s⁻¹) and PCB-high (10.6 ± 1.2 cm.s⁻¹) fish. For the proportion of time the fish were mobile in the shallow area, the Kruskal-Wallis test with multiple comparison rank tests indicated a significant difference between treatments ($KW_{(3,48)}=12.961$,

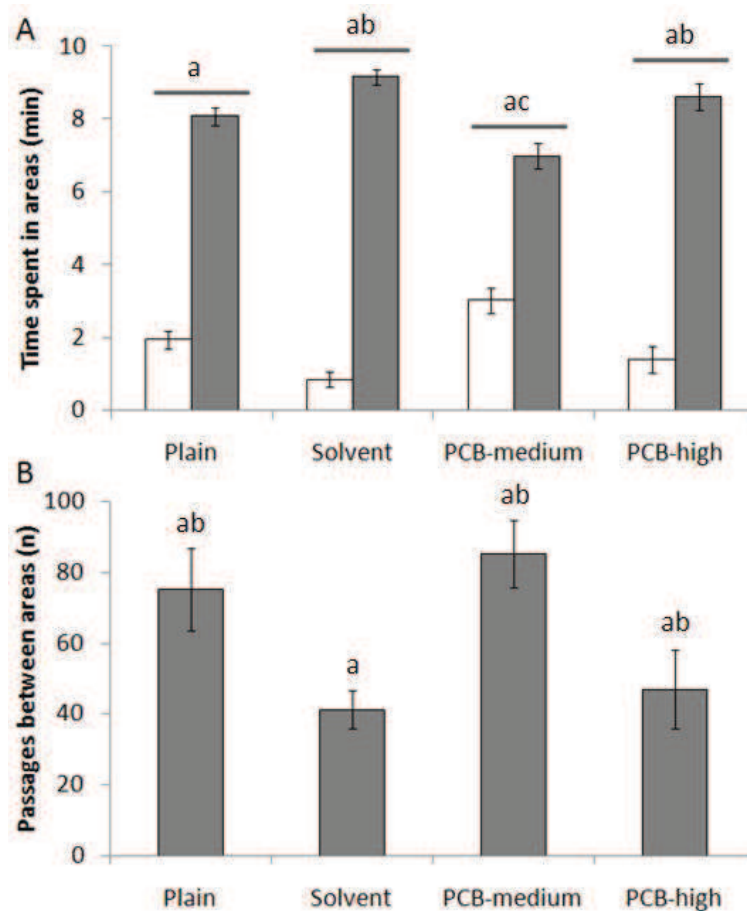


Figure 56: Background colour preference test in relation to diet contamination. **A**: Time spent in each area during the 10 min of the test; **B**: Number of passages between the areas with different backgrounds during the test (mean±S.E.M.; different letters indicate significant differences among treatments; $p < 0.01$; $n = 12$). Dark bars represent the dark areas, pale bars the light area.

$p < 0.01$, Fig. 57B), with PCB-medium fish being significantly more mobile ($80.9 \pm 5.1\%$) than fish in other treatments (42% to 55%). The second part of the analysis focused on the deeper area and, therefore, only concerned fish that reached this area. The number of fish that reached the deep area (left, right and total) is presented in Tab. 10. The number of individuals reaching the deep area was significantly higher in the PCB-medium treatment: 12 fish out of the 12 tested, compared with 4 to 8 out of 12 for the other treatments. A laterality bias was only observed for fish from the Solvent treatment: indeed the four fish that reached the deep area did so when it was located on the left arm (Mann-Whitney- U ; $p = 0.024$).

Data on fish that reached the deep area were analysed further, irrespective of their lateral position (left or right). Recordings of time until the first entry into the deeper

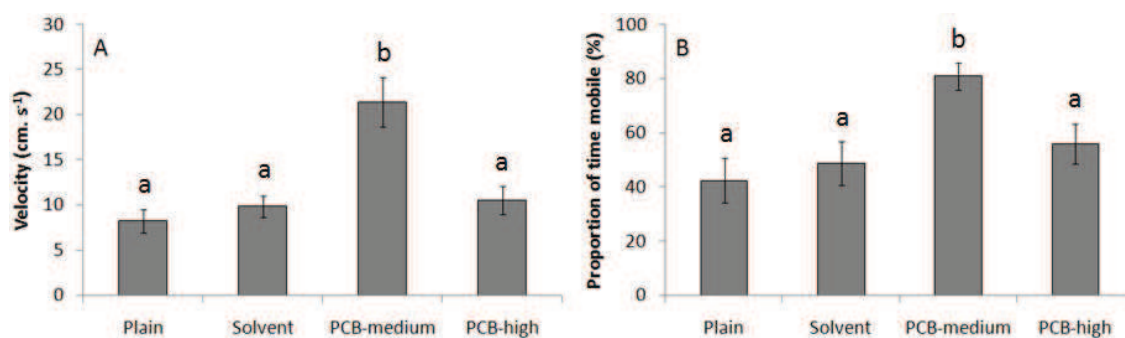


Figure 57: Swimming activity measured in the shallow area during the T-maze test. **A**: Velocity measured in the shallow area. **B**: Proportion of time mobile (mean±S.E.M.; different letters indicate significant differences among treatments; $p < 0.01$; $n = 12$).

Table 10: Success rate and laterality in the T-maze test. Number of individuals (out of 12 tested) that reached the deep area, depending on its position in relation to the start area. Bold print indicates statistical significance for the laterality bias. Different letters indicate significant differences among treatments ($p < 0.01$).

Treatment	Fish reaching deep area (over 12 fish tested)	Deep area on the left	Deep area on the right	Laterality bias (p-value)
Plain	5 ^a	2	3	0.640
Solvent	4 ^a	4	0	0.024
PCB-medium	12 ^b	6	6	1.000
PCB-high	8 ^a	5	3	0.378
<i>Total</i>	29	17	12	

area (Fig. 58A) indicated that fish from PCB-medium treatment reached the deep area significantly faster than any other fish, including those in the Solvent treatment (28.7 ± 9.4 s and 110 ± 50 s, respectively; $KW(3,29) = 10.362$, $p < 0.02$). The time spent in the deep area was not significantly different between treatments ($KW_{(3,29)} = 5.486$, $p = 0.139$; Fig. 58B).

5.3.3 24-h swimming activity

Constant monitoring of swimming activity over 24-h allowed several periods to be identified that were characterised by specific behavioural patterns according to day/night and light changes. In our system, light change was abrupt and provoked an intense increase in swimming activity (distance travelled; Fig. 59A) both at lights off (22:30) and lights on (8:30). Apart from these periods, distance travelled showed relatively low variation within day or night periods or between days and night periods (Fig. 59A), and no sex effect was observed on distance travelled. No difference was observed between treat-

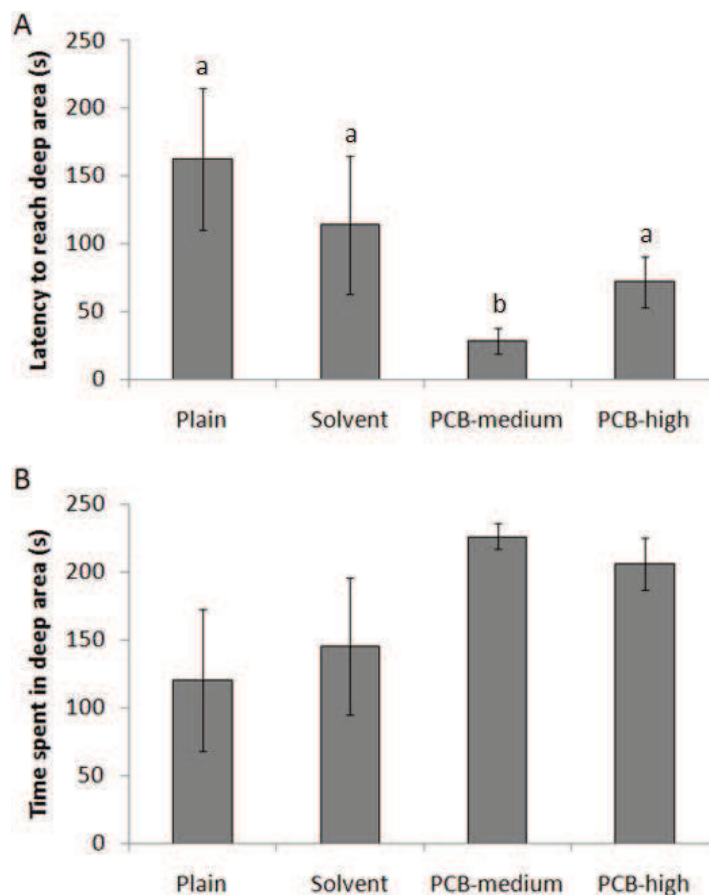


Figure 58: Swimming activity measured in the deep area during the T-maze test. **A**: Latency to reach the deep area ; **B**: Total time spent in the deep area (mean±S.E.M.; different letters indicate significant differences among treatments; $p < 0.02$; sample size depends on the number of fish that reached deep area for each treatment: Plain $n=5$, Solvent $n=5$, PCB-medium $n=12$, PCB-high $n=8$).

ments during day periods or during light regime changes. Some differences did appear during the night periods, with a significant increase in distance travelled for PCB-high fish compared with the Solvent treatment for periods N1-2 ($KW_{(3, 48)}=8.843$, $p=0.0314$), and N1-3 ($KW_{(3, 48)}=15.11$, $p=0.0017$; Fig.59B).

5.4 Discussion

Our results demonstrate that chronic exposure of fish to diets spiked with mixtures of PCBs can alter behavioural traits such as environment choice, exploration and swimming activity. Behavioural alterations were observed in all tests (background colour preference, T-maze and 24-h swimming activity) on fish that had been fed for 8 months on diets

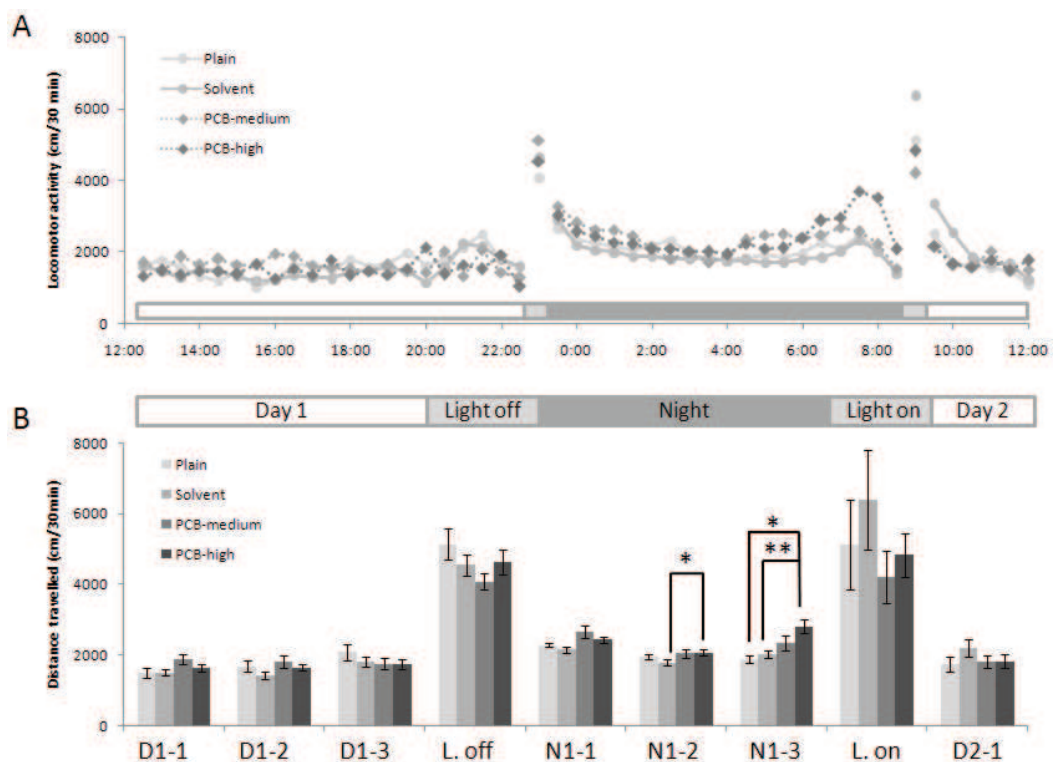


Figure 59: Locomotor variables measured during the 24-h swimming activity test. **A:** Locomotor activity during the different periods studied. For the sake of clarity, only mean distance is shown. The different periods are indicated under the locomotor activity curves using the same colour scheme as in Fig. 5B. **B:** Distance travelled for each period and each treatment. The grayscale rule above the bars indicates the light status / period of the day (mean±S.E.M.; *p<0.05; **p<0.01; n=12; L. off: Light off; L. on: Light on).

containing PCBs: PCB-medium, containing a total PCB concentration of 515 ng.g⁻¹ and PCB-high, containing 2302 ng.g⁻¹. Differential alterations could also be observed between the treatments.

The results can be interpreted in different ways: first, in the light of anticipatory and rhythmic activity and, second, as responses to a challenging situation. Dose response, ecological relevance and potential impact on human health are further discussed below.

An increase in swimming activity followed by a decrease was observed in all treatments at the end of the night, which can be interpreted as an anticipation of the forthcoming light change (Aranda *et al.*, 2001). However, for PCB-high fish, the anticipation process and swimming activity were modified in two ways. First, the onset of anticipatory activity appeared more pronounced, as demonstrated by a significantly higher increase in the distance travelled during the night period immediately preceding the turning on of the light, *i.e.*, 3 hours in advance. Second, for these fish, we also observed sustained

activity in the middle of the night. This could be due to a modification of the circadian rhythm that may only occur at high doses, since such an alternation was not noted for the PCB-medium fish. A modification of the circadian rhythm has already been reported both *in vitro* and *in vivo* after exposure to dioxin, and involves regulation of circadian genes by AhR (Pesonen *et al.*, 2000; Garrett et Gasiewicz, 2006; Mukai *et al.*, 2008; Shimba et Watabe, 2009; McIntosh *et al.*, 2010; Xu et Zon, 2010; Tischkau *et al.*, 2011). The mixture used here contains no classic dioxin-like compounds (*i.e.*, dioxin-like non-ortho planar congeners such as CB-77, CB-126 or CB-169) but did contain some mono-ortho substituted congeners (CB-105, CB-118 and CB-156) that, despite being less coplanar, are also referred to as dioxin-like and which bind AhR, albeit with a lower affinity than coplanar congeners (Jensen *et al.*, 2010). In this context, it is noteworthy that a previous study detected differential expression of the *clock* gene in a microarray analysis of the brain of rat exposed to Aroclor 1254 (Sazonova *et al.*, 2011).

In challenging situations (background colour preference and T-maze) and with no acclimatization period, particular behavioural disruption was observed in fish exposed to the PCB-medium diet. All changes observed suggested that overall activity was increased in the challenged fish. Indeed, in all these tests, deviation from the Solvent treatment results can be linked to an increase in swimming activity. In the case of the background colour preference test, the preferred background colour was the dark one, which is in agreement with previous reports (Ninkovic et Bally-Cuif, 2006; Serra *et al.*, 1999) but is also known to fluctuate depending on light levels and previous conditioning of the fish (Stephenson *et al.*, 2011). PCB-medium fish spent however less time in this area compared with the others and this could be linked to an increased number of zone changes. For this latter variable, Plain did differ from Solvent fish and showed a high number of zone changes but still preferred to stay on the black background colour. It is the only variable highlighting a differential response between Plain and Solvent and we have no direct explanation but this point calls for further attention. For the T-maze challenge, fish were introduced into a novel environment which is supposedly felt to be unsafe due to the shallow water and high walls defining a straight corridor. In addition to providing information on the exploratory ability of the fish, recordings of swimming characteristics during exploration gave indications of the way fish coped with this novel environment. Behaviour of PCB-medium fish in the shallow area of the T-maze deviated from that of all other fish, with an increase of velocity (doubled) associated with an increase in the proportion of time mobile. This shortened the time needed to reach the deep area, which was supposedly an area more favourable for the fish than the shallow corridors. Thus, behavioural responses measured in the shallow area also supported the idea that PCB-medium fish over-reacted under challenging conditions. This activity increase evokes the link now clearly established between PCB exposure and a human behavioural deficit known as attention deficit

/hyperactivity disorder (ADHD, [Eubig et al., 2010](#)). The link between PCB exposure and ADHD has been established after epidemiologic studies on children ([Sagiv et al., 2010](#)) and after many studies using mammal models ([Holene et al., 1998](#); [Rice, 2000](#); [Colciago et al., 2009](#); [Eubig et al., 2010](#); [Vitalone et al., 2010](#)). To our knowledge, there is a scarce number of report of hyperactivity induced by exposure of fish to PCB ([Nakayama et al., 2005a](#); [Schmidt et al., 2005](#)). They showed effects at the individual level with higher night swimming activity in carp (Aroclor 1254 in solution at $10 \mu\text{g L}^{-1}$) and effects at the group level in medaka with disruption of schooling behaviour for $25 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $100 \mu\text{g.g}^{-1}$ food spiked with Kanechlor-400, which represent 10- to 100-fold higher doses than those in the present study. The convergence between our results and the literature highlights the needs for further experimentation using low doses.

When comparing the main behavioural responses observed in fish from the PCB-medium and PCB-high treatments, although contamination of fish themselves measured in a parallel study is in agreement with PCB concentration in each diet ([Daouk et al., 2011](#)), there was no reinforcement of the measured effects with increased dose, suggesting the absence of a dose-response relationship. This absence of dose-response effect was also observed for fertilization rate of these fish, which was equally lowered by 25%, as well as for follicle maturation rates in PCB-medium and PCB-high exposed fish ([Daouk et al., 2011](#)). A non-monotonic type of relationship between dose and response after exposure to a xenobiotic is not new. Several mechanisms, which may work alone or in combination, have been proposed to explain this particularity; these include hormesis (improvement of a function/factor at low dose but a degradation at higher dose), a threshold above which a defensive strategy is triggered physiological adaptation at low dose but detrimental effects at higher doses and intra-population variation in dose response ([Calabrese et Baldwin, 2003](#); [Conolly et al., 2005](#); [Conolly et Lutz, 2004](#)). The fact that behavioural disruptions observed in this study reveal induction of hyperactivity in fish fed the PCB-medium diet and perhaps a rhythm disruption in fish fed with PCB-high diet suggests that the underlying mechanisms are different. Additional studies are currently being performed in order to understand the respective roles of mono-ortho substituted congeners and other congeners in greater detail. Research will also be made for molecular clues about possible mechanisms of action.

The PCB mixtures used here are representative of situations occurring in European coastal areas, both in terms of congener mixtures and concentrations used, and are thus ecologically relevant, as discussed in ([Daouk et al., 2011](#)). More specifically, the PCB-medium diet is representative of a mildly contaminated estuary such as Loire estuary, while PCB-high corresponds to PCB contamination found in highly contaminated areas such as the Seine estuary. From an ecological point of view, this indicates that alteration of some behavioural traits observed in this study may affect fish living in these areas.

Indeed, behavioural disruptions observed for the PCB-medium and PCB-high treatments could have adverse effects on fish at individual or population levels. For instance, hyperactive response in challenging conditions (increase of stay in a light zone and number of zone changes in the background colour preference challenge, and increase of speed and time mobile in the T-maze) could be associated with a higher probability of being captured by a predator (Scott et Sloman, 2004; Sloman et Wilson, 2005; Brooks *et al.*, 2009). This adverse effect could be amplified by the decrease in schooling behaviour, as observed in medaka after acute exposure to PCB mixtures (Nakayama *et al.*, 2005a), since this behaviour has a protective effect for individuals (Scott et Sloman, 2004). In addition and independently of any cost that could be caused by detoxication processes, hyperactive behaviour could also have a negative influence on energy budget and hence, end of the night hyperactivity could reflect intensive food searching behaviour as feeding behaviour has been earlier demonstrated to increase toward the end of the night (del Pozo *et al.*, 2011). These or other negative consequences could occur in relation to rhythm disruption or decrease in resting time, like that observed after fish were fed the PCB-high diet. It is well known that behavioural and physiological processes are mainly rhythmic and synchronized by specific pacemakers and del Pozo *et al.* (2011) gave results supporting the concept of multioscillatory control of circadian rhythmicity in zebrafish. Correct synchronization with light conditions ensures that individual fish are spatially and temporally synchronized with the availability of natural resources (Schmidt *et al.*, 2005). Therefore, a phase shift in activity due to xenobiotic stress, as reported here and also demonstrated in carp (Schmidt *et al.*, 2005), may be of great ecological relevance. Further, the rhythm disruption observed could also have consequences at the population level through the desynchronisation of reproductive behaviour, which could partly account for the decrease in fertilization rate observed for these fish (Daouk *et al.*, 2011).

Finally, behaviour disruption observed for fish in the PCB-medium treatment is reminiscent of ADHD phenotypes observed in humans. It is, therefore, possible that zebrafish exposed to environmental PCB mixtures through diet could also serve as a model in order to 1) better understand mechanisms underlying ADHD appearance in humans and 2) serve as tool to develop strategies to relieve disorders in humans (*e.g.*, for drug screening). In both cases, further analyses should be conducted in this context to evaluate mechanistic relationship suspected between PCB, ADHD and neurotransmitter concentration (*e.g.* dopamine and serotonin, Berg *et al.* 2011; Boix *et al.* 2011).

5.5 Conclusion

Our data indicate that long-term exposure of zebrafish to a diet spiked with a PCB mixture akin to that found in mildly contaminated areas, induced behavioural disruption

(hyperactivity) that resembled ADHD syndromes observed in humans following PCB exposure. At the higher dose of the two tested, the only disruption observed was an increase in nocturnal activity, but both levels of contamination may have ecological consequences due to energy budget imbalances or increased predation risks. It is also possible that changes in nocturnal activity are related to a general desynchronisation that, in turn, could impair reproductive behaviour and hence have a large impact at the population level.

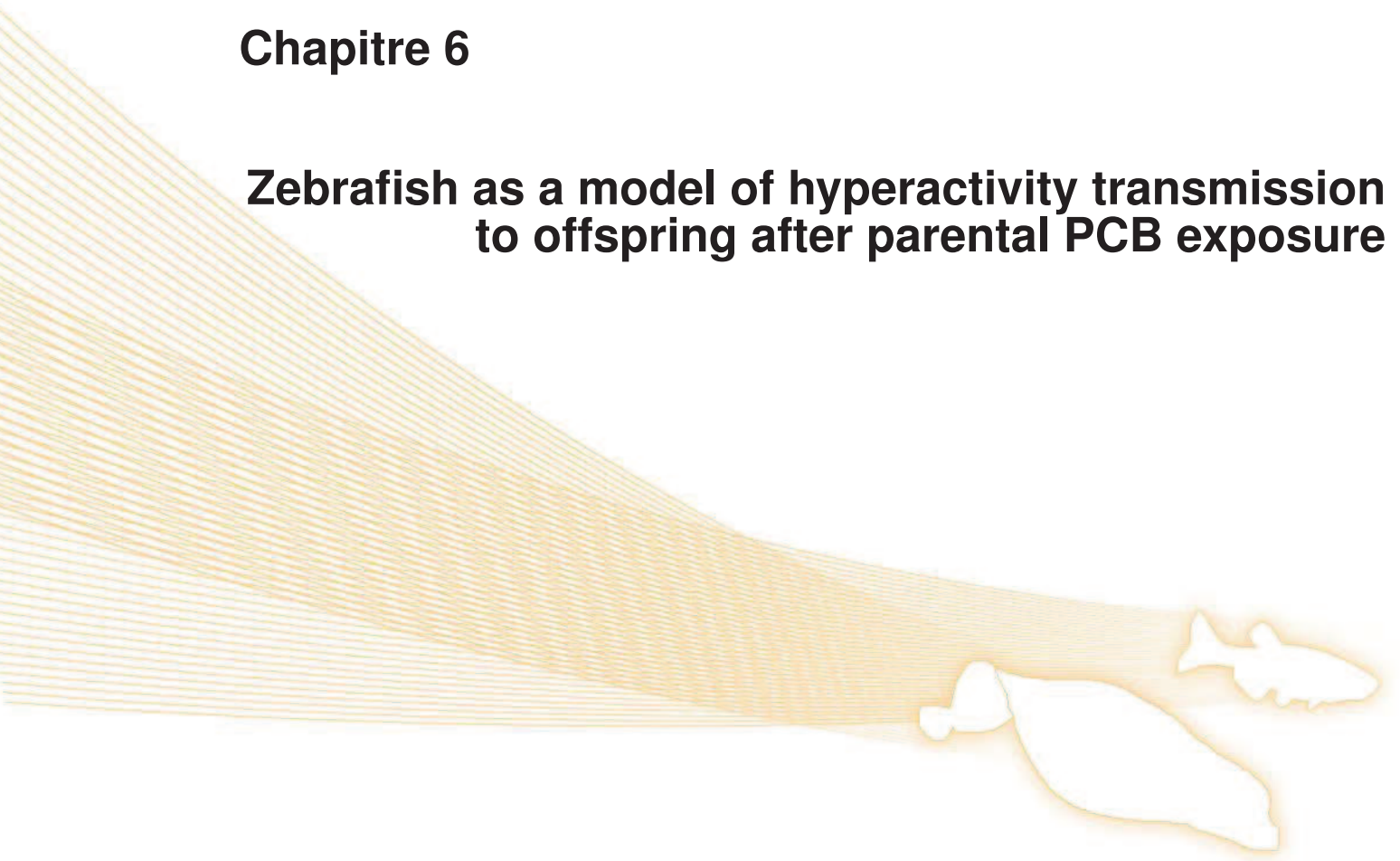
Since the hyperactivity observed in fish fed the PCB-medium diet shares some similarities with ADHD syndrome observed in humans after exposure to PCBs, it should be possible to use this model to better understand the underlying mechanisms. With respect to this point, we are currently performing some experiments in which exposure is performed through diet from the first meal onwards. It should also be possible to use this fish model to screen for drugs to alleviate PCB-induced ADHD in humans.

