



**HAL**  
open science

# Intégrité fonctionnelle chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, exposé à des concentrations sublétales d'hydrocarbures aromatiques polycycliques

Julie Lucas

## ► To cite this version:

Julie Lucas. Intégrité fonctionnelle chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, exposé à des concentrations sublétales d'hydrocarbures aromatiques polycycliques. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2013. Français. NNT : 2013LAROS422 . tel-01174980

**HAL Id: tel-01174980**

**<https://theses.hal.science/tel-01174980>**

Submitted on 10 Jul 2015

**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.



UNIVERSITÉ DE LA ROCHELLE  
ÉCOLE DOCTORALE DE LA ROCHELLE  
UMR7266 LITTORAL, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉS

---

# Intégrité fonctionnelle chez le poisson zèbre, *Danio rerio*, exposé à des concentrations sublétales d'hydrocarbures aromatiques polycycliques

---

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 19 décembre 2013

Pour l'obtention du grade de docteur de l'université de La Rochelle

Discipline : PHYSIOLOGIE, BIOLOGIE DES ORGANISMES, POPULATIONS, INTERACTIONS

Par Julie Lucas

## Composition du jury :

Jérôme Cachot, Prof., UMR EPOC - Univ. de Bordeaux	Rapporteur
Patrick Prunet, Directeur de recherche, INRA de Rennes	Rapporteur
David McKenzie, Directeur de recherche, Univ. de Montpellier II	Examineur
Pierre Miramand, Prof., LIENSs, Univ. La Rochelle	Directeur de thèse
Christel Lefrançois, MCF, LIENSs, Univ La Rochelle	Responsable scientifique





## Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>III</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE.....</b>	<b>3</b>
<b>ETAT DE L'ART .....</b>	<b>15</b>
1. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP).....	17
1.1. Les composés.....	17
1.2. Les origines des HAP.....	17
1.3. Bioaccumulation.....	21
1.4. Biotransformation .....	22
1.5. Toxicité.....	23
2. BIOENERGETIQUE .....	25
2.1. La production d'ATP.....	25
2.2. Concept de Fry .....	27
2.3. Classification des facteurs abiotiques selon Fry (1947, 1971).....	29
2.4. Effet des facteurs environnementaux sur le métabolisme aérobie.....	32
3. LE SYSTEME CARDIO-VASCULAIRE ET L'EVALUATION DU RYTHME CARDIAQUE .....	34
3.1. Anatomie cardiaque .....	34
3.2. Evaluation des performances cardiaques à travers la fréquence cardiaque .....	36
3.3. Impact des HAP sur les performances cardiaques.....	37
4. PERFORMANCES LOCOMOTRICES.....	38
4.1. La vitesse de nage critique.....	40
4.2. Le Comportement anti-prédateur.....	42
<b>CHAPITRE I : METABOLISME AEROBIE DU POISSON ZEBRE <i>DANIO RERIO</i> EXPOSE AUX HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES D'ORIGINE PYROLYTIQUE .....</b>	<b>49</b>
I.1. ABSTRACT .....	55
I.2. INTRODUCTION.....	55
I.3. MATERIALS & METHODS.....	57
I.2.1 Experimental zebrafish and eggs production.....	57
I.2.2 Protocol of food contamination.....	58
I.2.3 Protocol of zebrafish contamination .....	58
I.2.4 Respirometry.....	61
I.2.5 Experimental protocol.....	61
I.2.6 Calculations .....	62
I.3. RESULTS.....	63
I.4. DISCUSSION.....	65
I.5. CONCLUSION .....	67
<b>CHAPITRE 2 : CONTAMINATION TROPHIQUE A DES MELANGES D'HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES D'ORIGINE PYROLYTIQUE ET PETROGENIQUE : EFFETS SUR LES PERFORMANCES DE NAGE DU POISSON ZEBRE <i>DANIO RERIO</i> .....</b>	<b>69</b>
II.1. INTRODUCTION.....	75
II.2. MATERIALS & METHODS.....	77
III.2.1 General production of zebrafish .....	77
III.2.2 Protocol of food contamination.....	77
III.2.3 Protocol of zebrafish contamination .....	78
III.2.4 Aerobic metabolic scope and critical swimming speed .....	79
III.2.5 Statistical analysis .....	82
II.3. RESULTS .....	82
II.3.1 Composition of PAH mixtures.....	82