Acknowledgments

This study was supported by Ifremer and Région Poitou-Charentes (PhD fellowship for Samuel Péan), by the Conseil Général de Charente Maritime (PhD fellowship for Tarek Daouk) and EC2CO-Cytrix (grant GénérationPOP to Xavier Cousin).

Chapitre 6

Zebrafish as a model of hyperactivity transmission to offspring after parental PCB exposure



Samuel PÉAN
Caroline VIGNET
Laura LYPHOUT
Tarek DAOUK
Didier LEGUAY
Véronique LOIZEAU
Xavier COUSIN
Marie-Laure BÉGOUT

Manuscrit en préparation

Résumé

Comme expliqué dans la Partie Introduction Générale (voir section 3 *Les PCB*, p. 19) la forte liposolubilité des PCB rend ces molécules bioaccumulables. En conséquence, il y a un transfert maternel des PCB au moment de la constitution des réserves vitellines, riches en lipides. Dans cette étude, nous avons examiné le comportement de poissons zèbres issus de parents contaminés aux PCB pendant 350 jours par voie alimentaire (dont les protocoles de contamination et les résultats des tests comportementaux ont été présentés dans le Chapitre 5, p. 137). Un premier challenge comportemental a été réalisé au stade larvaire et d'autres ont été effectués plus tard, au stade adulte. Les groupes de poissons issus des géniteurs contaminés ont montré une activité de nage élevée au stade larvaire. Cette altération a été retrouvée chez ces poissons au stade adulte, associée à une utilisation moindre du fond des aquariums et un grand nombre d'aller-retours entre le fond des bacs et la surface. Ceci peut-être expliqué par une perte de comportement anti-prédateur (la zone de fond des bacs étant généralement considérée comme une zone refuge) et/ou une perte d'inhibition comportementale. Ces altérations comportementales correspondent au syndrome d'hyperactivité et de manque d'attention (ADHD), déjà observé chez des enfants ou des animaux exposés aux PCB *in utero* ou quelques temps après la naissance. Ces résultats permettent à la fois de montrer que l'utilisation du poisson zèbre dans des expériences longues (24 h) plutôt que de courts challenge permet de mieux comprendre certaines altérations comportementales.

Dans cette étude, nous avons utilisé le protocole de challenge lumineux dont la mise en place a été décrite en première partie (voir Chapitre 1, p. 65). Les PCB transmis aux embryons par voie maternelle ont bien des conséquences importantes sur le comportement des poissons. D'un point de vue méthodologique, l'étude de la locomotion par video tracking s'est encore montrée adaptée dans le cas d'altérations comportementales liées aux PCB, que ce soit dans le cas d'un challenge rapide au stade larvaire ou en effectuant des expériences de 24 h chez les adultes.

Zebrafish as a model of hyperactivity transmission to offspring after parental PCB exposure

Samuel Péan, Caroline Vignet, Laura Lyphout, Tarek Daouk, Didier Leguay, Véronique Loizeau, Xavier Cousin, Marie-Laure Bégout

Abstract: It is well known that the long biological half-life and high liposolubility of PCBs can lead to their bioaccumulation and biomagnification through food chains over a wide range of trophic levels, leading to a potential risk for high trophic level predators including humans. Further, their binding with lipids, underpins a demonstrated maternal transfer to eggs in fish. In this context and since field analyses and experimental exposures have established links between PCB exposure and alterations in animal physiology and behaviour directly contaminated; we, in the present study, have examined the effects in F1 zebrafish issued from adult exposed during a year through diets to PCBs mixtures at two doses mimicking known environmental contamination levels and congener composition. The highest dose was equivalent to that found in the Seine Estuary and the intermediate dose was equivalent to that found in the Loire estuary. Several behavioural traits were monitored both in 5 days old larvae and in adults reared under standard conditions. Behavioural phenotypes observed in descendants of fish exposed to PCBs diet, were an increased in activity in larvae which was maintained in adults. In adults, this was associated with a decrease in tank bottom section occupancy and with an increase in the number of zone transition which may be due to a loosening of homebase behaviour and/or a loss of behavioural inhibition. In all cases, these phenotypes observed in PCBs groups can be related to the behavioural syndrome observed in children or animal models submitted to *in utero* or perinatal exposure to PCBs, the attention deficit / hyperactivity disorder. These findings call for more experiments using zebrafish model and rather long (24-h) than short term experiments to better understand mechanisms underpinning behavioural disruptions for both human health endpoints and ecological relevance in terms of individual fitness and survival.

Keywords: swimming activity, generation, ADHD, organic pollutant effects, video analysis

6.1 Introduction

Polychlorinated biphenyls (PCBs) constitute a family of 209 congeners depending on the combinatorial arrangement of 10 possible chlorine substitutions on a biphenyl nucleus (McFarland et Clarke, 1989). Because of their properties (*e.g.* high dielectric constants, non-flammability, hydrophobic quality and chemical stability) PCBs in mixtures were abundantly used in a wide range of applications from the 1930s onwards (Beyer et Biziuk, 2009; Breivik *et al.*, 2002). After their toxicity became recognised, PCBs were

progressively banned in most developed countries during the 1980s (Letz, 1983). However, because of hydrophobic properties and chemical stability, PCBs are very persistent and have accumulated in the environment. More specifically, in aquatic environments PCBs are stored in sediments and entered the trophic chain through microbial and bottom-feeders uptake. Constant mobilisation of sediment due to human or natural activity further induces *de novo* contamination.

The long biological half-life and high liposolubility of PCBs can lead to their bioaccumulation and biomagnification through food chains over a wide range of trophic levels, leading to a potential risk for high trophic level predators (Fisk *et al.*, 1998, 2001; Borgå *et al.*, 2001; Nfon et Cousins, 2006). For human and fish populations, dietary intake, especially the consumption of aquatic organisms, is considered one of the most important sources of exposure to PCBs (Johansen *et al.*, 1996; Muir *et al.*, 2003; Nyman *et al.*, 2002; Pompa *et al.*, 2003). Consequently, many recommendations have been published by local or national agencies to limit human consumption of fish and shellfish in impacted coastal or freshwater water bodies.

Data from epidemiologic studies and from the field have suggested that exposure to PCBs may have adverse effects on the physiology of animals, including humans. Experimental exposures have been performed in recent decades in order to understand PCB toxicity and its underlying mechanisms. These analyses have demonstrated alteration of reproductive, hepatic, renal and endocrine functions in animal models and humans (Holene *et al.*, 1998; Crofton *et al.*, 2000; Safe, 2005; Zimmer *et al.*, 2009; Schell et Gallo, 2010).

The use of model fish species, such as medaka or zebrafish, for ecotoxicology studies has developed rapidly over the last decade (Spitsbergen et Kent, 2003; Hill *et al.*, 2005; Hinton *et al.*, 2005). These models demonstrated several alterations in physiology after PCB exposure, including changes to development and reproduction (Billsson *et al.*, 1998; Örn *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 2005b; Grimes *et al.*, 2008; Lyche *et al.*, 2010; Daouk *et al.*, 2011; Nakayama *et al.*, 2011).

Several studies have demonstrated that exposure to PCBs can modify certain behavioural traits in animals and humans (Rice, 2000; Berger *et al.*, 2001; Eubig *et al.*, 2010; Sagiv *et al.*, 2010). More recently, acute exposure to PCBs has been demonstrated to modify behaviour in fish (Lerner *et al.*, 2007; Nakayama *et al.*, 2004, 2005a; Schmidt *et al.*, 2005). Finally, we have demonstrated that chronic exposure to PCBs using mixtures occurring in European coastal areas was able to provoke behavioural disruption in adult zebrafish in a manner evoking a human behavioural deficit known as attention deficit / hyperactivity disorder (ADHD, Eubig *et al.*, 2010, Chapitre 5, p. 137). The link between PCB exposure and ADHD has been established after epidemiologic studies on children (Sagiv *et al.*,

2010) and after many studies using mammal models (Holene *et al.*, 1998; Colciago *et al.*, 2009; Rice, 2000; Eubig *et al.*, 2010; Vitalone *et al.*, 2010). In mammals, embryo development takes place within mother uterus and under constant feeding through placenta there is thus a potential chronic exposure of fetuses to PCBs through blood exchanges. Fish develop *ex utero* and in most cases are precocious animal, which means that there is no caretaking of the young. Thus, young behavior is not directly influenced by mother behavior. Further, we and others have demonstrated that, in fish, PCBs can be transmitted from the mother to eggs (Bodiguel *et al.*, 2009; Daouk *et al.*, 2011).

In the present work, we intended to evaluate behavioural disruption that may be observed in descendants of fish exposed to PCBs mixtures encountered in European coastal areas. To this end, we used a comparative approach and worked at both a very young and an adult stage of zebrafish issued from three groups of parents (two PCBs doses and one Solvent control). We monitored swimming activity levels in 5 days old larvae under a sudden dark challenge context following a slightly modified protocol from Ali *et al.* (2011) extensively used to make behavioural profiling in zebrafish larvae exposed to diverse compounds. In adults, we recorded horizontal movements in a 24-h experiment, and special attention was also devoted to vertical movement recorded over another 24-h experiment since following Levin *et al.* (2007) we know that the choice of position (bottom *vs.* upper levels) was considered as an index of anxiety, quite similar to the position choice of closed *vs.* open arms in the elevated plus maze and positions near the wall (thigmotaxis) *vs.* the center of an open field with rodents.

6.1.1 Rearing conditions and PCB exposure

The present behavioural experiments done on offspring (F1) of contaminated fish which were part of a larger trial, described in full by Daouk *et al.* (2011) and were a follow up of a study on first generation contaminated adults (F0, Chapitre 5, p. 137). Wild type zebrafish (*Danio rerio*) were bought at 6 weeks of age from a breeder specialised in supplying zebrafish (Élevage de la Grande Rivière, Calluire, France). Exposure began 2 weeks later. The fish were maintained and exposed to a PCB mixture at the Ifremer research station in L'Houmeau France, under standard conditions: water and room temperature were kept between 26-28°C and the photoperiod was 10 h dark: 14 h light. The water used in the rearing system and during tests was a mixture of water treated by reverse-osmosis and tap water, both of which had been filtered beforehand through dust and charcoal filters, to obtain a pH of 7.5 ± 0.5 and a conductivity of $300 \pm 50 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$. Ammonia, nitrites, and nitrates and remained within recommended ranges (Lawrence, 2007). The fish were raised in a flow-through system made of 20 identical 10-L tanks in a rack. A portion of the water was changed automatically every hour, leading to a replacement rate of $4 \text{ L}\cdot\text{day}^{-1}\cdot\text{tank}^{-1}$.

Contaminated water was collected and treated with activated charcoal before being discharged into 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 Gouessant (France), consisted of a formulated feed containing 58% crude protein and 13% crude fat. Spiked food was prepared by slowly adding a solution containing known amounts of thirteen congeners in iso-octane (AccuStandard Inc., New Haven, USA, purity above 98%) to food pellets. Diets were prepared in small batches to avoid deterioration. PCB mixtures were composed of the seven indicator PCB congeners (CB-28, CB-52, CB-101, CB-118, CB-138, CB-153, CB-180), and a number of others added to cover a larger range of chlorination from 3 to 8 chlorine atoms (CB-105, CB-132, CB-149, CB-156, CB-170, CB-194). Two diets were prepared: "PCB-medium" and "PCB-high", for which the cumulated congener concentrations were 515 ng.g⁻¹ and 2302 ng.g⁻¹, respectively (Daouk *et al.*, 2011). These concentrations correspond to ones recorded in medium and highly contaminated sites (Loire and Seine estuaries, respectively; data from French coastal chemical contamination survey network – ROCCH). The control food exposed only to solvent is hereafter referred to as "Solvent". More details about doses of each congener are available in Daouk *et al.* (2011).

After 350 days of contamination of F0 adults, offspring hereafter called F1 fish, were obtained by crossing male and female from the same cited treatments (Solvent, PCB-medium and PCB-high). Three larvae batches (N=30) issued from 3 spawns obtained from 3 different pairs were immediately used to monitor behavioural responses to a sudden dark change. Other larvae batches were reared under normal conditions in the facility using the same food as described above but plain, until adulthood when they underwent behavioural tests.

6.1.2 Behavioural experiments

Behavioural experiments were performed in 5 days old larvae and in adults in a dedicated room, kept at 27±1°C with a 14:10 light: dark photoperiod synchronized with the rearing room in order to minimize unwanted correlated effects. Daylight was started at 8:30 and there were no twilight periods. Due to their small size, adult sex could not be determined but in a former experiment no sex effect was noticed for F0 fish (Chapitre 5, p.137).

Sudden dark challenge in larvae Zebrafish larvae were challenged individually at 5 days post fertilisation (dpf) in a sudden dark (5 min light off) challenge and video recording were made over 3 periods of 5 min each (before (Light on-1), during (Light

off) and after light off (Light on-2)). At 17h00 the day before the challenge, single larvae were installed in a 24 well-plate (Krystal 24, opaque (white) clear bottom micro-plate), visually isolated from each other and in a mixed design (larvae from all treatment were studied at the same time to avoid any trial effect), they were kept overnight in the incubator. The following day, two hour before the challenge, done between 14h-18h (to target the most stable activity period in zebrafish larvae as shown by MacPhail *et al.*, 2009), the well-plate was transferred to the video acquisition room and placed on top of sized-match infrared floor which allowed filming of the larvae under both light and dark conditions. A three way switch permitted to film either under light or dark but constantly with IR lighting. The all apparatus was within a lightproof and temperature controlled box. The dependant measure was the distance travelled recorded for 90 larvae per treatment (Solvent, PCB-medium and PCB-high).

24-h swimming activity For each session, fish from each treatment were placed randomly (to avoid tank position and session bias) in 3-L tanks (24.5x15x13.5 cm, AquaBox®3, AQUA SCHWARZ GmbH, Göttingen, Germany) filled with 1.5 L of system water. The 12 tanks (3 treatments with 4 fish each) were isolated from neighbouring tanks by opaque walls. Fish were placed in their tanks at 18:00 the day before the experiment, for one night of acclimatization. Recording started the next day at 12:30 and lasted 24 h. The water was changed after each session.

Two filming sessions were conducted: for one the camera was placed above the tanks which were on top of an infrared apparatus (IR floor 1x1 m, Noldus, The Netherlands) to monitor horizontal movements (top view); and for the other the camera was placed in front of the tanks (side view, tanks being placed on a 4 levels shelf in front of the IR floor) to record vertical movement. During the day, the room was lit with 2 halogen spotlights (Philips 80 W). During the night, the spotlights were turned off and infrared light from the floor was used to allow recordings of fish movements. A total of 14 fish per treatment were filmed in top view and 9 fish per treatment in side view; the dependent measures were respectively swimming path length and time spent in each third of the tank section horizontally and number of passages between sections.

6.1.3 Data recording and analysis

Videos for the sudden dark change challenge in larvae were recorded using a camera (Imaging Sources DMK31AU03 and lens Fujinon 1.4-12.5 mm) positioned 45 cm above the well-plate. Videos for the 24-h swimming activity experiments were recorded with an analog camera (Ikegami ICD-48E and Fujinon lens 2.7-13.5 mm) linked to a PC with an acquisition card.

For both experiments, track extraction and analysis were then performed with Ethovision 7.1 software (Noldus, The Netherlands). Data were acquired by Ethovision at 25 frames per second and extracted data nested for saving every 30-s for larvae or 30-min for adults.

6.1.4 Measured variables and statistical analysis

The variables chosen to evaluate behavioural performances were as follows:

- distance moved (in cm): the distance travelled by the centre point of the subject between two consecutive X-Y coordinates acquired, were summed over a 5 or 30-min period for the larvae sudden dark challenge or the 24-h experiment respectively ;
- time spent per 30-min period (in s) by a fish in the upper, mid or bottom section in the 24-h swimming experiment filmed in side view ;
- number of passages per 30-min period between the upper and mid section and between mid and bottom section.

Data were statistically tested using Statistica 9.0 (Statsoft, USA). For each variable, a Shapiro-Wilk test was performed to check the normality, and a Bartlett's test to check the homoscedasticity. The distance travelled by larvae was compared using repeated measures ANOVA with treatment as the within-subjects factor (Solvent, PCB-medium, PCB-high) and period (Light on-1, Light off and Light on-2) as between-subjects factors followed by Newman-Keuls multiple comparisons test.

As normality and homoscedasticity rules were not respected for the 24-h experiment, Mann-Whitney-U or Kruskal-Wallis tests (Zar, 1999), followed by multiple comparison rank tests, were performed to compare results between the three treatments (Solvent, PCB-medium, PCB-high). For the 24-h swimming activity experiment, transition periods induced an exacerbated pattern; it was thus necessary to analyse these 30-min "Light off" and "Light on" periods immediately following the light change separately. Remaining day and night periods were divided into blocks of 6 or 7 30-min period (for day 1: D1-1 to D1-3, for night: N1-1 to N1-3 and, finally, D2-1). Within each period (of which there were 10 in total), Kruskal-Wallis tests were used to compare the distances moved, the number of passages between section and the time spent in the bottom section (each summed per 30 min), between the different treatments. Distance moved during the horizontal movement analysis was also compared between day-time *vs.* night-time period excluding the transition half-hour period using Mann-Whitney and multiple comparisons tests. All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance.

6.2 Results

The experiments assessed some behavioural responses of zebrafish exposed to two levels of a PCB mixture (PCB-medium and PCB-high) via a spiked diet at two levels, compared with a control treatment containing solvent (Solvent) alone. A former study did not show major differences between Solvent and a plain diet, therefore, only Solvent was used as a control treatment. No mortality occurred during the course of the behavioural experiments. Fish weight and length were not significantly different between treatment groups (for the 24-h experiment filmed in top view: weight: 320.6 ± 55.7 mg, $KW_{(2, 54)}=2.065$, $p=0.356$; length: 2.62 ± 0.02 cm, $KW_{(2, 54)}=2.537$, $p=0.281$; and for the side view experiment: weight: 335.7 ± 52.7 mg, $KW_{(2, 27)}=1.019$, $p=0.600$; length: 2.64 ± 0.09 cm, $KW_{(2, 27)}=4.560$, $p=0.458$).

6.2.1 Sudden dark challenge in larvae

Fish from all treatments showed a similar response pattern to the sudden dark challenge context: swimming activity increased by 1.4 to 1.9 fold between the first 5-min period and the dark period (Fig. 60).

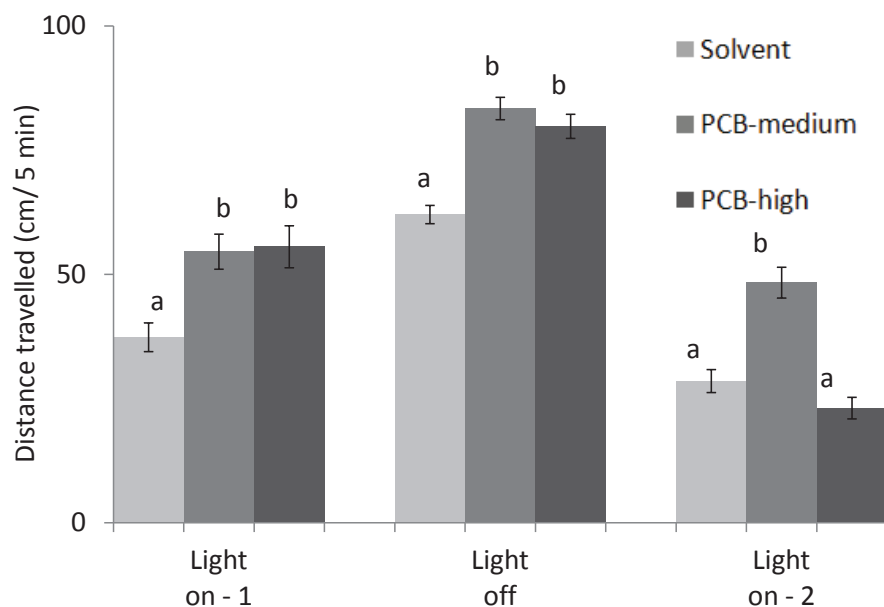


Figure 60: Swimming activity is increased in larvae from contaminated generators. Distance travelled by 5 days old larvae in 5 minute-bouts with light on or off as indicated in the greyscale rule below the bars (mean \pm S.E.M; different letters indicate significant differences between treatments (Solvent, PCB-medium and PCB-high; n=90 per treatment).

Thereafter, when light came on again, distance travelled decreased and overall reached values below the ones observed during the first Light on-1. There was a significant treatment effect (ANOVAR (F (6, 502)=18.67, $p<0.001$) with Newman-Keuls *post hoc* test): during Light on-1, Solvent fish swam less than contaminated fish and during Light off, the same significant treatment effect was observed with a similar pattern. Finally, during Light on-2, PCB-medium fish showed the highest distance travelled and PCB-high reached similar levels as Solvent F1 fish.

6.2.2 24-h swimming activity – horizontal movements

Constant monitoring of swimming activity over 24-h allowed several periods to be identified that were characterised by specific behavioural patterns according to day/night and light changes. In our system, light change was abrupt and provoked an intense increase in swimming activity (distance travelled; Fig. 61A) both at lights off (22:30) and lights on (8:30). Apart from these periods, distance travelled showed a slight decrease from D1-1 to D1-3 and relatively low variation at night (Fig. 61A).

Treatment effects were significant during each day-time period and one night period (N1-2). During the first day, the same pattern was observed for D1-1, D1-2 and D1-3 with a significant increase in distance travelled for PCB-high fish compared with the Solvent treatment (for D1-1 $KW_{(2, 294)}=7.546$, $p=0.023$; for D1-2 $KW_{(2, 294)}=9.400$, $p=0.009$ and for D1-3 $KW_{(2, 252)}=8.329$, $p=0.015$; Fig. 61A). No difference was observed between treatments during light regime changes. At mid-night, PCB-medium fish showed the highest distance travelled (for N1-2 $KW_{(2, 252)}=10.194$, $p=0.006$). In the following morning, PCB-high fish swam at the highest level (for D2-1 $KW_{(2, 294)}=37.704$, $p=0.001$). When comparing only the photophase and the dark phase within treatment Fig. 61B, the diurnal nature of the swimming activity was confirmed for each treatment hereby showing no overall rhythmic activity disruption.