II.3.2	AMR, SMR, AMS .....	82
II.3.3	$U_{crit}$ .....	84
II.4.	DISCUSSION.....	85
II.5.	CONCLUSION.....	88
<b>CHAPITRE III : TRANSFERT PARENTAL D'UNE CONTAMINATION AUX HAP DE TYPE PYROLYTIQUE : EFFET SUR LE METABOLISME AEROBIE ET LA FREQUENCE CARDIAQUE AU STADE LARVAIRE DE POISSON ZEBRE <i>DANIO RERIO</i> .....</b>		
<b>91</b>		
III.1.	INTRODUCTION.....	97
III.2.	MATERIAL & METHODS.....	98
III.2.1	Protocol of food contamination.....	98
III.2.2	Zebrafish exposure.....	99
III.2.3	Respirometry.....	99
III.2.4	Cardiac frequency.....	102
III.2.5	Statistical analysis.....	102
III.3.	RESULTS.....	103
III.3.1	AMR, SMR, AMS.....	103
III.3.2	Cardiac frequency.....	105
III.4.	DISCUSSION.....	105
III.5.	CONCLUSION.....	107
<b>CHAPITRE 4 : IMPACT D'UNE CONTAMINATION PAR VOIE TROPHIQUE A DES HAP DE TYPE PYROLYTIQUE SUR LES PERFORMANCES DE FUITE DU POISSON ZEBRE <i>DANIO RERIO</i> .....</b>		
<b>109</b>		
IV.1.	INTRODUCTION.....	115
IV.2.	MATÉRIEL & MÉTHODES.....	116
IV.3.1	Production et maintien des poissons expérimentaux.....	116
IV.3.2	Protocole de contamination de l'aliment.....	117
IV.3.3	Contamination des poissons.....	117
IV.3.4	Réponse de fuite.....	118
IV.3.5	Analyses statistiques.....	122
IV.3.	RÉSULTATS.....	122
IV.3.1	Performances neurosensorielles.....	122
IV.3.2	Performances de manœuvrabilité.....	123
IV.3.3	Performances locomotrices.....	123
IV.4.	DISCUSSION.....	124
IV.5.	CONCLUSION.....	127
<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>		
<b>129</b>		
1.	SYNTHESE DES PRINCIPAUX RESULTATS OBTENUS.....	131
2.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	138
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>		
<b>141</b>		
<b>ANNEXES.....</b>		
<b>181</b>		
ANNEXE 1 :	EXEMPLES DE PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE HAP - EXTRAIT DE LA THESE DE VICQUELIN (2011) .....	183
ANNEXE 2 :	SHORT COMMUNICATION ACCEPTÉE DANS <i>JOURNAL OF FISH BIOLOGY</i> .....	185
ANNEXE 3 :	DOSAGES DES HAP PYROLYTIQUES ET PETROGENIQUES LOURD DANS L'ALIMENT POUR CHAQUE TRAITEMENT TESTE. D'APRES VIGNET ET AL. ( <i>SUBMITTED</i> ) .....	199
ANNEXE 4 :	TABLEAU DES DOSAGES DE METABOLITES POUR LES MELANGES DE HAP PYROLYTIQUE ET PETROGENIQUE. ....	201
ANNEXE 5 :	TABLEAU RECAPITULATIF DE VARIABLES DE REPONSE DE FUITE MESUREE CHEZ 17 ESPECES DE POISSON. D'APRES DOMENICI & BLAKE 1997 .....	203