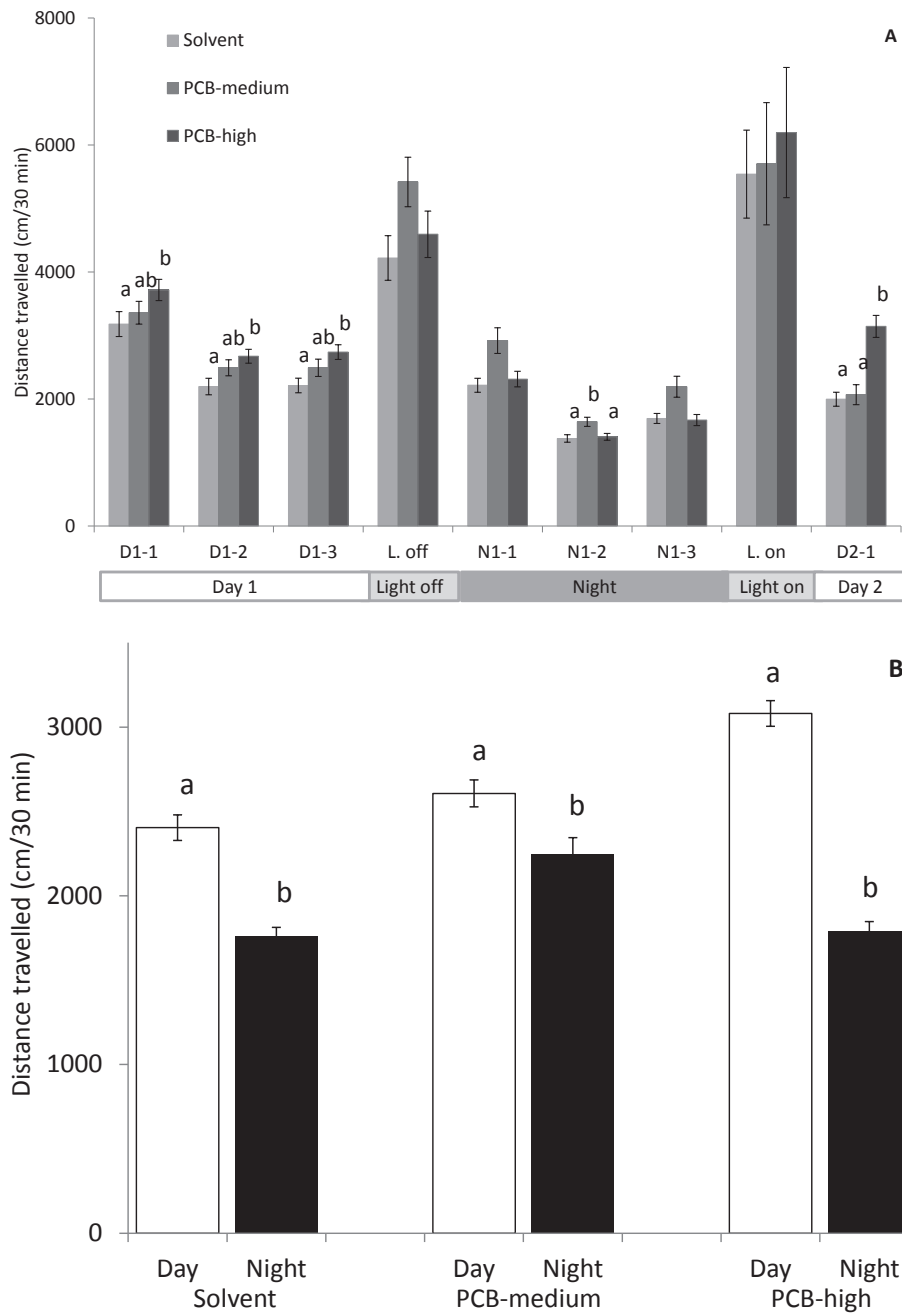


Figure 61: Distance travelled according to period of the day during the 24-h swimming activity test. **A.** Distance travelled (mean±S.E.M) by adult zebrafish for each period of the day and **B.** Distance travelled (mean±S.E.M) during the photophase and the dark phase for each treatment (Solvent, PCB-medium and PCB-high, n=14 per treatment, different letters indicate significant differences between treatments and within period (A) or within treatment and between day vs. night (B)). The greyscale rule below the graph indicates the light status and period of the day, L. off: Light off; L. on: Light on.

6.2.3 24-h swimming activity – vertical movements

Vertical positioning of the fish filmed over 24-h showed an overall marked daily change with fish shifting from occupying mostly the bottom and mid sections during the photophase to a upper section preference during the night (Fig. 62).

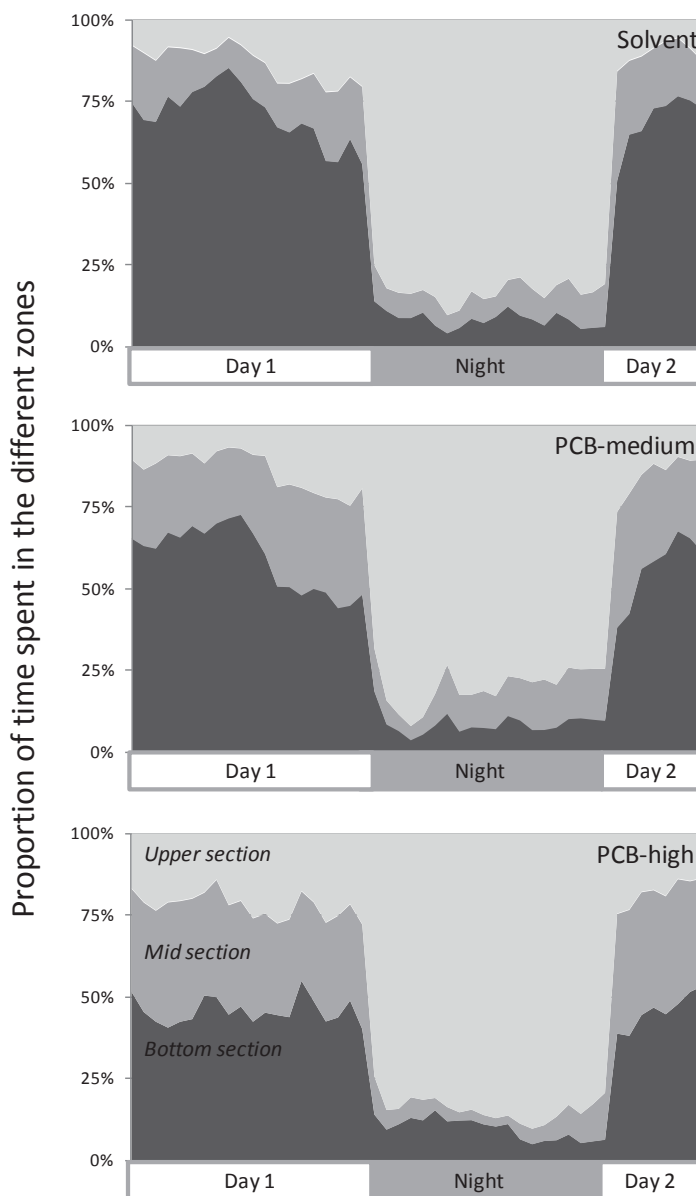


Figure 62: Vertical space occupancy during the 24-h swimming activity test. Relative proportion of time (%) spent in the bottom, mid and upper section of a 3-L tank for adult zebrafish from the three treatments (Solvent, PCB-medium and PCB-high, n=9 per treatment). The greyscale rule below the graph indicates photoperiod; L. off: Light off; L. on: Light on.

Such marked positioning alternation was observed using the proxy of the number of passages between sections: the highest number of zone transition was observed at the end of the night and during light on (Fig. 63).

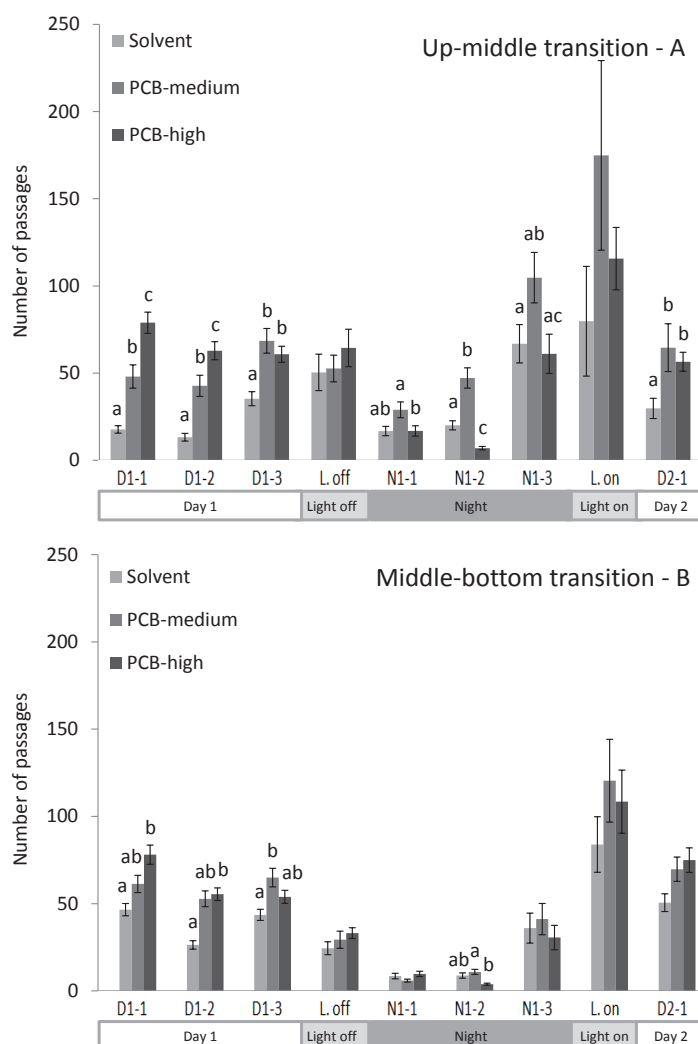


Figure 63: Number of passages between sections during the 24-h swimming activity test. **A.** Number of passages between upper and mid section of the tank and **B.** Passages between mid and bottom section of the tank for each period and each treatment (Solvent, PCB-medium and PCB-high, $n=9$ per treatment; mean \pm S.E.M; different letters indicate significant differences between treatments and within period). The greyscale rule below the graph indicates photoperiod; L. off: Light off; L. on: Light on.

The number of passages between the upper and mid section showed significant treatment effects within each period except the light off and light on periods (Tab. 11a). During day 1, contaminated fish showed a significantly higher transition activity and PCB-high fish showed the highest number of passages during D1-1 and D1-2 (Fig. 63A). A similar

pattern and level of activity was also observed the next morning during D2-1 showing a similar profile to D1-3. During the night, PCB-high fish showed a lower number of passages than PCB-medium but not always different with that observed for Solvent fish. The number of passages between the mid and bottom section showed a significant treatment effect during day 1 and in the middle of the night (N1-2, Fig. 63B, Tab. 11). The number of passage between up and middle zone during the night is constantly higher than between middle and bottom zone and increase along the night. Finally albeit not always significant, number of up/middle transition of PCB-medium fish is higher than for Solvent and PCB-high fish which is consistent with the increase of residence duration in the middle zone apparent in Fig. 62. Contaminated fish showed the highest number of passages during D1-1 and D1-2 with however no difference between PCB-medium and PCB-high treatment. During D1-3, only PCB-medium fish were significantly more active than the other treatment. During N1-2, PCB-high fish displayed a significantly lower level than PCB-medium which however did not differ from Solvent.

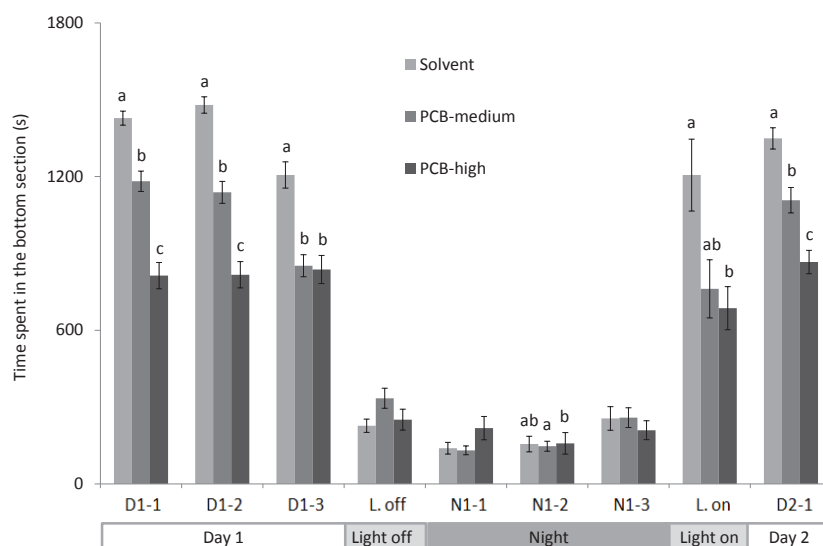


Figure 64: Time spent in the bottom section during the 24-h swimming activity test for each period and each treatment (Solvent, PCB-medium and PCB-high, n=9 per treatment (mean±S.E.M; different letters indicates significant differences between treatments and within period. The greyscale rule below the graph indicates the light status and period of the day L. off: Light off; L. on: Light on.

When focusing on the time spent in the bottom zone only (Fig. 64), we observed significant treatment effects for almost all period except light off and N1-1 and N1-3 (Tab. 11b). During the day, contaminated fish showed a significantly lower occupancy of the bottom section than Solvent fish and PCB-high were at the lowest level for D1-1, D1-2 and D2-1 and at a similar level to PCB-medium fish during D1-3. At light on only PCB-high

Table 11: Results of the comparison between treatments (Solvent, PCB-medium and PCB-high) using Kruskal-Wallis test within period and between treatments for the 24-h swimming activity - vertical movements.

Variable	Period	K-W statistics (ddl, N)	p value
Number of passages between upper and mid sections	D1-1	$H_{(2, 189)}=55.69$	<0.001
	D1-2	$H_{(2, 189)}=64.11$	<0.001
	D1-3	$H_{(2, 162)}=19.97$	<0.001
	L. off	$H_{(2, 27)}=1.04$	0.593
	N1-1	$H_{(2, 189)}=7.59$	0.022
	N1-2	$H_{(2, 189)}=41.56$	<0.001
	N1-3	$H_{(2, 162)}=7.65$	0.022
	L. on	$H_{(2, 27)}=4.13$	0.126
	D2-1	$H_{(2, 162)}=22.69$	<0.001
Number of passages between mid and bottom sections	D1-1	$H_{(2, 189)}=17.18$	<0.001
	D1-2	$H_{(2, 189)}=45.17$	<0.001
	D1-3	$H_{(2, 162)}=9.41$	0.009
	L. off	$H_{(2, 27)}=2.94$	0.229
	N1-1	$H_{(2, 189)}=2.11$	0.347
	N1-2	$H_{(2, 189)}=16.65$	<0.001
	N1-3	$H_{(2, 162)}=5.43$	0.066
	L. on	$H_{(2, 27)}=1.42$	0.491
	D2-1	$H_{(2, 162)}=5.30$	0.070
Time spent in the bottom section	D1-1	$H_{(2, 189)}=64.54$	<0.001
	D1-2	$H_{(2, 189)}=71.58$	<0.001
	D1-3	$H_{(2, 162)}=27.87$	<0.001
	L. off	$H_{(2, 27)}=4.22$	0.121
	N1-1	$H_{(2, 189)}=0.16$	0.919
	N1-2	$H_{(2, 189)}=8.08$	0.017
	N1-3	$H_{(2, 162)}=1.05$	0.598
	L. on	$H_{(2, 27)}=7.37$	0.025
	D2-1	$H_{(2, 162)}=40.92$	<0.001

significantly differed from Solvent fish with again the lowest occupancy of the bottom section. During the night, differences were only observed around midnight (N1-2) and only PCB-medium and PCB-high differed from each other.

6.3 Discussion

Our results demonstrate that chronic exposure of fish to diets spiked with mixtures of PCBs can alter behavioural traits in unexposed descendants both at a very early age (5 dpf larvae) and later on when fish were adults. Behavioural alterations were observed in all tests (sudden dark challenge and 24-h swimming activity) on fish issued from parents that had been fed for one year on diets containing PCBs: PCB-medium, containing a total PCB concentration of 515 ng.g⁻¹ and PCB-high, containing 2302 ng.g⁻¹.

Depending on the stage considered and/or the level of PCBs in parents' diet, differential alterations were observed. In addition, the results correspond to different kind of situations and can be interpreted first, as responses to a challenging situation in larvae and, second for adults in the light of locomotor and vertical positioning rhythmic activity disruption.

As already pointed out by several authors, most organs of 5-day old larvae are developed (Kimmel *et al.*, 1995; Rubinstein, 2003) and the larva already shows a complex behavioral repertoire (Champagne *et al.*, 2010; Rihel *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2011). In addition, challenges performed at this age conform to ethical requirements (compliance to 3R rule since test at this age and in this species are considered as *in vitro*; Strähle *et al.*, *in press*). The challenge used to assess behaviour of larvae is considered as very robust and it can be used to reveal more readily than any other tasks, defective brain function, aberrant nervous system development and/or locomotor and visual defects caused by toxic compounds (Ali *et al.*, *in press*).

Alterations observed may be the consequence of several non-exclusive events: *e.g.* developmental defects provoked by 1) exposure of embryo and larvae to PCBs after maternal transfer to the egg or 2) alteration of oocyte quality in response to maternal reaction after its exposure to PCBs or finally epigenetic imprinting of gametes modifying development and/or physiology. These different hypotheses are compatible with the fact that alterations are observed at both larval and adult stages. Among acquired data, we only have indication supporting hypothesis 1 since we have shown that dietary PCBs are indeed transferred to zebrafish eggs at 16.0 and 47.6 ng.g⁻¹ fresh weight for PCB-medium and PCB-high diets respectively (Daouk *et al.*, 2011).

Synthesis of behavioural alterations and response to dose

Thus, after acclimation to the environment for two hour without disturbances, locomotor activity levels were stabilized and the first period of recording (5 min in duration, Light on-1) reflected the basal activity. Here one can notice a hyperactivity of contaminated larvae reaching a slightly higher level in PCB-medium than PCB-high treatment, following a biphasic concentration-response already described in F0 adults exposed to PCBs (Chapitre 5, p. 137). Thereafter, differences remained over the sudden dark challenge context phase (of equal duration). Finally, during the Light on-2 phase, the profile is similar to a biphasic concentration-response profile with a stimulation of activity at intermediate contamination level followed by suppression for PCB-high F1 fish.

Using the experimental protocol of a 24-h swimming activity recording preceded by an overnight acclimation period, we clearly targeted the measure of spontaneous locomotion activity in the horizontal and vertical planes.

What we observed for the distance travelled as measured in the top-view recordings is an overall significant diurnal swimming activity similar to the pattern described with another method by [del Pozo *et al.* \(2011\)](#) with difference between day and night activity levels being exacerbated for PCB-high fish. In further details, high responses to light transition period were observed whatever the treatment considered and during light phases in particular, treatment effects were significant. A monotonic concentration response within each day period was significant, however less marked than the one observed in larvae since here PCB-medium F1 fish did not significantly differ from Solvent treatment F1 fish. Such absence of classical dose response as already been shown for several molecules. It has been, for example, demonstrated in a large scale analysis of zebrafish behavioral response to chemicals ([Ali *et al.*, in press](#)). This has also been reported in the particular case of PCBs ([Aluru *et al.*, 2004](#); [Boix *et al.*, 2011](#); [Ulbrich et Stahlmann, 2004](#)) and underlines the need for more systematic dose-response behavioral screening using PCBs.

Concerning vertical positioning of fish, we observed a marked pattern with Solvent F1 fish staying in close association with the bottom during most of the photophase and showing a clear overnight surface positioning. For contaminated F1 fish we noted both a significant lesser use of the bottom section during the day (monotonic suppression over doses) and a greater number of passages between sections reflecting a greater agitation of the fish especially for PCB-high F1 fish in the afternoon (12-19h).

In the wild, zebrafish occupy the whole water column apparently without vertical distribution bias (Spence *et al.*, 2006, 2008; Engeszer *et al.*, 2007a). In tanks, it appears from published data, that during sleeping periods zebrafish preferentially occupy tank top layer but the authors did not performed detailed analysis of vertical distribution (Yokogawa *et al.*, 2007). Thus, to our knowledge, by recording this vertical positioning over 24-h, we documented for the first time this daily spontaneous shift in vertical positioning.

Several authors have used a protocol called novel diving tank test whereby they explore stress and anxiety in juvenile or adult zebrafish filming in a similar manner as us (side view) but for 5 or 6 consecutive minutes usually during day-time (Levin *et al.*, 2007; Egan *et al.*, 2009; Sackerman *et al.*, 2010). They were able to demonstrate a clear significant link between an increased use of lower section and an anxious or stressed state (eventually induced by different known anxiogenic drugs *e.g.* caffeine or relieved by anxiolytic ones, *e.g.* fluoxetine or nicotine) and confirmed by cortisol assays (Levin *et al.*, 2007; Egan *et al.*, 2009). In our set-up, and in view of our results, we could hypothesise that PCBs contaminated F1 fish showed a suppression of stress and anxiety. This could be the consequence of an increase in boldness and/or a disinhibition of cautious behaviour. One interpretation of ecological relevance is that bottom seeking behaviour or the classical homebase formation in the bottom of the tank is an anti-predator strategy (Levin *et al.*, 2007; Stewart *et al.*, 2010; Rosemberg *et al.*, 2011) and in the case of F1 contaminated fish it is significantly disturb and as such, descendant of contaminated fish could be more prone to predation.

Night-time behavioural pattern has been describe by several authors working on sleep or rest/wake profile in zebrafish for which sleep state is characterized by reversible periods of immobility, increased arousal threshold and place preference (Zhdanova, 2006; Yokogawa *et al.*, 2007). The same authors also pointed out that zebrafish is a model of choice for understanding the impact of sleep and sleep deprivation on cognitive functions and performance in higher vertebrates as the species also respond to hypnotic drugs. Hence, what we observed for F1 fish issued from contaminated parents during the night-time includes an increase in swimming levels for PCB-medium and only minor changes in their vertical positioning, suggesting that contrary to F0 fish (Chapitre 5, p. 137), sleep features were not markedly affected in F1 contaminated fish. Further studies should be conducted to explore the cognitive functions and performances in these fish.

6.4 Conclusions

Finally, if we summarise behavioural phenotypes observed in descendants of fish exposed to PCBs diet, we observed an increase in activity in larvae which is maintained

in adults. In adults, this is associated with a decrease in tank bottom section occupancy and with an increase in the number of zone transition which may be due to a loosening of homebase behaviour and/or a loss of behavioural inhibition. In all cases, these phenotypes observed in PCBs groups can be related to the behavioural syndrome observed in children or animal models submitted to in utero or perinatal exposure to PCBs, the attention deficit / hyperactivity disorder (ADHD, Holene *et al.*, 1998; Rice, 2000; Colciago *et al.*, 2009; Eubig *et al.*, 2010; Sagiv *et al.*, 2010; Vitalone *et al.*, 2010). The puzzling finding of our study being that with our model, the ADHD seems to persist into adulthood.

Acknowledgments

This study was supported by Ifremer and Région Poitou-Charentes (PhD fellowship for Samuel Péan and Caroline Vignet), by the Conseil Général de Charente Maritime (PhD fellowship for Tarek Daouk) and EC2CO-Cytrix (grant GénérationPOP to Xavier Cousin).

The background features a series of thin, light-colored wavy lines that create a sense of movement and depth. These lines are arranged in a pattern that resembles a stylized wave or a series of overlapping curves, filling the lower half of the page.

Discussion générale

Les objectifs de cette thèse étaient double :

1) D'un côté, de mettre en place des outils pertinents pour l'étude du comportement du poisson zèbre et de la sole.

Pour cette partie, le choix s'est essentiellement porté sur l'analyse de la locomotion chez le poisson zèbre, connu pour être une espèce mobile, et pour la sole, plus placide, l'étude de la locomotion a été complémentaire à d'autres critères plus appropriés à cette espèce, comme les capacités cryptiques (chromie et enfouissement). L'utilisation du logiciel de *video tracking* Ethovision XT (Noldus, Pays-Bas) sur de longues durées s'est avérée fiable et facile à réaliser. Des tests courts en situation de challenge ont été complétés par d'autres plus longs, sur 23 ou 24 h, afin de mesurer pour les premiers des différences dans les capacités de récupération et/ou d'adaptation à un nouvel environnement et pour les seconds des différences dans l'activité locomotrice en général.