---

# Liste des abréviations

---

A1 : Angle parcouru pendant l'étape 1

Acétyl-CoA : Acétyl-Coenzyme A

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AhR : Aryl hydrocarbon

AMR : Active Metabolic Rate

AMS : Aerobic Metabolic Scope

Ant : Anthracène

ANR CONPHYPOP : CONTamination et PHYsiologies des poissons exposés à des Polluants Organiques Persistants

ARN : Acide Ribonucléique

ATP : Adénosine Triphosphate

BaA : Benzo[a]Anthracène

BaP : Benzo[a]Pyrène

BeP : Benzo[e]Pyrène

Chrys : Chrysène

DCE : Directive Cadre Eau

DNP : Dinitrophénol

EROD : *Ethoxyrésosufurine-O-dééthylase*

F<sub>c</sub> : Fréquence cardiaque

Fluo : Fluorène

GSH : Glucathion

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

Kow : Coefficient de partage éthanol-eau

KW : Test non-paramétrique de Kruskal-Wallis

PCB : Polychlorobiphényles

Phe : Phenanthrène

POP : Polluants Organiques Persistants

Pyr : Pyrène

PY : Fraction Pyrolytique

Q<sub>c</sub> : Débit cardiaque

Directive REACH : Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals

RMR : Routine Metabolic Rate

ROS : Reactive oxygen species

SMR : Standard Metabolic Rate

TCDD : Tetrachlorodibenzo-p-dioxin

TU : Tuebingen strain

U<sub>crit</sub> : Vitesse de nage critique

U<sub>mb</sub> : Vitesse « *burst* » maximale

U<sub>mp</sub> : Vitesse prolongée maximale

U<sub>ms</sub> : Vitesse soutenue maximale

US-EPA : United States Environmental Protection Agency

V<sub>ang</sub> : Vitesse angulaire

V<sub>es</sub> : Volume d'éjection systolique

---

# Liste des Figures

---

## Introduction

**Figure 1 :** les différents types de réponses biologiques des organismes dans un environnement variable. Modifié d'après Barton (2002).

## Etat de l'art

**Figure 2.** Seize HAP classés comme prioritaires dans la liste de l'US-EPA (United States Environmental Protection Agency).

**Figure 3.** Exemple du naphthalène et de son dérivé substitué.

**Figure 4.** Représentation schématique des différentes sources de HAP ainsi que de leur transport et devenir dans l'écosystème aquatique. D'après Mc Elroy (1989)

**Figure 5.** Mécanismes cellulaires de biotransformation amenant à l'excrétion des HAP par les organismes.

**Figure 6** Représentation schématique de la voie du métabolisme aérobie (i.e. glycolyse, cycle de Krebs, phosphorylation oxydative) et anaérobie (i.e. glycolyse).

**Figure 7** Subdivisions de la capacité métabolique aérobie en trois compartiments : l'allocation énergétique vers les fonctions vitales obligatoires (i.e. taux métabolique standard), l'allocation énergétique de routine et le surplus énergétique pour les activités non-obligatoires ou discrétionnaires. Modifié d'après Lefrançois (2001).

**Figure 8.** Représentation schématique des différents taux métaboliques : AMR, SMR, AMS



**Figure 9.** Représentation schématique des effets des facteurs de contrôle (A), limitants (B) et masquants (C) sur les taux métaboliques actif et standard (AMR, SMR) ainsi que les conséquences sur la capacité métabolique aérobie.

**Figure 10.** Représentation schématique du coeur d'un poisson. La flèche bleue indique le sens de la circulation sanguine. D'après Satchel (2011).

**Figure 11.** Identification des différents types de nage soutenue, prolongée et départ rapide et vitesse de nage associée.  $U_{ms}$ = vitesse soutenue maximale,  $U_{mp}$ =vitesse prolongée maximale,  $U_{mb}$ =vitesse « *burst* » maximale. La vitesse de nage critique  $U_{crit}$  se situe au niveau de la droite orange. Repris d'après Bainbridge (1962)

**Figure 12.** Représentation schématique de la réponse de fuite d'un poisson.

**Figure 13.** Illustration des variables angulaires. (D'après Lefrançois, 2005).  $D_{S0}$  représente la ligne passant par le centre de masse et la tête du poisson à  $t_0$  (i.e. au moment de la stimulation),  $D_{S1}$  la ligne passant par le centre de masse et la tête du poisson à la fin du *stage 1* (i.e. à  $ts_1$ ),  $A_1$  : angle parcouru pendant le *stage 1*.