2) D'un autre côté, d'évaluer, avec ces outils, l'existence d'effets d'une contamination alimentaire aux PCB sur le comportement de la sole et du poisson zèbre, ainsi que d'éventuels effets transgénérationnels chez cette dernière espèce.

Pour atteindre ce second objectif, différents groupes de poissons ont été constitués en fonction de leur régime alimentaire (aliments non contaminés ou contaminés) et leur comportement a été étudié après 30 et 60 jours de contamination pour les soles (locomotion, enfouissement puis capacité chromatique pendant 26 jours de décontamination), et 250 jours pour les poissons zèbres (locomotion pendant 24 h, challenge en *T-maze* ou en bac noir et blanc). Une première génération fille de poissons zèbres issue des géniteurs contaminés a été obtenue et testée à 5 jours (challenge lumineux) puis au stade adulte (activité de nage horizontale puis verticale pendant 24 h).

Les apports majeurs de ces travaux ayant permis d'atteindre ces deux objectifs sont synthétisés et discutés ici.

Pertinence des outils choisis

Du point de vue logiciel, la facilité d'acquisition des données par les méthodes automatiques de *video tracking* (lorsque les contraintes techniques indispensables sont parfaitement respectées) ont permis un gain de temps pour le calcul des variables individuelles, mais leur traitement final a cependant requis dans notre cas la manipulation de volumes de données importants, contrairement à une acquisition semi-automatique ou manuelle (par exemple avec ODRec) pour laquelle le temps d'acquisition des données sera plus long que leur traitement final. Cependant, la qualité et la quantité des données obtenues par l'analyse automatique, par rapport à une acquisition plus manuelle, permettent de conclure que

du point de vue méthodologique, les analyses automatiques sont à favoriser. Lorsque les analyses automatiques n'ont pas été possibles, comme dans le cas des changements de zones fond noir-fond blanc de la première génération de poissons zèbres contaminés, où les individus n'étaient pas détectables sur la zone sombre, ou pour l'analyse des vidéos d'enfouissement des soles, l'utilisation du logiciel ODRec a permis de faciliter considérablement l'acquisition des séquences comportementales (mobilité ou enfouissement pour les soles) ou des événements (changement de zone pour les poissons zèbres, "est enfoui" pour les soles).

Du point de vue matériel, l'utilisation de rétro-éclairage par rayonnement infra-rouge a permis d'enregistrer le comportement des poissons durant la nuit, en leur assurant une obscurité parfaite. Grâce à cette technique, des expériences de *video tracking* sur 23 ou 24 h ont pu être envisagées. Utilisé de jour, avec un filtre placé devant la caméra pour bloquer les rayonnements visibles, le rétro-éclairage infra-rouge permet de s'affranchir de tout reflet à la surface de l'eau ou de toute ombre dans le fond des bacs, facilitant ainsi considérablement les réglages pour l'analyse vidéo. De plus, cette technique a permis de mettre en place des challenges lumineux chez des larves de poisson zèbre, en développant un test comportemental très court (15 min pour suivre 20 individus en même temps) réalisable très tôt dans la vie de l'animal (5 jours).

Sur ces deux premiers points, une partie des outils mis en place durant cette thèse ont d'ores et déjà été adaptés et transposés pour l'étude des effets potentiels d'autres polluants (thèse de Caroline Vignet), ou d'autres problématiques relatives à l'aquaculture (thèses de David Benhaïm et de Sébastien Ferrari) ou à l'analyse des effets du marquage des poissons (travaux de Ewan Hunter).

Du point de vue méthodologique, une fois résolues les difficultés techniques pour réaliser des enregistrements de l'activité sur plus de 23 h, l'utilisation de challenges courts en complément permet d'aborder différents aspects comportementaux :

- les challenges (enfouissement des soles, choix de couleur de fond, *T-maze*, challenge lumineux chez le poisson zèbre) vont révéler des problèmes relatifs à l'adaptation à une situation nouvelle, bien souvent en situation de stress due au transfert dans le bac d'expérimentation ;
- les expériences longues réalisées après acclimatation (comme les suivis de nage sur 24 h chez le poisson zèbre) vont quant à elles révéler des problèmes d'activité plus globaux, qui ne peuvent pas être directement reliés à l'adaptation à l'environnement, mais davantage à des facteurs intrinsèques (état physiologique, chronobiologique,

etc.) ;

- les expériences longues réalisées sans acclimatation (comme l'étude de la nage pendant 23 h chez la sole) vont permettre de mesurer dans un premier temps l'adaptation au nouvel environnement suite au stress de transfert, mais aussi de mesurer la récupération ;

Ces trois approches méthodologiques sont complémentaires et n'apportent pas la même information, mais permettent ensemble de comprendre de manière plus fine les altérations comportementales liées à une mauvaise gestion du stress de celles plus profondes, liées à une perturbation globale de l'activité de l'individu.

Les limites

Certaines limites ont été rencontrées durant cette thèse, notamment au niveau du traitement des vidéo. En effet, le *video tracking* n'est pas une solution à toutes les situations. Si cette méthode est parfaitement fonctionnelle dans le cas de l'étude de la nage individuelle, des améliorations sont à apporter pour le suivi d'individus en groupe sans marquage, qui est pour le moment trop imprécis pour être totalement exploité. L'analyse du comportement en groupe sera vraisemblablement une des étapes importantes à franchir dans l'analyse d'image. En effet, dans le cas de l'analyse en groupe, avant même d'en arriver au *video tracking*, qui nécessite de connaître l'identité de chaque individu sur chaque image afin de reconstituer sa trajectoire depuis le début, un simple outil capable de donner la position des individus sur l'image pour calculer les distances interindividuelles pourrait être une première étape à franchir. Pour le moment, certains logiciels le proposent en partie (notamment des logiciels gratuits comme ImageJ, qui possèdent cette option nativement), mais ils ne permettent pas de pondérer les points quand les individus sont confondus en un seul amas de pixels. Une première approche pourrait donc être d'effectuer une première analyse automatique des "tâches" visibles à l'écran (c'est-à-dire les individus) à laquelle s'ajouterait une correction manuelle pour toutes les images pour lesquelles certains individus n'ont pas été détectés (car confondus avec d'autres) afin d'obtenir les coordonnées de chacun des individus et de calculer le centre de masse exact du groupe. L'approche alternative proposée par *Heatmap From Stack* permet d'obtenir une autre information, à savoir la répartition moyenne des individus dans l'arène d'étude, mais bien que cette information soit un bon complément à l'analyse des distances interindividuelles, utilisée seule elle devient trop faible car peu explicative.

Ces limites ont eu pour conséquences l'impossibilité technique de traiter les vidéos réalisées à partir de groupes d'individus non marqués pendant cette thèse. Cependant, des solutions sont encore envisageables et d'une manière générale, la solution, une fois trouvée, demandera certainement un temps d'analyse assez long. Mais au vu de la rapidité

de l'analyse individuelle, l'analyse en groupe, même plus fastidieuse, sera à envisager, car au même titre que le challenge apporte une information différente de l'expérience longue réalisée après acclimatation, l'analyse du comportement en groupe sera un complément intéressant à celle du comportement individuel.

Caractérisations des effets des PCB

Il est difficile de comparer les résultats d'une étude à une autre, étant donné qu'en plus des variations de conditions d'élevage (qui peuvent en elles-mêmes apporter une variation), vont se rajouter les variations liées au nombre de congénères de PCB choisis, leurs proportions relatives et totales, leur mode et leur temps d'exposition qui sont autant de facteurs qui vont avoir une influence sur les effets mesurés.

D'autres paramètres, beaucoup plus biologiques, peuvent aussi influencer sur les résultats, comme le stade de développement auquel va s'appliquer la contamination, l'état métabolique des individus contaminés, leur sexe ou encore leur espèce.

Le but de cette discussion n'est donc pas de strictement comparer les résultats obtenus pendant cette thèse aux autres travaux mais plutôt de les resituer dans un contexte écologique.

D'une manière générale, les protocoles ont été adaptés en fonction de chaque espèce. Ainsi, pour le poisson zèbre, qui est une espèce très mobile, les stratégies de tests comportementaux se sont focalisées sur l'étude de la locomotion (nage 24 h) ou sur des challenges induisant une variation du comportement locomoteur (challenge lumineux, *T-maze*, choix de couleur de fond). L'âge des poissons a aussi été pris en compte en utilisant des tests plus longs et plus complexes chez les adultes, et plus rapides et plus simples chez les larves. Concernant la sole, plus placide, le comportement locomoteur a été suivi pendant 23 h sans acclimatation afin de pouvoir à la fois mesurer une situation de challenge, puis l'activité normale après récupération. En dehors de l'activité de nage, le challenge court (30 s) était basé sur le comportement d'enfouissement, qui est propre aux poissons plats, et le test d'homochromie a été réalisé sur deux périodes consécutives de 13 jours, afin de prendre en compte le temps nécessaire à une bonne adaptation chromatique (Ellis *et al.*, 1997).

Les tests se sont volontairement portés sur différents aspects comportementaux afin de pouvoir plus facilement mettre en évidence d'éventuels effets des PCB, sans a priori.

Suivi des variables physiologiques

Le suivi des variables physiologiques pendant les 60 jours de contamination des soles n'a montré aucune différence expliquée par le traitement, que ce soit pour le poids, l'indice de condition de Fulton ou le taux de croissance journalier. Ces résultats confirment ceux préalablement trouvés par Eichinger *et al.* (2010). Chez le poisson zèbre, le suivi de ces variables, réalisé dans le cadre de la thèse de Tarek Daouk, n'a montré aucune différence significative pendant l'ensemble de la contamination (Daouk *et al.*, 2011). Concernant les travaux de Bengtsson (1980) et Lyche *et al.* (2010) ayant montré une augmentation significatif du poids des individus contaminés, les premiers utilisaient un mélange commercial de PCB (Clophen A50) et les seconds se servaient d'un mélange PCB / PBDE / DDT. Örn *et al.* (1998), qui ont quant à eux montré une baisse de poids, utilisaient un mélange de 20 congénères de PCB, notamment des *dioxin-like* dont le CB-126 et CB-169, dans des doses plus importantes que les nôtres (jusqu'à $\Sigma\text{PCB}=8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Ces variations de protocoles peuvent expliquer les variations des effets constatés sur le poids.

Les variations comportementales en situation de challenge

Chez la sole, le suivi de l'activité de nage a commencé sans acclimatation, donc en situation de challenge. Pendant les premières heures de ce test, la condition la plus fortement contaminée (*PCB high*) a montré une activité locomotrice significativement plus élevée. Lors du challenge d'enfouissement sur fond sableux, aucune différence significative n'a été trouvée entre les conditions. En revanche, le suivi de la chromie pendant les 26 jours suivant la fin de la contamination a montré des capacités d'assombrissement amoindries.

Chez le poisson zèbre, lors de challenge de choix de couleur de fond, les individus du groupe *PCB medium* ont significativement moins utilisé l'arène sombre que les individus des groupes *Solvent* et *PCB high*. Lors du challenge en *T-maze*, ces mêmes individus (condition *PCB medium*) ont montré une vitesse de nage et une mobilité plus forte que les individus des autres conditions, ainsi qu'un nombre d'individus atteignant la zone de confort plus élevé pour une latence moyenne pour atteindre cette zone significativement plus faible que pour les autres conditions. Enfin, chez la génération F1 de poissons zèbres, issue de géniteurs contaminés, la situation de challenge lumineux a montré une activité locomotrice plus élevée chez les larves des conditions *PCB medium* et *PCB high* avant et pendant la phase d'obscurité. Au retour de la lumière, seuls les individus de la condition *PCB medium* ont montré une activité locomotrice très nettement supérieure à celle mesurée pour les autres.

Il semblerait donc que pour les deux espèces considérées, les situations de challenge provoquent des réactions comportementales exacerbées chez les individus contaminés aux PCB. Cette différence s'exprime par une activité de nage plus soutenue. Cette altération se retrouve chez la génération fille de poissons zèbres contaminés.

Les variations comportementales en dehors des situations de challenge

Chez la sole, après l'habituation à l'environnement de test pour l'étude de l'activité sur 23 h, les individus de la condition *PCB medium* ont montré une activité significativement moins élevée pendant la nuit. Durant le test d'homochromie, les individus contaminés ont montré plus de difficultés à s'assombrir.

Chez le poisson zèbre, les individus de la condition *PCB high* ont montré une activité locomotrice pendant le deuxième tiers de la nuit significativement plus élevée que celle des individus de la condition *Solvent*. Lors de la dernière partie de la nuit, les individus de la condition *PCB high* ont été significativement plus actifs que ceux des conditions *Plain* et *Solvent*. Chez la génération de poissons zèbres issue de géniteurs contaminés, l'activité de nage horizontale a été significativement plus élevée pour les individus de la condition *PCB high* sur l'ensemble des heures de jour et pour la condition *PCB medium* pour le milieu de la nuit. Au niveau de l'activité de nage verticale, l'expérience a montré que la répartition verticale des poissons contaminés était différente de celle des poissons *Solvent* et que cela était associé à une augmentation du nombre de changement de zones.

Il semblerait donc que chez ces deux espèces, la contamination entraîne également des modifications de comportement (en particulier d'activité) en l'absence de contrainte.

Implications écologiques des effets des PCB

L'altération des capacités d'adaptation chez les individus contaminés aux PCB chez les deux espèces ainsi que l'altération de leur activité en dehors des situations de challenge peuvent avoir des conséquences non négligeables sur leur survie en milieu naturel. En effet, l'augmentation de l'activité observée chez les individus contaminés pendant l'habituation au nouvel environnement pourrait avoir des conséquences négatives :

- en milieu naturel, les individus sont régulièrement en situation de challenge, que ce soit à cause de changements de facteurs abiotiques ou à cause d'une pression de prédation ; si, pour une raison quelconque, la réponse n'est pas appropriée à la perturbation, où si cette réponse est disproportionnée, la survie de l'individu peut être remise en question ;

- le fait que cette différence d'adaptation se traduise par une augmentation de l'activité locomotrice (parfois pendant plusieurs heures dans le cas de la sole) implique une dépense énergétique supplémentaire, qui peut avoir des conséquences importantes ultérieurement (en cas de deuxième challenge consécutif par exemple).

Chez la génération F1 de poissons zèbres, la présence des polluants dans le vitellus (Bodiguel *et al.*, 2009; Daouk *et al.*, 2011) entraîne une exposition immédiate des embryons au polluant. L'augmentation d'activité importante remarquée induit une dépense d'énergie non négligeable dès les premiers jours de vie chez ces individus. Dans le milieu naturel, une telle augmentation d'activité, accentuée par une situation de challenge, aura forcément des répercussions.

Au niveau de l'activité globale en dehors des situations de challenge, on retrouve aussi une altération de la locomotion dans le sens de l'augmentation de l'activité chez le poisson zèbre et dans le sens d'une diminution chez la sole. Ces deux espèces étant différentes, leurs stratégies comportementales le sont aussi : le poisson zèbre est une espèce mobile, la sole est plus placide. Chez une espèce mobile, une perturbation de l'état interne (comme lors d'une contamination aux PCB dans notre cas) va potentiellement induire une diminution du bien-être, ce qui peut se traduire par une augmentation de l'activité. Il ne semble pas contradictoire qu'une même perturbation, chez une espèce plus encline à l'immobilisme, augmente le comportement de prostration. La notion d'hyperactivité ou de syndrome d'ADHD induits par certaines substances (comme c'est le cas pour les PCB ; Holene *et al.*, 1998; Bushnell et Rice, 1999; Nakayama *et al.*, 2004, 2005a; Banerjee *et al.*, 2007; Eubig *et al.*, 2010) serait donc à replacer dans le contexte de l'espèce. La plupart (voire la totalité) des espèces sur lesquelles portent des études sur les effets des polluants sont des espèces réputées mobiles (comme par exemple l'Homme, le singe, la souris ou le poisson zèbre). L'utilisation de ces modèles permet d'obtenir des tests comportementaux qui peuvent être relativement courts en temps, mais l'interprétation des résultats risque de n'être valable que pour des espèces à la stratégie comportementale similaire. En plus d'être placide, la sole est un animal nocturne (Kruuk, 1963). Ce deuxième aspect est très important car les protocoles mis en place ont permis de prendre en compte cet aspect, et cette baisse d'activité pendant la nuit représente une altération comportementale importante pour cette espèce.

La mauvaise capacité des soles contaminées à s'assombrir est là aussi un double problème, car les individus seront potentiellement à la fois :

- plus facilement visibles des prédateurs ;
- plus facilement visibles de leur proies, et donc deviennent de moins bons prédateurs.

Ces deux points peuvent eux aussi être décisifs : au niveau de la survie, être visible des prédateurs est un risque qui peut avoir des conséquences à très court terme, tandis qu'être un mauvais prédateur aura des conséquences à plus ou moins long terme. En général, l'environnement préférentiel des soles est très vaseux et donc sombre. Cette difficulté devient donc encore plus problématique lorsqu'on la resitue dans un contexte écologique, comme par exemple la baie de Seine, où le taux de contamination des poissons aux PCB est très élevé.

D'un point de vue strictement éthologique, si l'on considère que les individus non contaminés sont en situation d'équilibre dans leurs réalisations comportementales, les différences observées chez les individus contaminés peuvent être mises en relation avec les quatre questions de [Tinbergen \(1963\)](#) :

- la cause immédiate du comportement : les augmentations d'activités observées chez les individus contaminés en réponse aux challenges soit : i) n'ont pas de sens stratégiques en termes de comportement mais constituent l'aspect visible d'une altération physiologique et/ou d'une dérégulation ; ii) font partie d'une stratégie comportementale alternative d'urgence ([Elliott et al., 2007](#)) qui n'est pas forcément efficace à nos yeux mais qui résulte d'un inconfort physiologique ;
- sa valeur de survie : les individus contaminés présentent des comportements qui pourraient potentiellement les mettre en danger, que ce soit au niveau énergétique avec des dépenses non justifiées ou alors au niveau mimétique pour la sole, plus facilement visible des proies et de prédateurs ;
- son ontogénèse : les larves de poissons zèbres issues de géniteurs contaminés ont montré un comportement locomoteur hyperactif dès le 5^e jour, et ce comportement a été ensuite retrouvé chez les mêmes individus devenus adultes ;
- sa phylogénèse : les larves puis les adultes de la génération F1 analysés lors ce travail ont été directement exposés aux PCB contenus dans les œufs au cours de leur embryogenèse, il n'est donc pas possible avec les données disponibles de statuer sur le caractère héréditaire des effets observés (par épigénèse par exemple).

Perspectives

Maintenant qu'un premier lot de tests comportementaux est correctement maîtrisé au sein de notre équipe, des études comportementales supplémentaires pourraient être envisagées dans le cas d'étude des effets de polluants organiques. Dans un premier temps,

des tests d'apprentissage permettraient de vérifier si les doses de polluants utilisées n'engendrent pas de troubles de la mémoire (symptôme du syndrome d'ADHD).

Des tests de nage en groupe pourraient apporter des informations complémentaires intéressantes (aux niveaux de la cohésion du groupe en nage libre ou de la prise de décision collective en labyrinthe) en sortant de l'échelle individuelle. Cependant, un certain nombre de progrès techniques restent encore à faire pour être en mesure de suivre plusieurs individus sans marquage par *video tracking*.

Des études complémentaires au suivi du comportement seraient à envisager pour les futurs travaux. Une approche chronobiologique pourrait notamment permettre de mieux expliquer les différences observées lors des expériences de nage de 23 et 24 h, par exemple en laissant les individus exprimer leurs rythmes librement pendant 72 h en lumière ou absence de lumière continue. Ces études peuvent être complétées par des analyses de taux d'hypocrétine, ou encore l'étude de l'expression de gènes *clock*. Pour les effets transgénérationnels, des études sur plusieurs générations (jusqu'à F3) permettraient de savoir si, en plus des polluants, des phénomènes épigénétiques sont responsables de la transmission des effets d'une génération à l'autre.

The background features a series of thin, light-colored wavy lines that create a sense of movement and depth. These lines are arranged in a pattern that resembles a stylized wave or a series of overlapping curves, filling the lower half of the page.

Références bibliographiques

- Abe, G., Suster, M. L. et Kawakami, K. (2011).** *Tol2*-mediated transgenesis, gene trapping, enhancer trapping, and the Gal-UAS system. In Detrich, III, H. W., Westerfield, M. et Zon, L. I. (Éditeurs): *The Zebrafish: Genetics, Genomics and Informatics*, Volume 104 de *Methods in Cell Biology*. Academic Press, Chapitre 2, pages 23–50.
- Adams, S. M. et Greeley, M. S. (2000).** Ecotoxicological indicators of water quality: Using multi-response indicators to assess the health of aquatic ecosystems. *Water, Air, & Soil Pollution*, **123**:103–115.
- Ahmad, S. U., Tariq, S., Jalali, S. et Ahmad, M. M. (2003).** Environmental pollutant Aroclor 1242 (PCB) disrupts reproduction in adult male rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). *Environmental Research*, **93**(3):272–278.
- Ali, S., Champagne, D. L. et Richardson, M. K. (in press).** Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behavioural Brain Research*, (0). In press.
- Ali, S., Champagne, D. L., Spaink, H. P. et Richardson, M. K. (2011).** Zebrafish embryos and larvae: A new generation of disease models and drug screens. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, **93**(2):115–133.
- Allman, T. (2009).** Schools and flocks. In Bloom, H. (Éditeur) : *Animal Life in Groups*, Animal Behavior. Chelsea House Publishers, Chapitre 4, pages 46–60.
- Altmann, J. (1974).** Observational study of behavior: Sampling methods. *Behaviour*, **49**(3/4):227–267.
- Aluru, N., Jorgensen, E. H., Maule, A. G. et Vijayan, M. M. (2004).** PCB disruption of the hypothalamus-pituitary-interrenal axis involves brain glucocorticoid receptor downregulation in anadromous Arctic charr. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **287**(4):R787–R793.
- Amara, R., Désaunay, Y. et Lagardère, F. (1994).** Seasonal variation in growth of larval sole *Solea solea* (L.) and consequences on the success of larval immigration. *Netherlands Journal of Sea Research*, **32**(3-4):287–298.
- Amara, R., Lagardère, F., Désaunay, Y. et Marchand, J. (2000).** Metamorphosis and estuarine colonisation in the common sole, *Solea solea* (L.): Implications for recruitment regulation. *Oceanologica Acta*, **23**(4):469–484.
- Amara, R., Poulard, J.-C., Lagardère, F. et Désaunay, Y. (1998).** Comparison between the life cycles of two Soleidae, the common sole, *Solea solea*, and the thickback sole, *Microchirus variegatus*, in the Bay of Biscay (France). *Environmental Biology of Fishes*, **53**(2):193–209.
- Appelbaum, S., Adron, J. W., George, S. G., Mackie, A. M. et Pirie, B. J. S. (1983).** On the development of the olfactory and the gustatory organs of the Dover sole, *Solea solea*, during metamorphosis. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **63**(01):97–108.
- Appelbaum, S. et Schemmel, C. (1983).** Dermal sense organs and their significance in the feeding behaviour of the common sole *Solea vulgaris*. *Marine Ecology Progress Series*, **13**:29–36.
- Aranda, A., Madrid, J. A. et Sanchez-Vazquez, F. J. (2001).** Influence of light on feeding anticipatory activity in goldfish. *Journal of Biological Rhythms*, **16**(1):50–57.
- Arbault, S., Camus, P. et le Bec, C. (1986).** Estimation du stock de sole (*Solea vulgaris*, Quensel 1806) dans le Golfe de Gascogne à partir de la production d'œufs. *Journal of Applied Ichthyology*, **2**(4):145–156.
- Baldridge, M. G., Stahl, R. L., Gerstenberger, S. L., Tripoli, V. et Hutz, R. J. (2003).** Modulation of ovarian follicle maturation in Long-Evans rats exposed to polychlorinated biphenyls (PCBs) *in-utero* and lactationally. *Reproductive Toxicology*, **17**(5):567–573.