## **Chapitre I**

**Figure I.1.** Active metabolic rate (AMR, A), standard metabolic rate (SMR, B) and aerobic metabolic scope (AMS, C) of zebrafish *Danio rerio* exposed to one of the following treatments: control, 0.3X, 1X and 3X . The environmental reference concentration X is 5.5  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  of dry food (Table I.1). On each graph, aerobic metabolic rate was estimated at different life stages: juveniles ( $\square$ ) and adults ( $\blacksquare$ ), both of the first generation  $F_0$ , and juveniles ( $\blacksquare$ ) of the second generation  $F_1$ .

## **Chapitre II**

**Figure II.1.** Standard metabolic rate (SMR), active metabolic rate (AMR) and aerobic metabolic scope (AMS) of zebrafish *Danio rerio* exposed to food containing solvent (in

white), pyrolytic (A) or petrogenic (B) PAHs (in grey). PAH concentrations in food was 3X; the environmental reference concentrations corresponding to  $X_{py}=18151\pm4983\mu\text{g.g}^{-1}$  and  $X_{pe}=14317\pm8\mu\text{g.g}^{-1}$  of dry food (Annex 3). Aerobic metabolic rate was estimated at two life stages: juvenile and adults both of the first generation  $F_0$ . For pyrolytic treatment, juveniles of the second generation  $F_1$  were also tested. Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation.

**Figure II.2.** Critical swimming speed ( $U_{crit}$ ) of zebrafish exposed to solvent (in white) or to PAHs from pyrolytic (A) or petrogenic (B) origins (in grey). PAHs concentrations in food was 3X; the environmental reference concentrations  $X$  corresponding to  $X_{py}=18151\pm4983\mu\text{g.g}^{-1}$  and  $X_{pe}=14317\pm8\mu\text{g.g}^{-1}$  of dry food (Annex 3).  $U_{crit}$  was evaluated in juvenile and adults both of the first generation  $F_0$ . In addition, for pyrolytic contaminations, juveniles of the second generation ( $F_1$ ) were tested. Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation.

### **Chapitre III**

**Figure III.1.** An example of frequency distribution of oxygen consumption in larvae. The left and right peaks represent SMR and RMR, respectively.

**Figure III.2.** Active metabolic rate (AMR, A), standard metabolic rate (SMR, B) and aerobic metabolic scope (AMS, C) of 5dpf larvae  $F_1$  zebrafish *Danio rerio* coming from genitors exposed to one of the following treatments: control, 0.3X, 1X and 3X. The environmental reference concentration  $X$  was  $5.5\mu\text{g.g}^{-1}$  of dry food (Annex 3). For SMR (B), treatment with common superscript are not significant different.

**Figure III.3.** Cardiac frequency of of 5dpf larvae  $F_1$  zebrafish *Danio rerio* coming from genitors exposed to one of the following treatments: control, 0.3X, 1X and 3X. Mean values  $\pm$  standard deviation are plotted and treatment with common superscript are not significant different.

### **Chapitre IV**

**Figure IV.1.** Dispositif expérimental de réponse de fuite. (a) électroaimant, (b) bassin expérimental, (c) caméra haute vitesse, (s) stimulus, (t) tube PCV opaque

**Figure IV.2.** Exemple de réponse de fuite chez un mullet doré, *Liza aurata*. Suite à la stimulation déclenchée qui apparaît en haut à droite sur cette vue aérienne, le poisson, à partir de sa position de repos initiale (A), présente une courbure en C liée à la contraction contralatérale par rapport à la stimulation typique de l'étape 1 (B). Suit un changement de direction représentatif de l'étape 2 (C).