- Ballschmiter, K. et Zell, M. (1980).** Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, **302**(1):20–31.
- Banerjee, T. D., Middleton, F. et Faraone, S. V. (2007).** Environmental risk factors for attention-deficit hyperactivity disorder. *Acta Paediatrica*, **96**(9):1269–1274.
- Baras, E., Malbrouck, C., Houbart, M., Kestemont, P. et Mélard, C. (2000).** The effect of PIT tags on growth and physiology of age-0 cultured Eurasian perch *Perca fluviatilis* of variable size. *Aquaculture*, **185**(1-2):159–173.
- Barber, I., Hoare, D. et Krause, J. (2000).** Effects of parasites on fish behaviour: A review and evolutionary perspective. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **10**:131–165.
- Barber, I. et Wright, H. A. (2001).** How strong are familiarity preferences in shoaling fish? *Animal Behaviour*, **61**(5):975–979.
- Barhoumi, S., Messaoudi, I., Deli, T., Saïd, K. et Kerkeni, A. (2009).** Cadmium bioaccumulation in three benthic fish species, *Salarias basilisca*, *Zosterisessor ophiocephalus* and *Solea vulgaris* collected from the Gulf of Gabes in Tunisia. *Journal of Environmental Sciences*, **21**(7):980–984.
- Barnard, C. J. (2004).** *Animal behaviour: Mechanism, development, function & evolution*. Prentice Hall. Éditions Pearson Education, New Zealand. 726 pp.
- Batty, R. S. et Hoyt, R. D. (1995).** The role of sense organs in the feeding behaviour of juvenile sole and plaice. *Journal of Fish Biology*, **47**(6):931–939.
- Baynes, S. M., Howell, B. R., Beard, T. W. et Hallam, J. D. (1994).** A description of spawning behaviour of captive dover sole, *Solea solea* (L.). *Netherlands Journal of Sea Research*, **32**(3–4):271–275.
- Beck, M. W., Heck, K. L., Able, K. W., Childers, D. L., Eggleston, D. B., Gillanders, B. M., Halpern, B., Hays, C. G., Hoshino, K., Minello, T. J., Orth, R. J., Sheridan, P. F. et Weinstein, M. P. (2001).** The identification, conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience*, **51**(8):633–641.
- Beeuwkes, J., Spitzen, J., Spoor, C. W., Van Leeuwen, J. L. et Takken, W. (2008).** 3-D flight behaviour of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* ss inside an odour plume. *Carbon*, **19**:137–146.
- Bégout, M.-L., Kadri, S., Huntingford, F. et Damsgård, B. (2012).** Tools for studying the behaviour of farmed fish. In Huntingford, F., Jobling, M. et Kadri, S. (Éditeurs): *Aquaculture and Behavior*. Blackwell Publishing, Chapitre 3, pages 65–86.
- Bell, A. M., Hankinson, S. J. et Laskowski, K. L. (2009).** The repeatability of behaviour : A meta-analysis. *Animal Behaviour*, **77**:13.
- 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. et 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: Current Issues*, **74**(7):407–423.
- Berger, D. F., Lombardo, J. P., Jeffers, P. M., Hunt, A. E., Bush, B., Casey, A. et Quimby, F. (2001).** Hyperactivity and impulsiveness in rats fed diets supplemented with either Aroclor 1248 or PCB-contaminated St. Lawrence River fish. *Behavioural Brain Research*, **126**(1-2):1–11.
- Berntssen, M. H. G., Lundebye, A.-K. et Torstensen, B. E. (2005).** Reducing the levels of dioxins and dioxin-like PCBs in farmed Atlantic salmon by substitution of fish oil with vegetable oil in the feed. *Aquaculture Nutrition*, **11**(3):219–231.

- Beyer, A. et Biziuk, M. (2009).** Environmental fate and global distribution of polychlorinated biphenyls. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*, **201**:137–158.
- Biais, G., Léauté, J.-P., Sauriau, P.-G., Loizeau, V., Robert, S., Lavesque, N., Lepareur, F., Aubert, F., Joassard, L., Paticat, F. et Roupsard, F. (2010).** Fonctionnement de la nourricerie à sole des pertuis Charentais – Rapport final FONSOLE. Rapport technique, Ifremer. Appel à projet "Excellence environnementale" 2006 – Convention 06/RCP-R-004.
- Billsson, K., Westerlund, L., Tysklind, M. et Olsson, P.-E. (1998).** Developmental disturbances caused by polychlorinated biphenyls in zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Marine Environmental Research*, **46**(1-5):461–464.
- Blanco-Vives, B. et Sánchez-Vázquez, F. J. (2009).** Synchronisation to light and feeding time of circadian rhythms of spawning and locomotor activity in zebrafish. *Physiology & Behavior*, **98**(3):268–275.
- Blechinger, S. R., Kusch, R. C., Haugo, K., Matz, C., Chivers, D. P. et Krone, P. H. (2007).** Brief embryonic cadmium exposure induces a stress response and cell death in the developing olfactory system followed by long-term olfactory deficits in juvenile zebrafish. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **224**(1):72–80.
- Blin, M., Norton, W., Bally-Cuif, L. et Vernier, P. (2008).** NR4A2 controls the differentiation of selective dopaminergic nuclei in the zebrafish brain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, **39**(4):592–604.
- Blom, S. et Förlin, L. (1997).** Effects of PCB on xenobiotic biotransformation enzyme activities in the liver and 21-hydroxylation in the head kidney of juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, **39**(3-4):215–230.
- Bodiguel, X., Loizeau, V., Le Guellec, A.-M., Roupsard, F., Philippon, X. et 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.
- Boix, J., Cauli, O., Leslie, H. et Felipo, V. (2011).** Differential long-term effects of developmental exposure to polychlorinated biphenyls 52, 138 or 180 on motor activity and neurotransmission. gender dependence and mechanisms involved. *Neurochemistry International*, **58**(1):69–77.
- Bolker, J. A. et Hill, C. R. (2000).** Pigmentation development in hatchery-reared flatfishes. *Journal of Fish Biology*, **56**(5):1029–1052.
- Boon, J. P. et Duinker, J. C. (1985).** Kinetics of polychlorinated biphenyl (PCB) components in juvenile sole (*Solea solea*) in relation to concentrations in water and to lipid metabolism under conditions of starvation. *Aquatic Toxicology*, **7**(1-2):119–134.
- Boon, J. P., Oudejans, R. C. H. M. et Duinker, J. C. (1984).** Kinetics of individual polychlorinated biphenyl (PCB) components in juvenile sole (*Solea solea*) in relation to their concentrations in food and to lipid metabolism. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Comparative Pharmacology*, **79**(1):131–142.
- Borgå, K., Gabrielsen, G. W. et Skaare, J. U. (2001).** Biomagnification of organochlorines along a Barents Sea food chain. *Environmental Pollution*, **113**(2):187–198.
- Breivik, K., Sweetman, A., Pacyna, J. M. et Jones, K. C. (2002).** Towards a global historical emission inventory for selected PCB congeners – A mass balance approach: 1. Global production and consumption. *The Science of The Total Environment*, **290**(1-3):181–198.
- Briggs, J. P. (2002).** The zebrafish: A new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **51**(1):R3–R9.

- Brooks, A. C., Gaskell, P. N. et Maltby, L. L. (2009).** Sublethal effects and predator-prey interactions: Implications for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **28**(11):2449–2457.
- Brown, G. et Smith, R. (1994).** Fathead minnows use chemical cues to discriminate natural shoalmates from unfamiliar conspecifics. *Journal of Chemical Ecology*, **20**:3051–3061.
- Brown, J., Lawton, R. et Morgan, C. (1994).** PCB metabolism, persistence, and health effects after occupational exposure: Implications for risk assessment. *Chemosphere*, **29**(9-11):2287–2294.
- Brown, J. H., McCauley, S., Ross, B., Taylor, A. et Huntingford, F. (2003).** A test of two methods for marking larvae and postlarvae of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture Research*, **34**(1):49–54.
- Brown, R. S., Cooke, S. J., Anderson, W. G. et McKinley, R. S. (1999).** Evidence to challenge the "2 rules" for biotelemetry. *North American Journal of Fisheries Management*, **19**(3):867–871.
- Brustein, E., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R. et Drapeau, P. (2003).** Steps during the development of the zebrafish locomotor network. *Journal of Physiology*, **97**(1):77–86.
- Buckley, R. M. et Blankenship, H. L. (1990).** Internal tags and marks. internal extrinsic identification systems : Overview of implanted wire tags, otolith marks, and parasites. In Parker, N. C. (Éditeur) : *Fish-marking techniques*, Volume 7, pages 173–183, Bethesda, Maryland. American Fisheries Society.
- Buckman, A. H., Fisk, A. T., Parrott, J. L., Solomon, K. R. et 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.
- Budzinski, H., Mazéas, O., Tronczynski, J., Désaunay, Y., Bocquené, G. et Claireaux, G. (2004).** Link between exposure of fish (*Solea solea*) to pahs and metabolites: Application to the "Erika" oil spill. *Aquatic Living Resources*, **17**(3):329–334.
- Burton, D. (2002).** The physiology of flatfish chromatophores. *Microscopy Research and Technique*, **58**(6):481–487.
- Bushnell, P. J. et Rice, D. C. (1999).** Behavioral assessments of learning and attention in rats exposed perinatally to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PCB 126). *Neurotoxicology and Teratology*, **21**(4):381–392.
- Buske, C. et Gerlai, R. (2011).** Shoaling develops with age in zebrafish (*Danio rerio*). *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **35**(6):1409–1415.
- Cañavate, P. J., Zerolo, R. et Fernández-Díaz, C. (2006).** Feeding and development of senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae reared in different photoperiods. *Aquaculture*, **258**(1-4):368–377.
- Cabral, H. et Costa, M. J. (1999).** Differential use of nursery areas within the Tagus Estuary by sympatric soles, *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Environmental Biology of Fishes*, **56**(4):389–397.
- Calabrese, E. J. et Baldwin, L. A. (2003).** Hormesis: the dose-response revolution. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **43**:175–197.
- Campbell, N. A. et Reece, J. B. (2009).** *Biologie*. Pearson Education. Éditions 7. 1312.
- Candland, D., Dresdale, L., Leiphart, J. et Johnson, C. (1972).** Videotape as a replacement for the human observer in studies of nonhuman primate behavior. *Behavior Research Methods*, **4**(1):24–26.
- Carpenter, D. O. (2006).** Polychlorinated biphenyls (pcbs) : Routes of exposure and effects on human health. **21**(1):1–23.

- Celander, M. et Förlin, L. (1995).** Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P450 1A1 system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB. *Aquatic Toxicology*, **33**(2): 141–153.
- Champagne, D. L., Hoefnagels, C. C. M., de Kloet, R. E. et Richardson, M. K. (2010).** Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): Relevance for stress research. *Behavioural Brain Research*, **214**(2):332–342.
- Champalbert, G. et Castelbon, C. (1989).** Swimming activity rhythms in *Solea vulgaris* (Q) juveniles. *Marine Behaviour and Physiology*, **14**(4):201–209.
- Chen, Y. C., Yu, M. L., Rogan, W. J., Gladen, B. C. et Hsu, C. C. (1994).** A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children. *American Journal of Public Health*, **84**(3):415–421.
- Chovancová, J., Čonka, K., Kočan, A. et Sejkáková, Z. S. (2011).** PCDD, PCDF, PCB and PBDE concentrations in breast milk of mothers residing in selected areas of Slovakia. *Chemosphere*, **83**:1383–1390.
- Claireaux, G., Désaunay, Y., Akcha, F., Aupérin, B., Bocquené, G., Budzinski, H., Cravedi, J., Davoodi, F., Galois, R., Gilliers, C., Goanvec, C., Guérault, D., Imbert, N., Mazéas, O., Nonnotte, G., Nonnotte, L., Prunet, P., Sébert, P. et Vettier, A. (2004).** Influence of oil exposure on the physiology and ecology of the common sole *Solea solea*: Experimental and field approaches. *Aquatic Living Resources*, **17**:335–351.
- Claireaux, G. et Lefrançois, C. (1998).** A method for the external attachment of acoustic tags on roundfish. *Hydrobiologia*, **371–372**:113–116.
- Claireaux, G. et Lefrançois, C. (2007).** Linking environmental variability and fish performance: Integration through the concept of scope for activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **362**(1487):2031–2041.
- Claisse, D. (1989).** Chemical contamination of french coasts: The results of a ten years mussel watch. *Marine Pollution Bulletin*, **20**(10):523–528.
- Cocchi, D., Tulipano, G., Colciago, A., Sibilia, V., Pagani, F., Viganò, D., Rubino, T., Parolaro, D., Bonfanti, P., Colombo, A. et Celotti, F. (2009).** Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat: Part 1: Effects on somatic growth, growth hormone-axis activity and bone mass in the offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **237**(2):127–136.
- Colciago, A., Casati, L., Mornati, O., Vergoni, A., Santagostino, A., Celotti, F. et Negri-Cesi, P. (2009).** Chronic treatment with polychlorinated biphenyls (PCB) during pregnancy and lactation in the rat: Part 2: Effects on reproductive parameters, on sex behavior, on memory retention and on hypothalamic expression of aromatase and 5alpha-reductases in the offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **239**(1):46–54.
- Collins, Jr., W. T. et Capen, C. C. (1980).** Fine structural lesions and hormonal alterations in thyroid glands of perinatal rats exposed in utero and by the milk to polychlorinated biphenyls. *American Journal of Pathology*, **99**(1):125–142.
- Collins, Jr., W. T., Capen, C. C., Kasza, L., Carter, C. et Dailey, R. E. (1977).** Effect of Polychlorinated Biphenyl (PCB) on the thyroid gland of rats. *The American Journal of Pathology*, **89**(1):119–136.
- Colwill, R. M., Raymond, M. P., Ferreira, L. et Escudero, H. (2005).** Visual discrimination learning in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, **70**(1):19–31.
- Conolly, R. B., Gaylor, D. W. et Lutz, W. K. (2005).** Population variability in biological adaptive responses to dna damage and the shapes of carcinogen dose-response curves. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **207**(2 Suppl):570–575.

- Conolly, R. B. et Lutz, W. K. (2004).** Nonmonotonic dose-response relationships: Mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences*, **77**(1):151–177.
- Cooke, S., Woodley, C., Brad Eppard, M., Brown, R. et Nielsen, J. (2011).** Advancing the surgical implantation of electronic tags in fish: A gap analysis and research agenda based on a review of trends in intracoelomic tagging effects studies. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **21**:127–151.
- Cossa, D., Auger, D., Averty, B., Lucon, M., Masselin, P. et Noël, J. (1992).** Flounder (*Platichthys flesus*) muscle as an indicator of metal and organochlorine contamination of French Atlantic coastal waters. *Ambio*, **21**(2):176–182.
- Costa, P. M., Diniz, M. S., Caeiro, S., Lobo, J., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T. A. et Costa, M. H. (2009).** Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquatic Toxicology*, **92**(3):202–212.
- Costa, P. M., Lobo, J., Caeiro, S., Martins, M., Ferreira, A. M., Caetano, M., Vale, C., DelValls, T. A. et Costa, M. H. (2008).** Genotoxic damage in *Solea senegalensis* exposed to sediments from the Sado Estuary (Portugal): Effects of metallic and organic contaminants. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **654**(1):29–37.
- Creton, R. (2009).** Automated analysis of behavior in zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research*, **203**(1):127–136.
- Crofton, K. M., Kodavanti, P. R. S., Derr-Yellin, E. C., Casey, A. C. et Kehn, L. S. (2000).** PCBs, thyroid hormones, and ototoxicity in rats: Cross-fostering experiments demonstrate the impact of postnatal lactation exposure. *Toxicological Sciences*, **57**(1):131–140.
- Crossman, E., Williams, J. et Chambers, J. (1978).** Using the PET microcomputer for collecting and analyzing observational data in the classroom. *Behavior Research Methods*, **10**(4):563–566.
- Daouk, T., Larcher, T., Rounsard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., Loizeau, V. et Cousin, X. (2011).** Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquatic Toxicology*, **105**(3-4):270–278.
- Darrow, K. O. et Harris, W. A. (2004).** Characterization and development of courtship in zebrafish, *Danio rerio*. *Zebrafish*, **1**(1):40–45.
- Davoodi, F. et Claireaux, G. (2007).** Effects of exposure to petroleum hydrocarbons upon the metabolism of the common sole *Solea solea*. *Marine Pollution Bulletin*, **54**(7):928–934.
- Dawkins, M. S. (2007).** *Observing Animal Behaviour – Design and Analysis of Quantitative Data*. Oxford University Press. New-York. 158.
- de Groot, S. J., Norde, R. et Verheijen, F. J. (1969).** Retinal stimulation and pattern formation in the common sole *Solea solea* (L.) (Pisces: Soleidae). *Netherlands Journal of Sea Research*, **4**(3):339–349.
- De Pontual, H., Lagardère, F., Troadec, H., Batel, A., Désaunay, Y. et Koutsikopoulos, C. (2000).** Otoliths imprinting of sole (*Solea solea*) from the Bay of Biscay: A tool to discriminate individuals from nursery origins? *Oceanologica Acta*, **23**(4):497–513.
- Decourtye, A., Devillers, J., Aupinel, P., Brun, F., Bagnis, C., Fourrier, J. et Gauthier, M. (2011).** Honeybee tracking with microchips: a new methodology to measure the effects of pesticides. *Ecotoxicology*, **20**:429–437.
- del Pozo, A., Sánchez-Férez, J. A. et Sánchez-Vázquez, F. J. (2011).** Circadian rhythms of self-feeding and locomotor activity in zebrafish (*Danio Rerio*). *Chronobiology International*, **28**(1):39–47.

- Delcourt, J., Becco, C., Vandewalle, N. et Poncin, P. (2009).** A video multitracking system for quantification of individual behavior in a large fish shoal: Advantages and limits. *Behavior Research Methods*, **41**:228–235.
- Delcourt, J., Ylief, M., Bolliet, V., Poncin, P. et Bardonnnet, A. (2011).** Video tracking in the extreme: A new possibility for tracking nocturnal underwater transparent animals with fluorescent elastomer tags. *Behavior Research Methods*, **43**:590–600.
- Deni, R., Szijarto, K., Eisler, A. et Fantauzzo, C. (1983).** BASIC programs for observational research using the TRS-80 Model 100 portable and Model 4 computers. *Behavior Research Methods*, **15**(6):616–616.
- Deo, R. C. et MacRae, C. A. (2010).** The zebrafish: Scalable *in vivo* modeling for systems biology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, pages 335–346.
- Derry, J. et Elliott, C. (1997).** Automated 3-D tracking of video-captured movement using the example of an aquatic mollusk. *Behavior Research Methods*, **29**(3):353–357.
- Dinh, H., Coman, G., Hurwood, D. A. et Mather, P. B. (in press).** Experimental assessment of the utility of visible implant elastomer tags in a stock improvement programme for giant freshwater prawn (*macrobrachium rosenbergii*) in vietnam. *Aquaculture Research*.
- Domenici, P., Claireaux, G. et McKenzie, D. (2007).** Environmental constraints upon locomotion and predator-prey interactions in aquatic organisms: An introduction. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **362**(1487):1929–1936.
- Dooley, K. et Zon, L. I. (2000).** Zebrafish: A model system for the study of human disease. *Current Opinion in Genetics & Development*, **10**(3):252–256.
- Dorel, D., Koutsikopoulos, C., Désaunay, Y. et Marchand, J. (1991).** Seasonal distribution of young sole (*Solea solea* (L.)) in the nursery ground of the bay of Vilaine (Northern bay of Biscay). *Netherlands Journal of Sea Research*, **27**(3-4):297–306.
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R. R., Chong, M., McDearmid, J. R. et Brustein, E. (2002).** Development of the locomotor network in zebrafish. *Progress in Neurobiology*, **68**(2):85–111.
- Duinker, J. C. et Hillebrand, M. T. J. (1983).** Composition of PCB mixtures in biotic and abiotic marine compartments (Dutch Wadden Sea). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **31**:25–32.
- Durieux, É. (2007).** *Écologie du système hôte-parasite, juvéniles G0 de sole (Solea solea)-métacercaires de Digènes : Dynamique et effets de l'infestation.* Thèse de doctorat, Université de la Rochelle. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/2933/>.
- Durieux, É. D. H., Le Duigou, M., Millot, S., Sasal, P. et Bégout, M.-L. (2010).** Sedentary behaviour establishment in 0-group common sole *Solea solea*: A laboratory video-tracking study. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **90**(Special Issue 06):1257–1262.
- Easter, S. S. et Nicola, G. N. (1997).** The development of eye movements in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Psychobiology*, **31**(4):267–276.
- Easter, Jr., S. S. et Nicola, G. N. (1996).** The development of vision in the zebrafish (*Danio rerio*). *Developmental Biology*, **180**(2):646–663.
- Eaton, R. C. et Farley, R. D. (1973).** Development of the mauthner neurons in embryos and larvae of the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Copeia*, **1973**(4):673–682.

- Egan, R. J., Bergner, C. L., Hart, P. C., Cachat, J. M., Canavello, P. R., Elegante, M. F., Elkhayat, S. I., Bartels, B. K., Tien, A. K., Tien, D. H., Mohnot, S., Beeson, E., Glasgow, E., Amri, H., Zukowska, Z. et Kalueff, A. V. (2009). Understanding behavioral and physiological phenotypes of stress and anxiety in zebrafish. *Behavioural Brain Research*, **205**(1):38–44.
- Eichinger, M., Loizeau, V., Roupsard, F., Le Guellec, A. et Bacher, C. (2010). Modelling growth and bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in common sole (*Solea solea*). *Journal of Sea Research*, **64**(3):373–385.
- Elliott, M., Hemingway, K. L., Krueger, D., Thiel, R., Hylland, K., Arukwe, A., Førlin, L. et Sayer, M. (2007). From the individual to the population and community responses to pollution. In *Effects of Pollution on Fish*. Blackwell Science, Chapitre 6, pages 221–255.
- Ellis, T., Hoowell, B. R. et Hughes, R. N. (1997). The cryptic responses of hatchery-reared sole to a natural sand substratum. *Journal of Fish Biology*, **51**(2):389–401.
- Engeszer, R. E., Da Barbiano, L. A., Ryan, M. J. et Parichy, D. M. (2007a). Timing and plasticity of shoaling behaviour in the zebrafish, *Danio rerio*. *Animal Behaviour*, **74**(5):1269–1275.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. A. et Parichy, D. M. (2007b). Zebrafish in the wild: A review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish*, **4**(1):21–40.
- Ergener, D. et Wellens, A. (1989). DataVision: A computer-based system for generating and reading digital information accompanying video images on videotape. *Behavior Research Methods*, **21**(3):401–407.
- Eubig, P. A., Aguiar, A. et Schantz, S. L. (2010). Lead and PCBs as risk factors for attention deficit hyperactivity disorder. *Environmental Health Perspective*, **118**(12):1654–1667.
- Fetcho, J. R., Higashijima, S.-i. et McLean, D. L. (2008). Zebrafish and motor control over the last decade. *Brain Research Reviews*, **57**(1):86–93.
- Fisk, A. T., Hobson, K. A. et 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.
- Fisk, A. T., Norstrom, R. J., Cymbalisty, C. D. et Muir, D. C. (1998). Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**(5):951–961.
- Fleisch, V. C. et Neuhauss, S. C. (2006). Visual behavior in zebrafish. *Zebrafish*, **3**(2):191–201.
- Flowers, J. et Leger, D. (1982). Personal computers and behavioral observation: An introduction. *Behavior Research Methods*, **14**(2):227–230.
- Foekema, E. M., Deerenberg, C. M. et 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.
- Fromberg, A., Granby, K., Højgård, A., Fagt, S. et Larsen, J. (2011). Estimation of dietary intake of PCB and organochlorine pesticides for children and adults. *Food Chemistry*, **125**(4):1179–1187.
- Frommen, J., Mehlis, M., Brendler, C. et Bakker, T. (2007). Shoaling decisions in three-spined sticklebacks (*Gasterosteus aculeatus*): Familiarity, kinship and inbreeding. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **61**:533–539.
- Gapenne, O., Simon, P. et Lannou, J. (1990). A simple method for recording the path of a rat in an open field. *Behavior Research Methods*, **22**(5):443–448.

- Garrett, R. W. et Gasiewicz, T. A. (2006).** The aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters the circadian rhythms, quiescence, and expression of clock genes in murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Molecular Pharmacology*, **69**(6):2076–2083.
- Geoffroy Saint-Hilaire, I. (1859).** *Histoire naturelle générale des règnes organiques : principalement étudiée chez l'homme et les animaux. Tome 2.* <http://hdl.handle.net/1908/1412>. Éditions V. Masson, Paris, France.
- Gerlai, R. (2003).** Zebra fish: An uncharted behavior genetic model. *Behavior Genetics*, **33**(5):461–468.
- Gerlai, R., Fernandes, Y. et Pereira, T. (2009).** Zebrafish (*Danio rerio*) responds to the animated image of a predator: Towards the development of an automated aversive task. *Behavioural Brain Research*, **201**(2):318–324.
- Gerlai, R., Lahav, M., Guo, S. et Rosenthal, A. (2000).** Drinks like a fish: Zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, **67**:773–782.
- Gewurtz, S. B., Bhavsar, S. P. et Fletcher, R. (2011).** Influence of fish size and sex on mercury/PCB concentration: Importance for fish consumption advisories. *Environment International*, **37**(2):425–434.
- Gilliers, C., Le Pape, O., Désaunay, Y., Morin, J., Guérault, D. et Amara, R. (2006).** Are growth and density quantitative indicators of essential fish habitat quality? an application to the common sole *Solea solea* nursery grounds. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **69**(1-2):96–106.
- Gobas, F. A. et Arnot, J. A. (2010).** Food web bioaccumulation model for polychlorinated biphenyls in San Francisco Bay, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **29**(6):1385–1395.
- Gong, S. et Xiang, T. (2011).** About behaviour. In *Visual Analysis of Behaviour*. Springer London, Chapitre 1, pages 3–13.
- Gould, G. G. (2011).** Modified associative learning t-maze test for zebrafish (*Danio rerio*) and other small teleost fish. In Kalueff, A. V. et Cachat, J. M. (Éditeurs): *Zebrafish Neurobehavioral Protocols*, Volume 51 de *Neuromethods*. Humana Press, Chapitre 5, pages 61–73.
- Granato, M., van Eeden, F., Schach, U., Trowe, T., Brand, M., Furutani-Seiki, M., Haffter, P., Hammerschmidt, M., Heisenberg, C., Jiang, Y., Kane, D., Kelsh, R., Mullins, M., Odenthal, J. et Nusslein-Volhard, C. (1996).** Genes controlling and mediating locomotion behavior of the zebrafish embryo and larva. *Development*, **123**(1):399–413.
- Grandjean, P., Weihe, P., Burse, V. W., Needham, L. L., Storr-Hansen, E., Heinzow, B., Debes, F., Murata, K., Simonsen, H., Ellefsen, P., Budtz-Jørgensen, E., Keiding, N. et White, R. F. (2001).** Neurobehavioral deficits associated with PCB in 7-year-old children prenatally exposed to seafood neurotoxicants. *Neurotoxicology and Teratology*, **23**(4):305–317.
- Greer Walker, M. et Emerson, L. (1990).** The seasonal migration of soles (*Solea solea*) through the Dover Strait. *Netherlands Journal of Sea Research*, **25**(3):417–422.
- Grimes, A. C., Erwin, K. N., Stadt, H. A., Hunter, G. L., Gefroh, H. A., Tsai, H.-J. et Kirby, M. L. (2008).** PCB126 exposure disrupts zebrafish ventricular and branchial but not early neural crest development. *Toxicological Sciences*, **106**(1):193–205.
- Grimvall, E., Rylander, L., Nilsson-Ehle, P., Nilsson, U., Strömberg, U., Hagmar, L. et Östman, C. (1997).** Monitoring of polychlorinated biphenyls in human blood plasma: Methodological developments and influence of age, lactation, and fish consumption. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **32**:329–336.
- Guzzella, L., Roscioli, C., Viganó, L., Saha, M., Sarkar, S. et Bhattacharya, A. (2005).** Evaluation of the concentration of HCH, DDT, HCB, PCB and PAH in the sediments along the lower stretch of Hugli Estuary, West Bengal, Northeast India. *Environment International*, **31**(4):523–534.

- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M., Hammerschmidt, M., Kane, D., Odenthal, J., van Eeden, F., Jiang, Y., Heisenberg, C., Kelsh, R., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C. et Nusslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development*, **123**(1):1–36.
- Haimoff, E. H. (1981). Video analysis of siamang (*Hylobates syndactylus*) songs. *Behaviour*, **76**(1/2):128–151.
- Hall, M. et Halliday, T. (1998). *Behaviour and evolution*. Springer and Open University. 306 pp.
- Hänninen, L. et Pastell, M. (2009). CowLog: Open-source software for coding behaviors from digital video. *Behavior Research Methods*, **41**(2):472–476.
- Hanrahan, L. P., Falk, C., Anderson, H. A., Draheim, L., Kanarek, M. S. et Olson, J. (1999). Serum PCB and DDE levels of frequent Great Lakes sport fish consumers – A first look. *Environmental Research*, **80**(2):S26–S37.
- Hany, J., Lilienthal, H., Sarasin, A., Roth-Härer, A., Fastabend, A., Dunemann, L., Lichtensteiger, W. et Winneke, G. (1999). Developmental exposure of rats to a reconstituted PCB mixture or Aroclor 1254: Effects on organ weights, aromatase activity, sex hormone levels, and sweet preference behavior. *Toxicology and Applied Pharmacology*, **158**(3):231–243.
- Harada, M. et Smith, A. M. (1975). Minamata disease: A medical report. In Smith, W. E. et Smith, A. M. (Éditeurs): *Minamata*. Holt, Rinehart and Winston, New York, pages 180–192.
- Harris, S. A. et Jones, J. L. (2008). Fish consumption and PCB-associated health risks in recreational fishermen on the James River, Virginia. *Environmental Research*, **107**(2):254–263.
- Harvey, R., Blaxter, J. H. S. et Hoyt, R. D. (1992). Development of superficial and lateral line neuromasts in larvae and juveniles of plaice (*Pleuronectes platessa*) and sole (*Solea solea*). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **72**(03):651–668.
- Hashimoto, T., Izawa, Y., Yokoyama, H., Kato, T. et Moriizumi, T. (1999). A new video/computer method to measure the amount of overall movement in experimental animals (two-dimensional object-difference method). *Journal of Neuroscience Methods*, **91**(1-2):115–121.
- Helle, E., Olsson, M. et Jensen, S. (1976). PCB levels correlated with pathological changes in seal uteri. *Ambio*, **5**(5/6):261–262.
- Herbinger, C. M., Newkirk, G. F. et Lanes, S. T. (1990). Individual marking of atlantic salmon: Evaluation of cold branding and jet injection of Alcian Blue in several fin locations. *Journal of Fish Biology*, **36**(1):99–101.
- Heres, L., Hoogenboom, R., Herbes, R., Traag, W. et Urlings, B. (2010). Tracing and analytical results of the dioxin contamination incident in 2008 originating from the Republic of Ireland. *Food Additives & Contaminants: Part A*, **27**(12):1733–1744.
- Hetrick, W., Isenhardt, R., Taylor, D. et Sandman, C. (1991). ODAP: A stand-alone program for observational data acquisition. *Behavior Research Methods*, **23**(1):66–71.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W. et 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. et Bencic, D. C. (2005). Resolving mechanisms of toxicity while pursuing ecotoxicological relevance? *Marine Pollution Bulletin*, **51**(8-12):635–648.

- Hiraizumi, Y., Takahashi, M. et Nishimura, H. (1979).** Adsorption of polychlorinated biphenyl onto sea bed sediment, marine plankton, and other adsorbing agents. *Environmental Science & Technology*, **13**(5):580–584.
- Hodgson, E. (2010).** Introduction to toxicology. In *A Textbook of Modern Toxicology*. John Wiley & Sons, Chapitre 1, pages 3–14.
- Holene, E., Nafstad, I., Skaare, J. U. et Sagvolden, T. (1998).** Behavioural hyperactivity in rats following postnatal exposure to sub-toxic doses of polychlorinated biphenyl congeners 153 and 126. *Behavioural Brain Research*, **94**(1):213–224.
- Howell, B. R. (1997).** A re-appraisal of the potential of the sole, *Solea solea* (L.), for commercial cultivation. *Aquaculture*, **155**(1-4):355–365.
- HSPH (2001).** Polychlorinated biphenyls.
- Hsu, S.-T., Ma, C.-I., Hsu, S. K.-H., Wu, S.-S., Hsu, N. H.-M., Yeh, C.-C. et Wu, S.-B. (1985).** Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: A four-year followup. *Environmental Health Perspectives*, **59**:5–10.
- Huang, Q. et Hong, C.-S. (2002).** Aqueous solubilities of non-ortho and mono-ortho PCBs at four temperatures. *Water Research*, **36**(14):3543–3552.
- Imbert, H., Beaulaton, L., Rigaud, C. et Elie, P. (2007).** Evaluation of visible implant elastomer as a method for tagging small european eels. *Journal of Fish Biology*, **71**(5):1546–1554.
- Imsland, A. K., Foss, A., Conceição, L. E. C., Dinis, M. T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P. et White, P. (2003).** A review of the culture potential of *Solea solea* and *Solea senegalensis*. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **13**(4):379–408.
- INRS (2007).** Fiche toxicologique ft 194 - biphényles chlorés.
- Irons, T., MacPhail, R., Hunter, D. et Padilla, S. (2010).** Acute neuroactive drug exposures alter locomotor activity in larval zebrafish. *Neurotoxicology and Teratology*, **32**(1):84–90.
- Jadot, C., Donnay, A., Ylief, M. et Poncin, P. (2005).** Impact implantation of a transmitter on *Sarpa salpa* behaviour: Study with a computerized video tracking system. *Journal of Fish Biology*, **67**(2):589–595.
- Jakobsson, J. (1970).** On fish tags and tagging. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review*, **8**:457–499.
- Jaouen-Madoulet, A., Abarnou, A., Le Guellec, A.-M., Loizeau, V. et 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.
- Japayasú, H., Alberts, C., Izar, P. et Sato, T. (2006).** EthoSeq: A tool for phylogenetic analysis and data mining in behavioral sequences. *Behavior Research Methods*, **38**(4):549–556.
- Jensen, B. A., Reddy, C. M., Nelson, R. K. et Hahn, M. E. (2010).** Developing tools for risk assessment in protected species: Relative potencies inferred from competitive binding of halogenated aromatic hydrocarbons to aryl hydrocarbon receptors from beluga (*Delphinapterus leucas*) and mouse. *Aquatic Toxicology*, **100**(3):238–245.
- Jensen, L. F., Hansen, M. M. et Thomassen, S. T. (2008).** Visible implant elastomer (VIE) marking of brown trout, *Salmo trutta*, alevins. *Fisheries Management and Ecology*, **15**(1):81–83.

- Johansen, H. R., Alexander, J., Rossland, O. J., Planting, S., Løvik, M., Gaarder, P. I., Gdynia, W., Bjerve, K. S. et 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.
- Jørgensen, E. H., Bye, B. E. et Jobling, M. (1999).** Influence of nutritional status on biomarker responses to PCB in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology*, **44**(4):233–244.
- Kahng, S. W. et Iwata, B. A. (1998).** Computerized systems for collecting real-time observational data. *Journal Of Applied Behavior Analysis*, **31**:253–261.
- Kato, S., Nakagawa, T., Ohkawa, M., Muramoto, K., Oyama, O., Watanabe, A., Nakashima, H., Nemoto, T. et Sugitani, K. (2004).** A computer image processing system for quantification of zebrafish behavior. *Journal of Neuroscience Methods*, **134**(1):1–7.
- Kawai, M. (1984).** A method for analyzing the motion of an object on a VTR screen with an Apple II computer. *Behavior Research Methods*, **16**(1):12–18.
- Keenleyside, M. H. A. (1955).** Some aspects of the schooling behaviour of fish. *Behaviour*, **8**(2/3):183–248.
- Khan, I. A. et Thomas, P. (2006).** PCB congener-specific disruption of reproductive neuroendocrine function in Atlantic croaker. *Marine Environmental Research*, **62**(Supplement 1):S25–S28.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. et Schilling, T. F. (1995).** Stages of embryonic development of the zebrafish. *Developmental Dynamics*, **203**(3):253–310.
- Koch, S. C. et Zumbach, J. (2002).** The use of video analysis software in behavior observation research: Interaction patterns in task-oriented small groups. *Forum Qualitative Sozialforschung / Forum: Qualitative Social Research*, **3**(2).
- Koutsikopoulos, C., Désaunay, Y., Dorel, D. et Marchand, J. (1989).** The role of coastal areas in the life history of sole (*Solea solea* L.) in the Bay of Biscay. *Scientia Marina*, **53**(2-3):567–575.
- Koutsikopoulos, C. et Lacroix, N. (1992).** Distribution and abundance of sole (*Solea solea* (L.)) eggs and larvae in the Bay of Biscay between 1986 and 1989. *Netherlands Journal of Sea Research*, **29**(1-3):81–91.
- Kruuk, H. (1963).** Diurnal periodicity in the activity of the common sole, *Solea vulgaris* Quensel. *Netherlands Journal of Sea Research*, **2**(1):1–28.
- Lam, P., Richardson, B. et Wu, R. (1999).** The ecotoxicology concept: An introduction. In Connell, D. W., Lam, P., Richardson, B. et Wu, R. (Éditeurs): *Introduction to Ecotoxicology*. Blackwell Publishing, Chapitre 1, pages 1–18.
- Lamarck, J. B. P. A. d. M. (1809).** *Philosophie zoologique, ou, Exposition des considérations relative à l'histoire naturelle des animaux*. Éditions Chez Dentu [et] L'Auteur, Paris, France. –.
- Lawrence, C. (2007).** The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture*, **269**(1-4):1–20.
- Le Pape, O., Chauvet, F., Mahévas, S., Lazure, P., Guérault, D. et Désaunay, Y. (2003).** Quantitative description of habitat suitability for the juvenile common sole (*Solea solea*, L.) in the Bay of Biscay (France) and the contribution of different habitats to the adult population. *Journal of Sea Research*, **50**(2-3):139–149.
- Lebon, A. (2007).** Développement d'un outil informatique pour l'analyse d'images vidéo : SEE_FISH. L3 IMAE Mémoire de L3 Prépa IUP – Génie Informatique.
- Lehner, P. N. (1979).** *Handbook of ethological methods*. Garland. 419 pp.

- Lerner, D. T., Björnsson, B. T. et McCormick, S. D. (2007).** Effects of aqueous exposure to Polychlorinated Biphenyls (Aroclor 1254) on physiology and behavior of smolt development of Atlantic salmon. *Aquatic Toxicology*, **81**(3):329–336.
- Letz, G. (1983).** The toxicology of PCB's – An overview for clinicians. *The Western Journal of Medicine*, **138**(4):534–540.
- Levin, E. D., Bencan, Z. et Cerutti, D. T. (2007).** Anxiolytic effects of nicotine in zebrafish. *Physiology & Behavior*, **90**(1):54–58.
- Levitis, D. A., Lidicker Jr., W. Z. et Freund, G. (2009).** Behavioural biologists do not agree on what constitutes behaviour. *Animal Behaviour*, **78**(1):103–110.
- Liang, Y., Crnic, L., Kobla, V. et Wolf, W. (2004).** System and method for object identification and behavior characterization using video analysis.
- Lieschke, G. J. et Currie, P. D. (2007).** Animal models of human disease: Zebrafish swim into view. *Nature Reviews Genetics*, **8**(5):353–367.
- Linney, E., Upchurch, L. et Donerly, S. (2004).** Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicology and Teratology*, **26**(6):709–718.
- Little, E. E. et Finger, S. E. (1990).** Swimming behavior as an indicator of sublethal toxicity in fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**(1):13–19.
- Livesey, P. et Leppard, K. (1981).** A TV monitored system for recording open-field activity in the rat. *Behavior Research Methods*, **13**(3):331–333.
- Loizeau, V. et Abarnou, A. (1994).** Distribution of Polychlorinated Biphenyls in dab (*Limanda limanda*) from the Baie de Seine (Eastern channel). *Marine Environmental Research*, **38**(2):77–91.
- Lyche, J. L., Nourizadeh-Lillabadi, R., Almaas, C., Stavik, B., Berg, V., Skåre, J. U., Alestrøm, P. et 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.
- MacPhail, R. C., Brooks, J., Hunter, D. L., Padnos, B., Irons, T. D. et Padilla, S. (2009).** Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *NeuroToxicology*, **30**(1):52–58.
- Marey, E. J. (1894).** *Le mouvement*. G. Masson, Éditeur, Librairie de l'Académie de Médecine.
- Martin, P. R. et Bateson, P. (1993).** *Measuring behaviour: An introductory guide*. Cambridge University Press.
- Mathur, P. et Guo, S. (2010).** Use of zebrafish as a model to understand mechanisms of addiction and complex neurobehavioral phenotypes. *Neurobiology of Disease*, **40**(1):66–72.
- Mato, Y., Isobe, T., Takada, H., Kanehiro, H., Ohtake, C. et Kaminuma, T. (2001).** Plastic resin pellets as a transport medium for toxic chemicals in the marine environment. *Environmental Science & Technology*, **35**(2):318–324.
- McFarland, V. et Clarke, J. (1989).** Environmental occurrence, abundance, and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners: Considerations for a congener-specific analysis. *Environmental Health Perspectives*, **81**:225–239.
- McIntosh, B. E., Hogenesch, J. B. et Bradfield, C. A. (2010).** Mammalian Per-Arnt-Sim proteins in environmental adaptation. *Annual Review of Physiology*, **72**:625–645.

- Mendola, P., Buck, G. M., Vena, J. E., Zielezny, M. et Sever, L. E. (1995).** Consumption of PCB-contaminated sport fish and risk of spontaneous fetal death. *US Department of Health and Human Services*, **103**(5):498–502.
- Metcalfe, T. L. et Metcalfe, C. D. (1997).** The trophodynamics of PCBs, including mono- and non-ortho congeners, in the food web of North-Central Lake Ontario. *Science of The Total Environment*, **201**(3):245–272.
- Metcalfe, W. K., Myers, P. Z., Trevarrow, B., Bass, M. B. et Kimmel, C. B. (1990).** Primary neurons that express the L2/HNK-1 carbohydrate during early development in the zebrafish. *Development*, **110**(2): 491–504.
- Miklósi, A. et Andrew, R. J. (2006).** The zebrafish as a model for behavioral studies. *Zebrafish*, **3**(2):227–234.
- Millot, S. (2008).** *Domestication, sélection et comportement du bar: Variabilité des aptitudes comportementales et de la tolérance au stress de groupes génétiquement distincts de bar*, *Dicentrarchus labrax*. Thèse de doctorat, Université de La Rochelle. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6272/>.
- Miltenberger, R. G. (2006).** *Behavior modification : Principles and procedures*. Thomson Wadsworth. Éditions 4. 632 pp.
- Miyata, H., Takayama, K., Ogaki, J., Mimura, M., Kashimoto, T. et Yamada, T. (1989).** Levels of PCDDs, coplanar PCBs and PCDFs in patients with Yusho disease and in the Yusho oil. *Chemosphere*, **18**(1–6):407–416.
- Moles, A. et Norcross, B. L. (1995).** Sediment preference in juvenile pacific flatfishes. *Netherlands Journal of Sea Research*, **34**(1-3):177–182.
- Monosson, E., Ashley, J. T. F., McElroy, A. E., Woltering, D. et Elskus, A. A. (2003).** PCB congener distributions in muscle, liver and gonad of *Fundulus heteroclitus* from the lower Hudson River Estuary and Newark Bay. *Chemosphere*, **52**(4):777–787.
- Monosson, E., James Fleming, W. et Sullivan, C. V. (1994).** Effects of the planar PCB 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (TCB) on ovarian development, plasma levels of sex steroid hormones and vitellogenin, and progeny survival in the white perch (*Morone americana*). *Aquatic Toxicology*, **29**(1-2):1–19.
- Moreau, M., Arrufat, P., Latil, G. et Jeanson, R. (2011).** Use of radio-tagging to map spatial organization and social interactions in insects. *Journal of Experimental Biology*, **214**(1):17–21.
- Morin, J., Le Pape, O., Amara, R. et Mahe, Kelig, G. C. (2006).** Identification des habitats de nurseries de poissons à partir d'indicateurs faunistiques. qualité de ces habitats pour les juvéniles de soles en estuaire de seine. programme seine aval 2005. Rapport technique, Ifremer. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6594/>.
- Muir, D., Savinova, T., Savinov, V., Alexeeva, L., Potelov, V. et Svetochov, V. (2003).** Bioaccumulation of PCBs and chlorinated pesticides in seals, fishes and invertebrates from the White Sea, Russia. *The Science of The Total Environment*, **306**(1-3):111–131.
- Mukai, M., Lin, T. M., Peterson, R. E., Cooke, P. S. et Tischkau, S. A. (2008).** Behavioral rhythmicity of mice lacking AhR and attenuation of light-induced phase shift by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. *Journal of Biological Rhythms*, **23**(3):200–210.
- Müller, U. K. et van Leeuwen, J. L. (2004).** Swimming of larval zebrafish: Ontogeny of body waves and implications for locomotory development. *Journal of Experimental Biology*, **207**(5):853–868.

- Munkittrick, K. R. et McCarty, L. S. (1995).** An integrated approach to aquatic ecosystem health: Top-down, bottom-up or middle-out? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)*, **4**:77–90.
- Nakata, H., Shimada, H., Yoshimoto, M., Narumi, R., Akimoto, K., Yamashita, T., Matsunaga, T., Nishimura, K., Tanaka, M., Hiraki, K., Shimasaki, H. et Takikawa, K. (2008).** Concentrations and distribution of mercury and other heavy metals in surface sediments of the Yatsushiro Sea including Minamata Bay, Japan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **80**:78–84.
- Nakayama, K., Oshima, Y., Hiramatsu, K. et Honjo, T. (2004).** Alteration of general behavior of male medaka, *Oryzias latipes*, exposed to Tributyltin and/or Polychlorinated Biphenyls. *Journal of Faculty of Agriculture, Kyushu University*, **49**:85–92.
- Nakayama, K., Oshima, Y., Hiramatsu, K., Shimasaki, Y. et Honjo, T. (2005a).** 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. et Honjo, T. (2005b).** 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. et Oshima, Y. (2011).** Effects of polychlorinated biphenyls on liver function and sexual characteristics in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Marine Pollution Bulletin*, **63**(5-12):366–359.
- Nfon, E. et 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.
- Ninkovic, J. et Bally-Cuif, L. (2006).** The zebrafish as a model system for assessing the reinforcing properties of drugs of abuse. *Methods*, **39**(3):262–274.
- Noldus, L. (1991).** The Observer: A software system for collection and analysis of observational data. *Behavior Research Methods*, **23**(3):415–429.
- Noldus, L., Spink, A. et Tegelenbosch, R. (2001).** EthoVision: A versatile video tracking system for automation of behavioral experiments. *Behavior Research Methods*, **33**(3):398–414.
- Noldus, L., Trienes, R., Hendriksen, A., Jansen, H. et Jansen, R. (2000).** The Observer Video-Pro: New software for the collection, management, and presentation of time-structured data from videotapes and digital media files. *Behavior Research Methods*, **32**(1):197–206.
- Norton, W. et Bally-Cuif, L. (2010).** Adult zebrafish as a model organism for behavioural genetics. *BMC Neuroscience*, **11**(1):90.
- Nyman, M., Koistinen, J., Fant, M. L., Vartiainen, T. et 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.
- Ogata, Y., Takada, H., Mizukawa, K., Hirai, H., Iwasa, S., Endo, S., Mato, Y., Saha, M., Okuda, K., Nakashima, A., Murakami, M., Zurcher, N., Booyatumanondo, R., Zakaria, M. P., Dung, L. Q., Gordon, M., Miguez, C., Suzuki, S., Moore, C., Karapanagioti, H. K., Weerts, S., McClurg, T., Burrell, E., Smith, W., Velkenburg, M. V., Lang, J. S., Lang, R. C., Laursen, D., Danner, B., Stewardson, N. et Thompson, R. C. (2009).** International pellet watch: Global monitoring of persistent organic pollutants (POPs) in coastal waters. 1. Initial phase data on PCBs, DDTs, and HCHs. *Marine Pollution Bulletin*, **58**(10):1437–1446.
- Oliveira Ribeiro, C., Vollaire, Y., Coulet, E. et Roche, H. (2008).** Bioaccumulation of polychlorinated biphenyls in the eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve – France. *Environmental Pollution*, **153**(2):424–431.