**Figure IV.3..** (A)  $A_1$ , l'angle parcouru (en degrés) pendant l'étape 1 et (B)  $V_{ang}$ , la vitesse angulaire (en degrés.ms<sup>-1</sup>) lors de cette même étape de la réponse de fuite en fonction des différents types de traitement auxquels les *D. rerio* ont été exposés (0.3X, 1X et 3X) avec la concentration environnementale en HAP de référence  $X = 5.5 \mu\text{g.g}^{-1}$  de nourriture poids sec et au traitement *contrôle*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type.

## **Discussion**

**Figure A.** Coeur de poisson zebra exposé au traitement contrôle (A) ou au mélange de HAP pétrogénique 3X (B). En comparaison avec le contrôle, certains poissons exposés aux HAP

---

# Liste des Tableaux

---

## Etat de l'art

**Tableau 1.** Exemples de quelques indices moléculaires utilisés pour déterminer l'origine des HAP (D'après Geffard, 2001). Les HAP individuels utilisés sont les suivants: phenanthrène (Phe), anthracène (Ant), Fluorène (Fluo), Pyrène (Pyr), Chrysène (Chrys), Benzo[a]Anthracene (BaA), Benzo[e]Pyrène (BeP), Benzo[a]Pyrène (BaP).

## Chapitre I

**Table I.2.** Biometry of fish for each treatment tested (Mean±SE). Two generations of fish were tested: F<sub>0</sub> as direct contaminated fish and F<sub>1</sub> the progeny of these fish.

**Table I.3** Concentration of individual PAHs in contaminated diet. Values are expressed as mean±S.E., in ng.g<sup>-1</sup> of dry food; n.d.=not detectable.

## Chapitre II

**Table II.1.** Biometry of fish for each treatment tested (Mean±SE). Two generations of fish were tested: F<sub>0</sub> as direct contaminated fish for both PAHs fractions and F<sub>1</sub> the progeny of these fish was only tested for *PY* fraction.

## Chapitre IV

**Tableau IV.1.** Caractéristiques biométriques des poissons zèbre adultes testés pour les performances de fuite. Les valeurs de poids moyen et de longueurs moyennes sont présentées de la façon suivante : moyenne ± écart-type.

**Figure IV.4.** (A) Durée de réponse, (B) Distance parcourue, (C) Vitesse maximale parcourue au cours d'une réponse de fuite d'une durée moyenne de 26ms chez le poisson zèbre *D. rerio* exposé aux HAP de types pyrolytiques à différentes concentrations 0.3X, 1X et 3X avec concentration environnementale en HAP de référence  $X = 5.5 \mu\text{g.g}^{-1}$  de nourriture poids sec et au traitement *contrôle*. Les résultats sont exprimés en moyenne±écart type.

**Tableau IV.2.** Taux de réponse, (en nombre d'individus  $n$  ayant présenté une réponse de fuite et en % du nombre total d'individus stimulés par traitement), direction (en % de nombre de réponses *à l'opposé* du stimulus par rapport au nombre total de réponse par traitement), temps de réaction du poisson à la stimulation (ou latence, en ms)