- Olivo, R. et Thompson, M. (1988).** Monitoring animals' movements using digitized video images. *Behavior Research Methods*, **20**(5):485–490.
- Olsson, P.-E., Westerlund, L., Teh, S. J., Billsson, K., Berg, A. H., Tysklind, M., Nilsson, J., Eriksson, L.-O. et 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.
- Örn, S., Andersson, P. L., Förllin, L., Tysklind, M. et Norrgren, L. (1998).** The impact on reproduction of an orally administered mixture of selected PCBs in zebrafish (*Danio rerio*). Volume 35. pages 52–57.
- Ottoni, E. (2000).** EthoLog 2.2: A tool for the transcription and timing of behavior observation sessions. *Behavior Research Methods*, **32**(3):446–449.
- Pando, M. P. et Sassone-Corsi, P. (2002).** Unraveling the mechanisms of the vertebrate circadian clock: Zebrafish may light the way. *BioEssays*, **24**(5):419–426.
- Parichy, D. M., Elizondo, M. R., Mills, M. G., Gordon, T. N. et Engeszer, R. E. (2009).** Normal table of postembryonic zebrafish development: Staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics*, **238**(12):2975–3015.
- Parker, N. C., Giorgi, A. E., Heidinger, R. C., Jester, D. B., Prince, E. D. et Winans, G. A. (Éditeurs) (1990).** *Fish-Marking Techniques: Proceedings of the International Symposium and Educational Workshop on Fish-Marking Techniques, held at the University of Washington, Seattle, Washington, USA, June 27-July 1, 1988.*, Volume 7, Seattle, Washington, USA.
- Parkinson, A., Robertson, L., Safe, L. et Safe, S. (1980).** Polychlorinated biphenyls as inducers of hepatic microsomal enzymes: Structure-activity rules. *Chemico-Biological Interactions*, **30**(3):271–285.
- Patterson, M. L. (1977).** Tape-recorded cuing for time-sampled observations of nonverbal behavior. *Journal of Nonverbal Behavior*, **2**(1):26–29.
- Pesonen, M., Korkalainen, M., Laitinen, J. T., Andersson, T. B. et Vakkuri, O. (2000).** 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters melatonin metabolism in fish hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, **126**(3):227–240.
- Pillai, B. R., Sahoo, L., Mahapatra, K. D., Ponzoni, R., Sahu, S., Mohanty, S., Vijaykumar et Sahu, S. (2009).** Evaluation of the new fluorescent internal tag (soft visible implant alphanumeric tag) in the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, **61**(4):345–350.
- Pinto, B., Garritano, S., Cristofani, R., Ortaggi, G., Giuliano, A., Amodio-Cocchieri, R., Cirillo, T., De Giusti, M., Boccia, A. et Reali, D. (2008).** Monitoring of polychlorinated biphenyl contamination and estrogenic activity in water, commercial feed and farmed seafood. *Environmental Monitoring and Assessment*, **144**(1):445–453.
- Pompa, G., Caloni, F. et Fracchiolla, M. (2003).** Dioxin and PCB contamination of fish and shellfish: Assessment of human exposure. Review of the international situation. *Veterinary Research Communications*, **27**:159–167.
- Postlethwait, J. H., Johnson, S. L., Midson, C. N., Talbot, W. S., Gates, M., Ballinger, E. W., Africa, D., Andrews, R., Carl, T., Eisen, J. S., Horn, S., Kimmel, C. B., Hutchinson, M., Johnson, M. et Rodriguez, A. (1994).** A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, **264**(5159):699–703.
- Prentice, E. F., Flagg, T. A. et McCutcheon, C. S. (1990).** Feasibility of using implantable passive integrated transponder (PIT) tags in salmonids. *American Fisheries Society Symposium*, **7**:317–322.
- Prober, D. A., Rihel, J., Onah, A. A., Sung, R.-J. et Schier, A. F. (2006).** Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish. *Journal of Neuroscience*, **26**(51):13400–13410.

- Quabius, E. S., Balm, P. H. M. et Wendelaar Bonga, S. E. (1997).** Interrenal stress responsiveness of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) is impaired by dietary exposure to PCB 126. *General and Comparative Endocrinology*, **108**(3):472–482.
- Ramade, F. (1977).** *Écotoxicologie*, Volume n°9 de *Collection d'écologie*. Éditions Masson, France. 205 pp.
- Ramade, F. (1992).** *Précis d'Écotoxicologie*, Volume n°22 de *Collection d'écologie*. Éditions Masson, France. 300 pp.
- Ramade, F. (2007).** *Introduction à l'écotoxicologie – Fondements et applications*. Éditions TEC & DOC – Lavoisier, France. 638 pp.
- Reig, L., Duarte, S., Valero, J. et Oca, J. (2010).** Preference of cultured sole (*Solea senegalensis*) for different substrates differing in material, texture and colour. *Aquacultural Engineering*, **42**(2):82–89.
- Rice, C., O'Keefe, P. et Kubiak, T. (2002).** Sources, pathways, and effects of PCBs, dioxins, and dibenzofurans. In Hoffman, D. J., Rattner, B. A., Burton, Jr., G. A. et Cairns, Jr., J. (Éditeurs): *Handbook of Ecotoxicology, Second Edition*. CRC Press, Chapitre 18, pages 502–573.
- Rice, D. C. (2000).** Parallels between attention deficit hyperactivity disorder and behavioral deficits produced by neurotoxic exposure in monkeys. *Environmental Health Perspective*, **108 Suppl 3**:405–408.
- Richards, R. J. (1979).** Influence of sensationalist tradition on early theories of the evolution of behavior. *Journal of the History of Ideas*, **40**(1):85–105.
- Rihel, J., Prober, D. A., Arvanites, A., Lam, K., Zimmerman, S., Jang, S., Haggarty, S. J., Kokel, D., Rubin, L. L., Peterson, R. T. et Schier, A. F. (2010).** Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science*, **327**(5963):348–351.
- Rijnsdorp, A., Van Beek, F., Flatman, S., Millner, R., Riley, J., Giret, M. et De Clerck, R. (1992).** Recruitment of sole stocks, *Solea solea* (L.), in the Northeast Atlantic. *Netherlands Journal of Sea Research*, **29**(1-3):173–192.
- Rogers, S. (1992).** Environmental factors affecting the distribution of sole (*Solea solea* (L.)) within a nursery area. *Netherlands Journal of Sea Research*, **29**(1-3):153–161.
- Rosemberg, D. B., Rico, E. P., Mussulini, B. H. M., Piato, A. L., Calcagnotto, M. E., Bonan, C. D., Dias, R. D., Blaser, R. E., Souza, D. O. et de Oliveira, D. L. (2011).** Differences in spatio-temporal behavior of zebrafish in the open tank paradigm after a short-period confinement into dark and bright environments. *PLoS ONE*, **6**(5):e19397.
- Rubinstein, A. L. (2003).** Zebrafish: from disease modeling to drug discovery. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, **6**(2):218–223.
- Rudell, A. (1979).** The television camera used to measure movement. *Behavior Research Methods*, **11**(3):339–341.
- Ruusuvirta, T., Korhonen, T. et Arikoski, J. (1996).** A simple windows program for coding fast-changing events in observational situations divided into variable intervals. *Behavior Research Methods*, **28**(3):470–471.
- Sackerman, J., Donegan, J. J., Cunningham, C. S., Nguyen, N. N., Lawless, K., Long, A., Benno, R. H. et Gould, G. G. (2010).** Zebrafish behavior in novel environments: Effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. *Journal of Comparative Psychology*, **23**:43–61.
- Safe, S. (1993).** Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: Progress and problems. *Environmental Health Perspectives*, **100**:259–268.

- Safe, S. (2005).** Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, **16**(4):139–144.
- Sagiv, S. K., Thurston, S. W., Bellinger, D. C., Tolbert, P. E., Altshul, L. M. et Korrick, S. A. (2010).** Prenatal organochlorine exposure and behaviors associated with attention deficit hyperactivity disorder in school-aged children. *American Journal of Epidemiology*, **171**(5):593–601.
- Sazonova, N. A., Dasbanerjee, T., Middleton, F. A., Gowtham, S., Schuckers, S. et Faraone, S. V. (2011).** Transcriptome-wide gene expression in a rat model of attention deficit hyperactivity disorder symptoms: Rats developmentally exposed to polychlorinated biphenyls. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics*, **156**(8):898–912.
- Schafer, H. A., Hershelman, G. P., Young, D. R. et Mearns, A. J. (1982).** Contaminants in ocean food webs. In Bascom, W. (Éditeur) : *Southern California Coastal Water Research Project Biennial Report 1981–1982*. Southern California Coastal Water Research Project, Long Beach, CA, Chapitre 2, pages 17–28.
- Schell, L. M. et Gallo, M. V. (2010).** Relationships of putative endocrine disruptors to human sexual maturation and thyroid activity in youth. *Physiology & Behavior*, **99**(2):246–253.
- Schell, L. M., Gallo, M. V., Denham, M., Ravenscroft, J., DeCaprio, A. P. et Carpenter, D. O. (2008).** Relationship of thyroid hormone levels to levels of polychlorinated biphenyls, lead, *p,p'*-dde, and other toxicants in Akwesasne Mohawk youth. *Environmental Health Perspective*, **116**(6).
- Scherer, E. (1992).** Behavioural responses as indicators of environmental alterations: Approaches, results, developments. *Journal of Applied Ichthyology*, **8**(1-4):122–131.
- Schmidt, K., Staaks, G. B. O., Pflugmacher, S. et 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.
- Schwartz, P. M., Jacobson, S. W., Fein, G., Jacobson, J. L. et Price, H. A. (1983).** Lake michigan fish consumption as a source of polychlorinated biphenyls in human cord serum, maternal serum, and milk. *American Journal of Public Health*, **73**(3):293–296.
- Scott, G. R. et Sloman, K. A. (2004).** The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aquatic Toxicology*, **68**(4):369–392.
- Serra, E., Medalha, C. et Mattioli, R. (1999).** Natural preference of zebrafish (*Danio rerio*) for a dark environment. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **32**:1551–1553.
- Shimba, S. et Watabe, Y. (2009).** Crosstalk between the ahr signaling pathway and circadian rhythm. *Biochemical Pharmacology*, **77**(4):560–565.
- Shimoda, N., Knapik, E. W., Ziniti, J., Sim, C., Yamada, E., Kaplan, S., Jackson, D., de Sauvage, F., Jacob, H. et Fishman, M. C. (1999).** Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics*, **58**(3):219–232.
- Shiraishi, Y. (1975).** Cytogenetic studies in 12 patients with Itai-itai disease. *Human Genetics*, **27**:31–44.
- Sire, J.-Y., Girondot, M. et Babiari, O. (2000).** Marking zebrafish, *Danio rerio* (cyprinidae), using scale regeneration. *Journal of Experimental Zoology*, **286**(3):297–304.
- Sison, M. et Gerlai, R. (2010).** Associative learning in zebrafish (*Danio rerio*) in the plus maze. *Behavioural Brain Research*, **207**(1):99–104.
- Slobodkin, L. B. et Rapoport, A. (1974).** An optimal strategy of evolution. *The Quarterly Review of Biology*, **49**(3):181–200.

- Sloman, K. A. et Wilson, R. W. (2005).** Anthropogenic impacts upon behaviour and physiology. In Katherine A. Sloman, R. W. W. et Balshine, S. (Éditeurs): *Behaviour and Physiology of Fish*, Volume 24 de *Fish Physiology*. Academic Press, Chapitre 10, pages 413–468.
- Spence, R. (2011).** Zebrafish ecology and behaviour. In Kalueff, A. V. et Cachat, J. M. (Éditeurs): *Zebrafish Models in Neurobehavioral Research*, Volume 52 de *Neuromethods*. Humana Press, Chapitre 1, pages 1–46.
- Spence, R., Fatema, M. K., Reichard, M., Huq, K. A., Wahab, M. A., Ahmed, Z. F. et Smith, C. (2006).** The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh. *Journal of Fish Biology*, **69**(5):1435–1448.
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C. et Smith, C. (2008).** The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological Reviews*, **83**(1):13–34.
- Spitsbergen, J. M. et 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**(1):62–87.
- Spitzen, J., Spoor, C. W., Kranenbarg, S., Beeuwkes, J., Grieco, F. Noldus, L. P. J. J., van Leeuwen, J. L. et Takken, W. (2008).** Track3D: Visualization and flight track analysis of *Anopheles gambiae* s.s. mosquitoes. In Spink, A. J., Ballintijn, M. R., Bogers, N. D., Grieco, F., Loijens, L. W. S., Noldus, L. P. J. J., Smit, G. et Zimmerman, P. H. (Éditeurs): *Proceedings of Measuring Behavior*, Maastricht, The Netherlands. 6th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral Research.
- Steenbergen, P. J., Richardson, M. K. et Champagne, D. L. (2011).** The use of the zebrafish model in stress research. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, **35**(6):1432–1451.
- Stephenson, J. F., Whitlock, K. E. et Partridge, J. C. (2011).** Zebrafish preference for light or dark is dependent on ambient light levels and olfactory stimulation. *Zebrafish*, **8**(1):17–22.
- Stewart, A., Cachat, J., Wong, K., Gaikwad, S., Gilder, T., DiLeo, J., Chang, K., Utterback, E. et Kalueff, A. V. (2010).** Homebase behavior of zebrafish in novelty-based paradigms. *Behavioural Processes*, **85**(2):198–203.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H. et Braunbeck, T. (in press).** Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments – A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology*.
- Suzuki, K., Takagi, T. et Hiraishi, T. (2003).** Video analysis of fish schooling behavior in finite space using a mathematical model. *Fisheries Research*, **60**(1):3–10.
- Takasuga, T., Senthilkumar, K., Matsumura, T., Shiozaki, K. et Sakai, S.-i. (2006).** Isotope dilution analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs) in transformer oil and global commercial PCB formulations by high resolution gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *Chemosphere*, **62**(3):469–484.
- Tang-Péronard, J. L., Andersen, H. R., Jensen, T. K. et Heitmann, B. L. (2011).** Endocrine-disrupting chemicals and obesity development in humans: A review. *Obesity Reviews*, **12**(8):622–636.
- Tapp, J. et Walden, T. (1993).** PROCODER: A professional tape control, coding, and analysis system for behavioral research using videotape. *Behavior Research Methods*, **25**(1):53–56.
- Tapp, J., Wehby, J. et Ellis, D. (1995).** A multiple option observation system for experimental studies: MOOSES. *Behavior Research Methods*, **27**(1):25–31.
- The Environmental Pollution Panel President’s Science Advisory Committee, P. S. A. C. (1965).** Restoring our environment. Rapport technique, The White House.

- Tinbergen, N. (1951).** *The study of instinct.* Oxford: Clarendon. 228.
- Tinbergen, N. (1963).** On aims and methods of ethology. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, **20**:410–433.
- Tischkau, S. A., Jaeger, C. D. et Krager, S. L. (2011).** Circadian clock disruption in the mouse ovary in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology Letters*, **201**(2):116–122.
- Triebskorn, R., Köhler, H.-R., Honnen, W., Schramm, M., Adams, S. M. et Müller, E. F. (1997).** Induction of heat shock proteins, changes in liver ultrastructure, and alterations of fish behavior: Are these biomarkers related and are they useful to reflect the state of pollution in the field? *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery (Formerly Journal of Aquatic Ecosystem Health)*, **6**(1):57–73.
- TSCA (1976).** Toxic substances control act. <http://frwebgate.access.gpo.gov/cgi-bin/usc.cgi?ACTION=BROWSE&TITLE=15USCC53>.
- Turyk, M., Anderson, H. A., Hanrahan, L. P., Falk, C., Steenport, D. N., Needham, L. L., Patterson, Jr., D. G., Freels, S. et Persky, V. (2006).** Relationship of serum levels of individual PCB, dioxin, and furan congeners and DDE with Great Lakes sport-caught fish consumption. *Environmental Research*, **100**(2):173–183.
- Ulbrich, B. et Stahlmann, R. (2004).** Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): A systematic review of experimental data. *Archives of Toxicology*, **78**(5):252–268.
- UNECE (adopted 25 June 1998).** Aarhus Convention (Convention on Access to Information, Public Participation in Decision-making and Access to Justice in Environmental Matters). <http://www.unece.org/env/pp>.
- Unwin, D. M. et Martin, P. (1987).** Recording behaviour using a portable microcomputer. *Behaviour*, **101**(1/3):87–100.
- Van den Berg, M., Birnbaum, L. S., Denison, M., De Vito, M., Farland, W., Feeley, M., Fiedler, H., Hakansson, H., Hanberg, A., Haws, L., Rose, M., Safe, S., Schrenk, D., Tohyama, C., Tritscher, A., Tuomisto, J., Tysklind, M., Walker, N. et Peterson, R. E. (2006).** The 2005 world health organization reevaluation of human and mammalian toxic equivalency factors for Dioxins and Dioxin-like compounds. *Toxicological Sciences*, **93**(2):223–241.
- van der Oost, R., Beyer, J. et Vermeulen, N. P. E. (2003).** Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**(2):57–149.
- Vitalone, A., Catalani, A., Chiodi, V., Cinque, C., Fattori, V., Goldoni, M., Matteucci, P., Poli, D., Zuena, A. R. et Costa, L. G. (2008).** Neurobehavioral assessment of rats exposed to low doses of PCB126 and methyl mercury during development. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **25**(1): 103–113.
- Vitalone, A., Catalani, A., Cinque, C., Fattori, V., Matteucci, P., Zuena, A. R. et Costa, L. G. (2010).** Long-term effects of developmental exposure to low doses of PCB 126 and methylmercury. *Toxicology Letters*, **197**(1):38–45.
- Waldichuk, M. (1978).** Effects of environmental contaminants. In *Global Marine Pollution: An Overview*, Intergovernmental Oceanographic Commission technical series. UNESCO, Chapitre 4, pages 14–17.
- Ward, A., Axford, S. et Krause, J. (2002).** Mixed-species shoaling in fish: The sensory mechanisms and costs of shoal choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **52**(3):182–187.
- Watkins, J., Miklósi, A. et Andrew, R. J. (2004).** Early asymmetries in the behaviour of zebrafish larvae. *Behavioural Brain Research*, **151**(1-2):177–183.
- Weintraub, M. et Birnbaum, L. S. (2008).** Catfish consumption as a contributor to elevated PCB levels in a non-Hispanic black subpopulation. *Environmental Research*, **107**(3):412–417.

- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H. et 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. et 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.
- Wheeler, W. M. (1902). ‘Natural history,’ ‘Ecology’ or ‘Ethology’? *Science*, **15**(390):971–976.
- Whitlock, K. E. et Westerfield, M. (2000). The olfactory placodes of the zebrafish form by convergence of cellular fields at the edge of the neural plate. *Development*, **127**(17):3645–3653.
- Winneke, G., Bucholski, A., Heinzow, B., Krämer, U., Schmidt, E., Walkowiak, J., Wiener, J.-A. et Steingrüber, H.-J. (1998). Developmental neurotoxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): Cognitive and psychomotor functions in 7-month old children. *Toxicology Letters*, **102-103**:423–428.
- Winter, J. (1983). Underwater biotelemetry. In *Fisheries Techniques*. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, U.S.A., pages 371–395–.
- Winter, M. J., Redfern, W., Hayfield, A., Owen, S., Valentin, J. et Hutchinson, T. (2008a). Zebrafish embryo-larval locomotion as a frontloaded screen for assessing seizure liability during early drug discovery. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **58**(2):169–169.
- Winter, M. J., Redfern, W. S., Hayfield, A. J., Owen, S. F., Valentin, J.-P. et Hutchinson, T. H. (2008b). Validation of a larval zebrafish locomotor assay for assessing the seizure liability of early-stage development drugs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, **57**(3):176–187.
- Wolpert, L., Beddington, R., Brockes, J., Jessell, T., Lawrence, P. et Meyerowitz, E. (1997). *Principles of Development*. Oxford University Press. 504 pp.
- Xu, C. et Zon, L. I. (2010). The zebrafish as a model for human disease. In Steve F. Perry, Marc Ekker, A. P. F. et Brauner, C. J. (Éditeurs): *Zebrafish*, Volume 29 de *Fish Physiology*. Academic Press, Chapitre 9, pages 345–365.
- Yliff, M. et Poncin, P. (2003). Quantifying spontaneous swimming activity in fish with a computerized color video tracking system, a laboratory device using last imaging techniques. *Fish Physiology and Biochemistry*, **28**:281–282.
- Yokogawa, T., Marin, W., Faraco, J., Pézeron, G., Appelbaum, L., Zhang, J., Rosa, F., Mourrain, P. et Mignot, E. (2007). Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants. *PLoS Biology*, **5**(10):e277.
- Yoshida, F. (2007). Environmental restoration of minamata: new thinking brings new advances. *Sustainability Science*, **2**:85–93.
- Zar, J. H. (1999). *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall. New Jersey. 663 pp.
- Zeddies, D. G. et Fay, R. R. (2005). Development of the acoustically evoked behavioral response in zebrafish to pure tones. *Journal of Experimental Biology*, **208**(7):1363–1372.
- Zellner, D., Padnos, B., Hunter, D., MacPhail, R. et Padilla, S. (in press). Rearing conditions differentially affect the locomotor behavior of larval zebrafish, but not their response to valproate-induced developmental neurotoxicity. *Neurotoxicology and Teratology*.
- Zhdanova, I. V. (2006). Sleep in zebrafish. *Zebrafish*, **3**(2):215–226.

Zimmer, K. E., Gutleb, A. C., Lyche, J. L., Dahl, E., Oskam, I. C., Krogenaes, A., Skaare, J. U. et Ropstad, E. (2009). Altered stress-induced cortisol levels in goats exposed to polychlorinated biphenyls (PCB 126 and PCB 153) during fetal and postnatal development. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **72**(3-4):164–172.

Zon, L. I. et Peterson, R. T. (2005). *In vivo* drug discovery in the zebrafish. *Nature Reviews Drug Discovery*, **4**(1):35–44.

The background features a series of thin, light-colored wavy lines that create a sense of movement and depth. These lines are arranged in a pattern that resembles a series of overlapping, slightly curved bands, giving the overall design a modern and organic feel.