---

# Introduction générale

---



Situés à l'interface entre terre et mer, les écosystèmes côtiers représentent des zones de transition soumises à une forte variabilité spatio-temporelle (Kerr, 1990). Cette variabilité se traduit par des variations physico-chimiques via des gradients de température, de salinité, ou encore d'oxygène, ainsi que des variations biotiques telles que la compétition ou la disponibilité de la ressource. De part ces propriétés, les zones littorales et estuariennes se caractérisent par une forte biodiversité associée à une production élevée (McHugh, 1967; Whittaker, 1975 ; Costanza, 1997). Zone de reproduction pour certains organismes et de nourricerie pour d'autres (Beck et al., 2001), ces habitats abritent également de nombreuses espèces animales et végétales présentant un intérêt écologique et économique important. Aux variations d'origine naturelle s'ajoutent des perturbations d'origine anthropique liées au développement croissant d'activités humaines (Edgar et al., 2000). Par exemple, le rejet croissant de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) lié à la combustion d'énergies fossiles, la production de ciment ou la déforestation, conduit à l'acidification des océans et au réchauffement global de la planète (Hansen et al., 2007, Gattuso et al., 2011a). Ainsi l'augmentation du CO<sub>2</sub> et de la température va induire une large gamme de réponses des organismes, allant de la réduction de la calcification (Gazeau et al., 2007; Talmage & Gobler, 2010; Waldbusser et al., 2011) à des déplacements des distributions spatiales des poissons, par exemple vers des latitudes plus hautes et des eaux plus profondes (Kroeker et al. 2013). Aussi, l'accentuation de phénomènes d'eutrophisation va intensifier les événements hypoxiques dans les écosystèmes côtiers productifs (i.e. diminution de la teneur en oxygène dissout dans l'eau (Diaz, 2001 ; Diaz et al. 2004). Ajoutée à cette amplification de la variabilité environnementale d'origine naturelle, l'augmentation des activités anthropiques via l'urbanisation, l'industrialisation ou encore les transports maritimes, cause le rejet dans l'environnement de xénobiotiques tels que les métaux lourds ou les polluants organiques persistants (POPs). Les zones côtières et estuariennes sont particulièrement affectées par ces pollutions et représentent des zones propices au dépôt et au stockage de contaminants dans les sédiments (Kennish 1997). Elles constituent ainsi une importante source de contamination pour les espèces qui y vivent (Courrat et al., 2009). L'estuaire de la Seine, par exemple, est l'une des zones les plus contaminées en France (Cachot et al. 2006). De part sa localisation, c'est un réceptacle des rejets industriels, agricoles et urbains du bassin versant de ce fleuve qui présente une « multi-contamination » chimique chronique (e.g. métaux, PCB, HAP ; Abarnou, 2000 ; Claisse, 2006 ; Poisson et al. 2011). La dégradation de la qualité des eaux côtières représente un problème majeur tant pour la population humaine utilisatrice des ressources marines (e.g. pêche, aquaculture, conchyliculture) que pour les espèces animales et végétales qui y vivent. (Galloway &



Depledge, 2001).

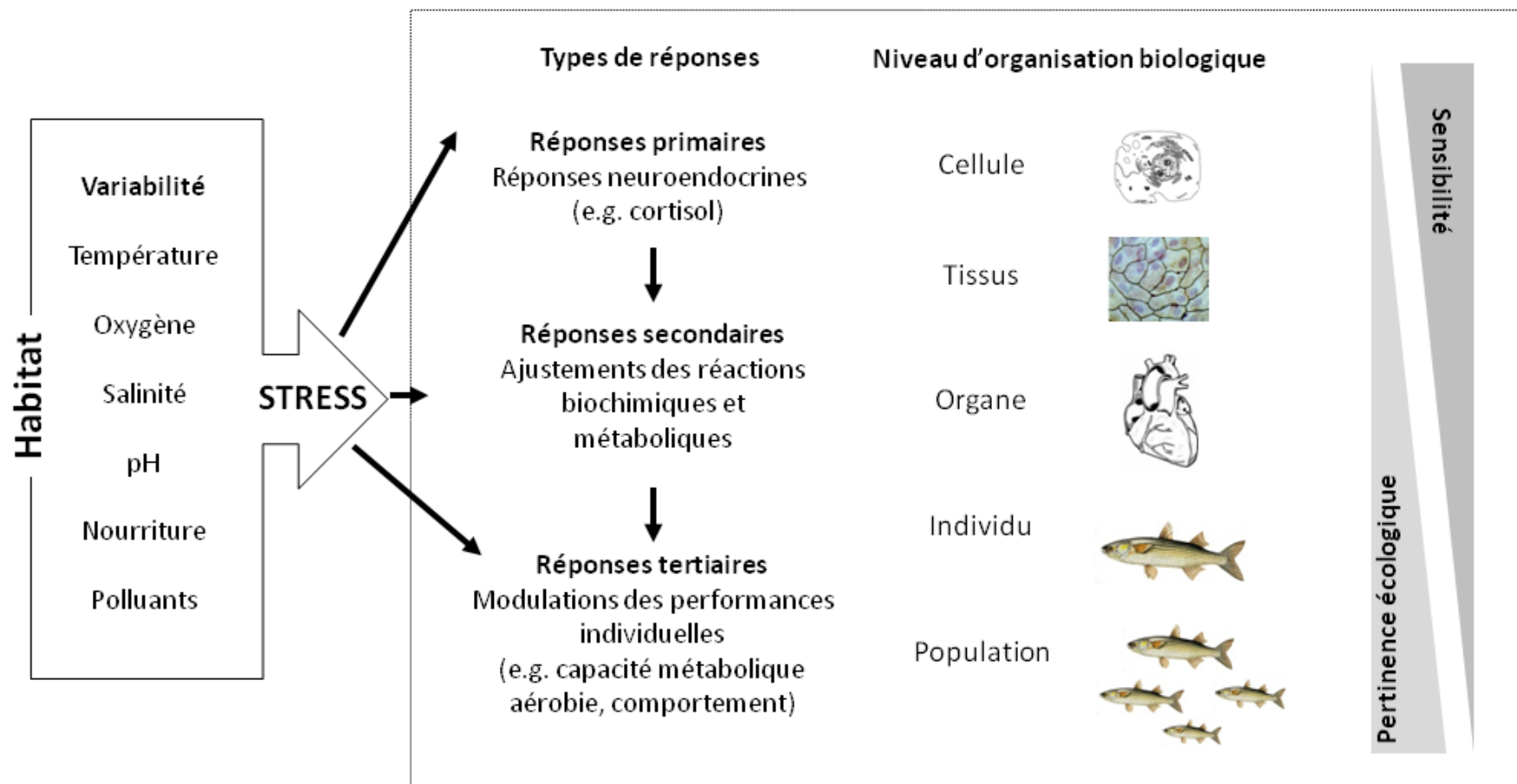
Dans un contexte de changements globaux et dans la perspective de la gestion durable des ressources et des milieux naturels, la protection de l'environnement fait partie des objectifs prioritaires de la communauté européenne. Ainsi, la Directive Cadre Eau 2000/60/CE, mise en place le 23 octobre 2000 par le Conseil et le Parlement européen, joue un rôle primordial dans la préservation et la restauration des environnements aquatiques en Europe. Elle a pour objectif l'amélioration de la qualité chimique des eaux en réduisant progressivement les rejets de substances dites prioritaires telles que les métaux, les pesticides ou encore les hydrocarbures. Entrée en vigueur en juin 2007, la directive REACH (i.e. Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals) a également pour objectif d'assurer la protection de la santé humaine et de l'environnement contre les risques engendrés par les produits chimiques (Hengstler et al., 2006). Pour cela, elle préconise une meilleure connaissance de la toxicité de ces substances chimiques via notamment le développement de tests avant leur production ou utilisation par les industries. Elle apporte un cadre réglementaire supplémentaire pour la gestion (i.e. évaluation, autorisation, restriction) des substances chimiques toxiques. Jusqu'à la fin des années 1980, la surveillance de l'environnement reposait essentiellement sur un ensemble de techniques d'analyses physico-chimiques plus ou moins sensibles mesurant les concentrations de polluants dans l'eau, dans les sédiments et dans les organismes. Bien que nécessaires, ces analyses n'évaluaient pas les effets biologiques des polluants sur les organismes. D'une manière générale, l'effort de recherche s'est donc accentué depuis une dizaine d'années par le développement de la biosurveillance (i.e. biomonitoring) des écosystèmes aquatiques. En couplant des mesures chimiques et biologiques, cette approche permet (i) d'étudier la sensibilité des espèces aquatiques et (ii) d'évaluer leur niveau de tolérance face à des concentrations sub-létales de polluants (e.g. pesticides, hydrocarbures). Ainsi les directives européennes ont également pour objectif la préservation d'un bon état écologique des écosystèmes aquatiques. L'évaluation de cet état est basée sur des indicateurs biologiques tels que la diversité et l'abondance des espèces végétales ou animales du milieu en tenant compte des propriétés de leur habitat (e.g. propriétés physico-chimiques, hydrodynamisme).