Annexes

Annexe A – Figure originale Slobodkin et Rapoport (1974)

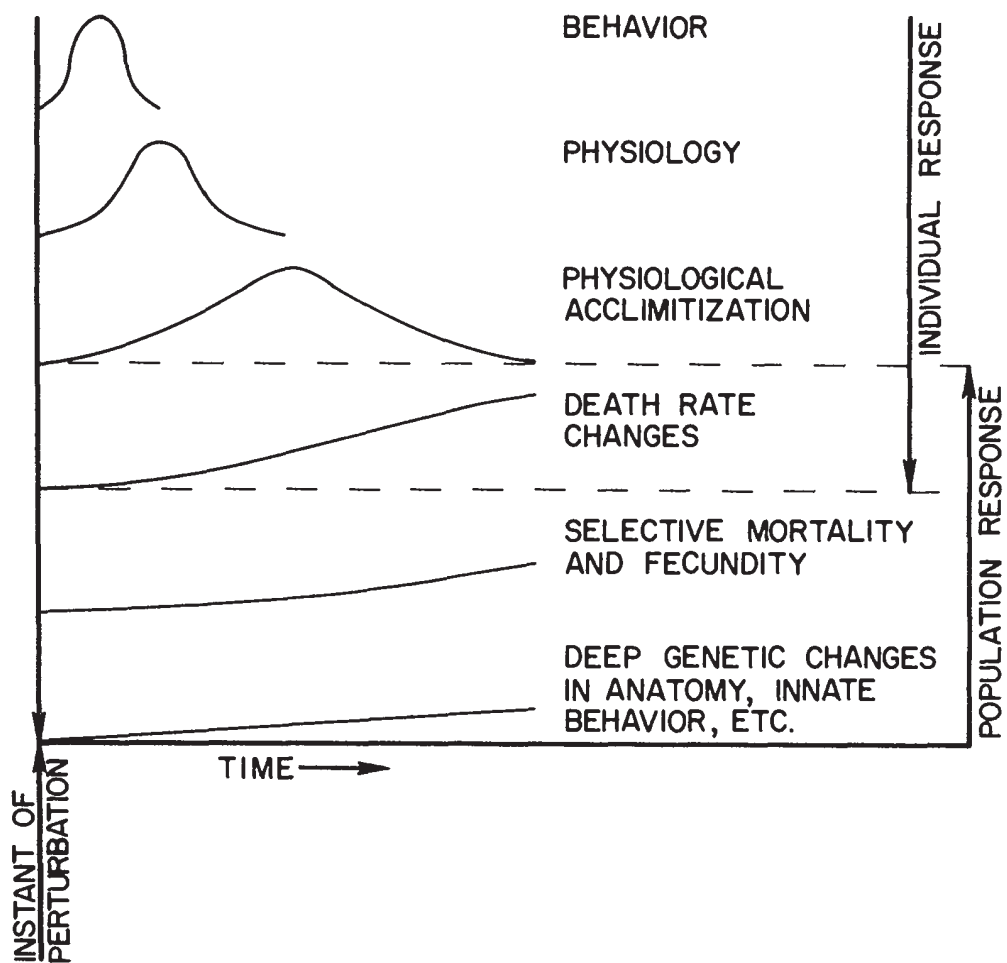




FIGURE 65 – Représentation schématique et simplifiée des événements suivant une perturbation environnementale (Slobodkin et Rapoport, 1974).

Annexe B – Poster International Flatfish Symposium 2011



Ifremer






Cefas

IMPACTS OF TAGGING ON THE COMMON SOLE, *SOLEA SOLEA* L.

Ewan Hunter¹, Samuel Péan² & Marie-Laure Bégout²

¹Cefas, Pakefield Road, Lowestoft, Suffolk, NR33 0HT, United Kingdom
²IFREMER, Place Gaby Coll, BP 07, 17137 L' Houmeau, France

Introduction

1. Tagging studies are often interpreted either ignoring tag effects, or assuming that the tags deployed do not affect the survival, growth or behaviour of the tagged fish. Here the common sole, *Solea solea* L., is used as a model to experimentally examine the impacts of tagging using electronic data storage tags (DSTs).

Methods

2. We followed the growth and physical stature of wild-caught and aquaculture-reared sole maintained under common-garden conditions in tanks. Sole tagged with PIT-tags only ("controls") were compared with individuals tagged either internally (intracoelomically) (Fig.1) or externally with "dummy" Cefas G5 DSTs over a period of 4 months.

3. Approximately 0, 1 and 2 months after tagging, each individual was transferred to a 0.8 m² featureless arena, and was filmed over 23 h (Fig.2). Behaviour during this time was analysed using Ethovision X.T. 7.0 (Noldus, The Netherlands) behaviour analysis software and HeatMap from stack ImageJ plugin (source samuelpean.com).




Fig.2

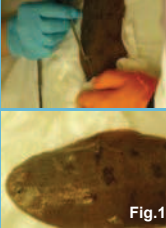


Fig.1

Results

4. Internal tagging required selection of larger fish (Fig.3, aquaculture derived fish denoted by dashed line). Our "controls" therefore were not true controls, but were the smallest fish with poor condition, which did not survive beyond the second filming (Feb/Mar 2010). A second group of fresh controls were filmed in May 2010 (Fig.4, upper right hand panel).




Figure 3 growth (first column) and **Figure 4** activity of control, external and internally tagged sole, at time of capture (C, Fig 3 only), immediately after tagging (T) and 1 and 2 months after. Black bar indicates hours of darkness.

5. The results demonstrate no clear immediate or long-term behavioural impacts of tagging on sole (Fig.4). High levels of mortality (control fish in particular) made it difficult to discriminate differences between treatments and a seasonal trend for increased activity, confirmed by the results from a second control group (Fig.4). All groups exhibited high levels of thigmotaxy (Fig.5), with fish remaining in close proximity to the tank perimeter during day and night (Fig.6). Daytime levels of thigmotaxy did however decline during the final filming session.

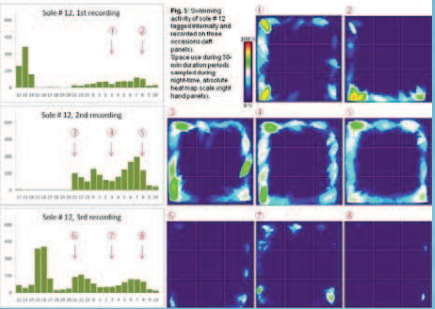


Fig.5: Tracking activity of sole #12 (tagged externally and recorded on three occasions - left panels). Spine axis during 50 min duration periods (sampled during night-time, absolute heatmap scale right hand panels).

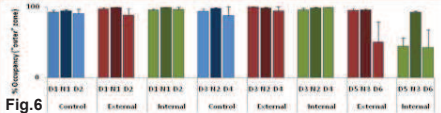


Fig.6

Conclusions

6. The wild-caught sole used here experienced high levels of mortality over the time course of the experiment as a result of both pathogen and parasite infections. However externally and internally tagged fish were no more vulnerable than sole tagged only with PIT tags. As internal tagging resulted in no clear detrimental physical or behavioural impact, we conclude that intra-peritoneal tagging is an appropriate technique for studying the behaviour of wild and cultured free-swimming sole.



Acknowledgments : This work was funded by the Department for Environment, Food and Rural Affairs (UK) and l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer and Région Poitou-Charentes (France). We wish to thank Sébastien Ferrari and Xavier Cousin for their help with data treatment.



FIGURE 66 – Poster présenté au congrès International Flatfish Symposium en 2011.

Annexe C – Fiche technique Nonatec

LUTRONIC INTERNATIONAL

TECHNICAL FEATURES

GENERAL

- Size: 1mm dia * 6 mm long
- Weight: 7,15 mg
- Operating frequency: 13,56 MHz
- Needle diameter: 18 G (1,2 mm)

PERFORMANCES

- Smallest biocompatible transponder worldwide (patented technology),
- Automatic recognition
- Memory: 512 bits
- Rewriting: to 10 000 times

SECURITY

- Unique and Universal Identification Number
- Non traumatic injection

ENVIRONMENTAL

- Biocompatible glass tube
- Chemical resistance:
 - Water immersion IP68: 20°C, 24h under 1m
 - Alcohol, ammoniac... immersion: 20°C, 100h
- Mechanical robustness:
 - vibration IEC 68.2.6: 6g, 14... 200Hz, 3 axis, 8H per axis
 - Shock: IEC 68.2.27: 30g, 18ms, 3 axis, 1084 times per axis
- Thermal characteristics:
 - Storage temperature -40°C to + 90°C (+ 120°C for total 100 hours)
 - Operating temperature: -40°C to 85°C



LUTRONIC

INTERNATIONAL

For USA please contact:
Mr Eric GUERVIN
North America Sales Manager
salesusa@nonatec.net

For Europe please contact:
Mr Ken TURRELL
European Sales Manager
ken.turrell@lutronic.eu

or please contact:
M. Mathieu RATARD
mathieu.ratard@lutronic.eu

www.nonatec.net

FIGURE 67 – Fiche technique de micro-tags RFID de la marque Nonatec utilisés pour le marquage individuel des poissons zèbre et des soles communes.

Annexe D – Système de couleur Munsell

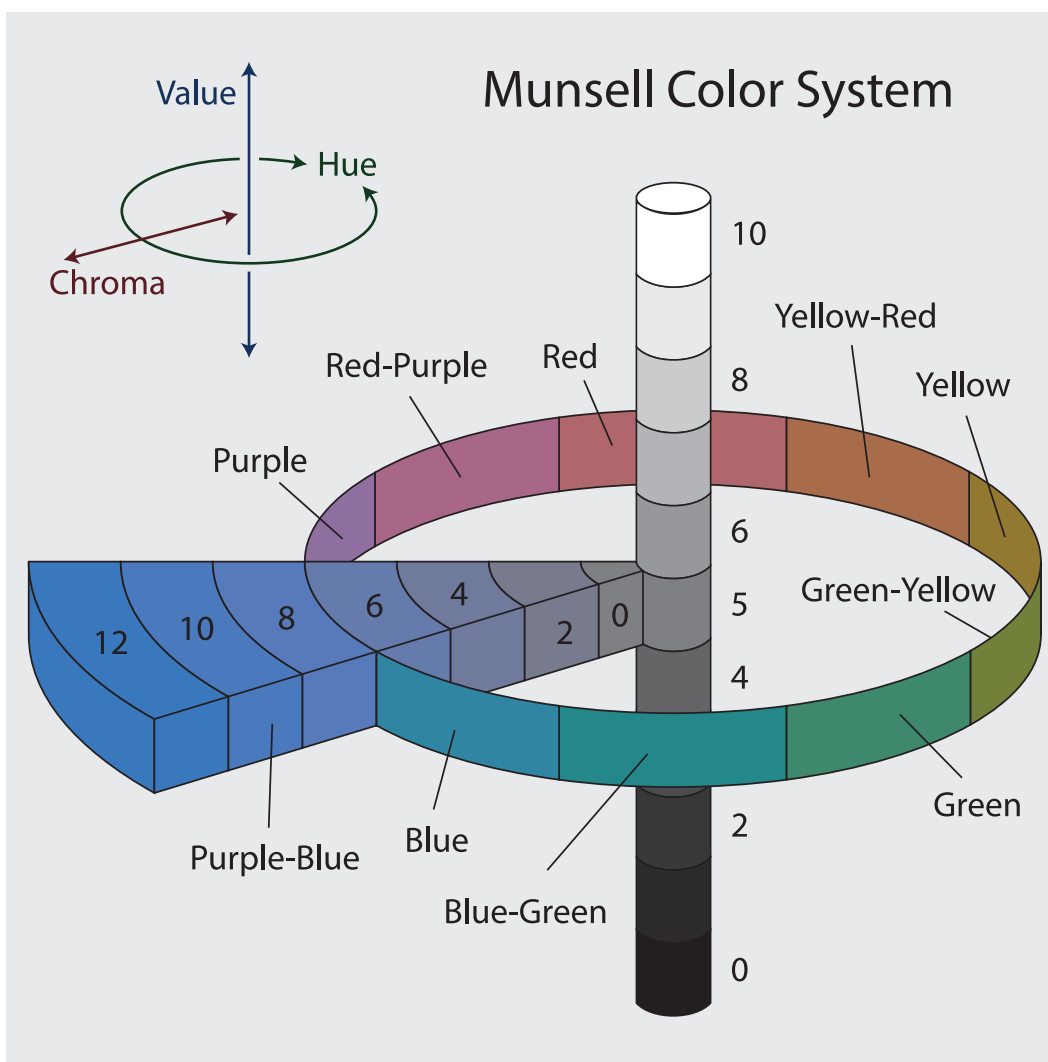


FIGURE 68 – Système de couleur Munsell. L'axe vertical représente la luminosité (*Value*), le cercle représente la nuance (*Hue*) et le plan horizontal représente la pureté de la couleur (*Chroma*). Source : Wikimedia Commons [Wikimedia Commons – Jacob Rus](#) .

Annexe E – Détail des dosages chimiques de PCB dans les muscles de soles après 30 et 60 jours de contamination

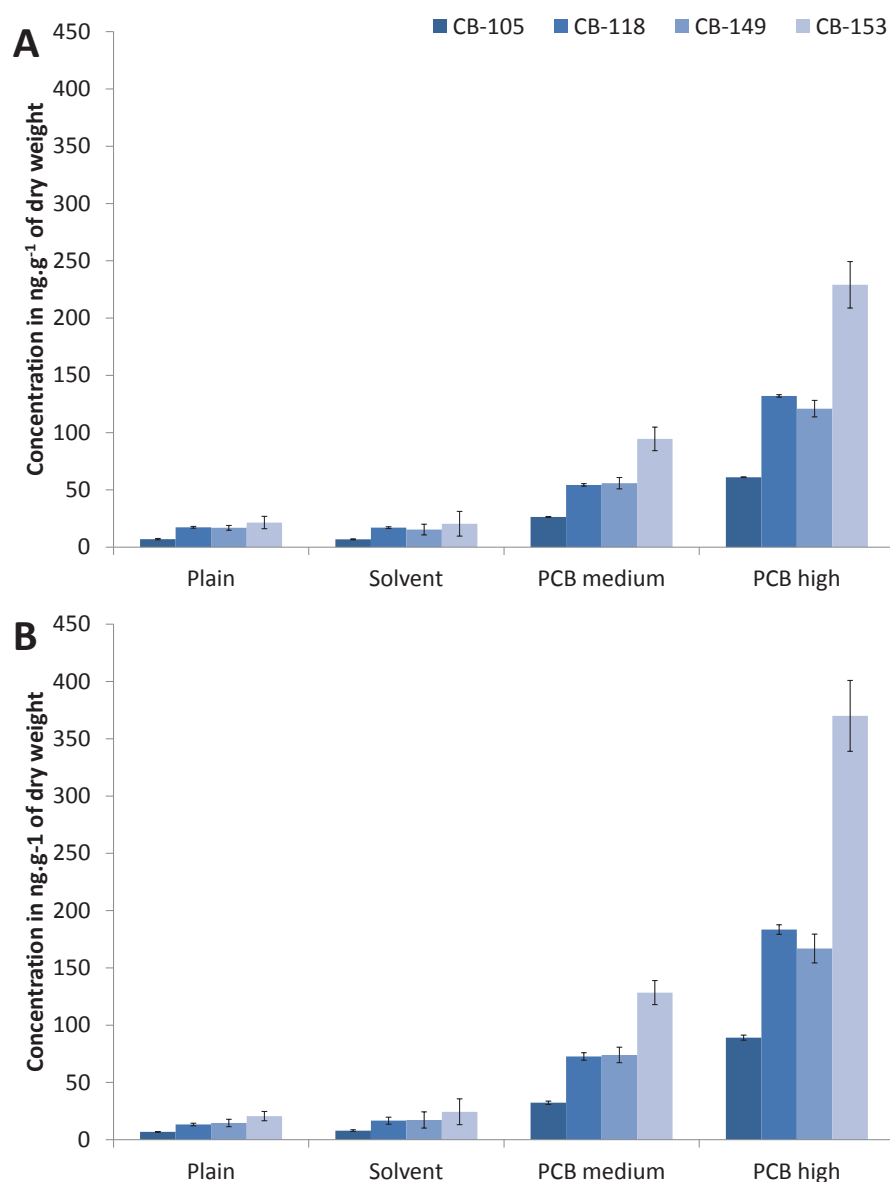


FIGURE 69 – Détail des dosages chimiques de PCB dans les muscles de soles après 30 et 60 j de contamination. **A** : Dosage après 30 j ; **B** : Dosage après 60 j.

Annexe F – Publications et actes de congrès

Publications

Benhaïm D., Bégout M.-L., **Péan S.**, Manca M., Prunet P., Chatain B. (In preparation). Impact of plant-based diet on behavioural and physiological traits in sea bass (*Dicentrarchus labrax*).

Cousin X., Daouk T., **Péan S.**, Lyphout L., Schwartz, M.-É., Bégout M.-L. (Submitted). Electronic individual identification of zebrafish using RFID tags. *Nature Methods*.

Péan S., Daouk T., Lyphout L., Leguay D., Loizeau V., Cousin X., Bégout M.-L. (Submitted). Long-term food-exposure to PCB mixtures induces behavioural disruptions in zebrafish. *Aquatic Toxicology*.

Benhaïm D., **Péan S.**, Lucas G., Blanc N., Chatain B., Bégout M.-L. (Submitted). Behavioural responses in wild caught and domesticated juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) : captivity and aging interplay. *Animal Behaviour*.

Benhaïm D., Bégout M.-L., **Péan S.**, Brisset B., Leguay D., Chatain B. (2012). Effect of fasting on self-feeding activity in juvenile Sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Applied Animal Behaviour*, Volume 136, Issue 1, 15 January 2012, Pages 63-73.

Benhaïm D., **Péan S.**, Brisset B., Leguay D., Bégout M.-L., Chatain B. (2011). Effect of size grading on Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles self-feeding behaviour, social structure and culture performances. *Aquatic Living Resources*, Volume 24, Issue 04, October 2011, Pages 391-402.

Millot S., **Péan S.**, Chatain B., Bégout M.-L. (2011). Self-feeding behaviour changes induced by a first and a second generation of domestication or selection for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquatic Living Resources*, Volume 24, Issue 01, January 2011, Pages 53-61.

Millot S., **Péan S.**, Leguay D., Vergnet A., Chatain B., Bégout M.-L. (2010). Evaluation of behavioral changes induced by a first step of domestication or selection for growth in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) : A self-feeding approach under repeated acute stress. *Aquaculture*, Volume 306, Issues 1-4, 15 August 2010, Pages 211-217.

Communications orales

Péan S., Daouk T., Vignet C., Loizeau V., Cousin X., Bégout M.-L. (2012). Long-term food-exposure to PCB mixtures induces behavioural disruptions in adult zebrafish

and their offspring. Annual Symposium of the Fisheries Society of the British Isles, Norwich, United Kingdom – July 9-13, 2012.

Péan S., Daouk T., Besson M., Loizeau V., Cousin X., Bégout M.-L. (2010). Effects of PCBs on zebrafish behaviour. 9th International Congress on the Biology of Fish, Barcelona, Spain – July 5-9, 2010.

Lyphout L., **Péan S.**, Schwartz M.-É., Daouk T., Bégout M.-L., Cousin X. (2009). Individual identification of zebrafish using Nonatec RFID tags. 1st Meeting on Emerging Technologies in Zebrafish, Bilbao, Spain – November 25-26, 2009.

Millot S., **Péan S.**, Mayeras A.-L., Labbé L., Dupont-Nivet M., Bégout M.-L. (2009). Fish personality as a measure of phenotypic plasticity in rainbow trout clones. International Ethological Conference, Rennes, France – August 19-24, 2009.

Millot S., **Péan S.**, Bégout M.-L., Chatain B. (2009). Chronic and acute stress effects on feeding behaviour and growth performances of different European sea bass strain (*Dicentrarchus labrax*). Wellfish meeting, COST 867, Isafjordur, Iceland – June 15-28, 2009.

Péan S., Millot S., Bégout M.-L., Chatain B. (2009). Acute and chronic stress effects on feeding behaviour and growth performance in different strains of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Quatrièmes Rencontre de l'Ichtyologie en France, Paris, France – March 24-27, 2009.

Lefrançois C., Luna Acosta A., Millot S., **Péan S.**, Bégout M.-L., Domenici P. (2008). Swimming performance and aerobic metabolic scope in domesticated strains of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. International Congress on the Biology of Fish, Portland, USA, July 28 – August 1, 2008.

Posters

Hunter E., **Péan S.**, Bégout M.L. (2011). Impacts of tagging on the common sole, *Solea solea*. Eighth International Flatfish Symposium, IJmuiden, The Netherlands – November 5-11, 2011.

Dupont-Nivet M., Prunet P., Bégout M.-L., Pellegrini P., Khaw H.L., Millot S., **Péan S.**, Aupérin B., Valotaire C., Rolland J., Kerneis T., Goardon L., Quillet E. (2010). Genetics of adaptation in rainbow trout : A multidisciplinary approach. Aquaculture Europe, Porto, Portugal – October 5-8, 2010.

Péan S., Daouk T., Mayeras A.-L., Besson M., Loizeau V., Cousin X., Bégout M.-L. (2010). From model to fisheries species : Behavioural studies to reveal the potential effects of contaminant on fish population. ICES Annual Science Conference, Nantes, France – September 20-24, 2010.

Péan S., Daouk T., Cousin X., Bégout M.-L. (2010). A contribution from Zebrafish behavioural ecologists. EuFishBioMed meeting, COST BM0804, London, United-Kingdom – September 8-9, 2009.

Péan S., Mayeras A.-L., Loizeau V., Bégout M.-L. (2010). Effects of organic pollutants on common sole behavior. PhD Students Meeting La Rochelle, France – April 29, 2010.

Péan S., Mayeras A.-L., Loizeau V., Bégout M.-L. (2009). Do PCBs affect fish behaviour ? International Ethological Conference, Rennes, France – August 19-24, 2009.

Effets des polluants organiques persistants sur le comportement des poissons

Résumé :

Les PCB (polychlorobiphényles) sont des molécules connues pour leur longue demi-vie et leur forte liposolubilité qui conduisent à une bioaccumulation et une bioamplification dans les réseaux trophiques, menant à un potentiel risque pour les prédateurs de haut niveau tel que l'Homme. De plus, il a été démontré que leur affinité avec les composés lipidiques conduisaient à une transmission de la femelle à l'œuf chez les poissons. Dans ce contexte, et comme d'autres travaux ont déjà montré des effets des PCB sur la physiologie et le comportement d'animaux contaminés de différentes façons, nous avons observé les effets de ces molécules chez deux espèces, la sole commune et le poisson zèbre. La contamination a été réalisée via l'alimentation avec deux mélanges de PCB et deux concentrations qui correspondent à des situations environnementales, en termes de dose ou de choix et de proportion des congénères retenus. La dose la plus haute est équivalente à celle mesurée dans de la chair de mollusques en baie de Seine et la dose intermédiaire à celle mesurée en estuaire de Loire. Les soles contaminées ont montré une diminution du niveau d'activité locomoteur après 30 jours (j) de contamination et une altération des capacités cryptiques après 60 j de contamination. Les poissons zèbre contaminés ont montré une augmentation de l'activité locomotrice après 250 j de contamination. La génération issue de cette génération de poisson zèbre contaminée a elle aussi montré une augmentation de l'activité locomotrice au stade larvaire et adulte. Chez les adultes, cela s'est traduit par une diminution de l'utilisation de la zone de fond des bacs et une augmentation du nombre de transition de zones, ce qui s'explique par une perte d'inhibition comportementale. Dans les deux cas, les phénotypes comportementaux observés chez les groupes PCB sont associés à une altération de la locomotion dans le sens d'une baisse d'activité pour une espèce placide comme la sole et dans le sens de l'augmentation pour une espèce mobile comme le poisson zèbre.

Mots clés : Écotoxicologie, éthologie, PCB, *Solea solea*, *Danio rerio*, video tracking

Effects of persitent organic pollutants on fish behaviour

Abstract :

Because of their long biological half-life and high liposolubility, PCBs (polychlorinated biphenyls) are bioaccumulated and biomagnified through food chains over a wide range of trophic levels, leading to a potential risk for high trophic level predators including humans. Further, due to their binding with lipids, a demonstrated maternal transfer to eggs exists in fish. In this context, and since field analyses and experimental exposures have established links between PCBs exposure and alterations in physiology and behaviour of contaminated animals, we have examined the effects in both common sole and zebrafish species exposed through diets to two PCBs mixtures at two doses mimicking known environmental contamination levels and congener composition. The highest dose was equivalent to that found in molluscs flesh in the Seine Estuary and the intermediate dose was equivalent to that found in the Loire estuary. Contaminated soles showed a decreased locomotor activity level after 30 days (d) of contamination and altered cryptic abilities after 60 d of contamination. Contaminated zebrafish showed an increased locomotor activity level after 250 d of contamination. The offspring obtained from this contaminated generation of zebrafish showed an increase in swimming activity in larvae which was maintained in adults. In adults, this was associated with a decrease in tank bottom section occupancy and with an increase in the number of zone transition which may be due to a loosening of homebase behaviour and/or a loss of behavioural inhibition. In both cases, behavioural phenotypes observed in PCBs groups can be related to a disruption in locomotion activity towards decreased levels for a placid species like common sole and increased levels for a mobile species like zebrafish.

Keywords : Ecotoxicologie, ethology, PCB, *Solea solea*, *Danio rerio*, video tracking



IFREMER - Ressources Halieutiques de La Rochelle

Place Gaby Coll

17137 L'HOUMEAU