**Dans ce contexte, une meilleure compréhension des réponses biologiques des individus exposés aux polluants apparaît fondamentale pour développer des modèles conceptuels de dynamique de population intégrant ces facteurs comme variable forçante.** Avec un objectif ambitieux de l'atteinte d'un bon état de l'environnement aquatique (i.e. bon état écologique et chimique) d'ici 2020, la DCE constitue l'un des piliers environnementaux de la stratégie maritime européenne.

La présence de polluants dans l'environnement induit une pression environnementale et un **stress** considéré comme un état « d'altération » pouvant nuire aux organismes (Selye, 1973; Wedemeyer et al., 1990 ; Barton, 2002 ; Martinez-Porchas et al., 2009). D'après Selye (1973), le stress est une réponse non spécifique du corps à toutes les exigences qu'on lui impose. Au-delà des polluants, tous les facteurs environnementaux (i.e. biotiques/abiotiques, naturels ou anthropiques) qui tendent à perturber l'équilibre homéostatique de l'organisme sont considérés comme des stressseurs. L'**homéostasie** a été définie par Cannon (1929) comme un ensemble de processus physiologiques (e.g. nerveux, hormonaux...) permettant de rétablir l'équilibre du milieu interne de l'organisme suite à des perturbations extérieures. C'est en s'éloignant de cet équilibre qu'un organisme est considéré en état de stress. La **tolérance** des organismes représente leur capacité à faire face à ce stress dans leur environnement (Wedemeyer et al. 1984). Cette capacité d'adaptation induit une dépense énergétique supplémentaire pour l'organisme réduisant l'énergie disponible pour le reste de ses activités telles que la locomotion, la croissance ou la reproduction (Holloway et al 1990). Ainsi, lorsque les pressions environnementales n'induisent pas la mort, ces activités et les fonctions biologiques associées peuvent être compromises à plus ou moins long terme. Face à la variabilité environnementale et le stress qu'elle engendre, les organismes aquatiques présentent différents types de réponses sous la forme de mécanismes de régulation qui participent au maintien de cette homéostasie. A plus long terme, cela peut se traduire par des processus évolutifs. Ces réponses biologiques varient en fonction de la nature et de l'intensité du stress ainsi que du compartiment environnemental considéré (e.g. sédiment, colonne d'eau). Elles dépendent également des caractéristiques physiologiques et tissulaires des organismes ainsi que de leur sensibilité (i.e. temps de réponse au stress). La pertinence biologique et écologique ainsi que la sensibilité des réponses dépendent du niveau d'organisation étudié (i.e. de la molécule aux populations ; Fig. 1). En effet, les niveaux moléculaires et cellulaires sont les premiers niveaux d'intégration et de réponse au stress. Les mécanismes biologiques compensatoires ainsi mis en place n'auront pas forcément d'impact au niveau de l'individu et

auront donc une pertinence écologique moindre. A l'inverse, les niveaux d'intégration les plus élevés (i.e. individus, populations) répondent à plus long terme via des altérations au niveau de la croissance, de la reproduction et de la survie des organismes, ces variables ayant une pertinence écologique plus élevée.

D'après Barton (2002), trois catégories de réponses biologiques ont été déterminées en fonction des mécanismes et du niveau d'organisation considéré (Fig. 1).



**Figure 1 :** les différents types de réponses biologiques des organismes dans un environnement variable. Modifié d'après Barton (2002).

Tout d'abord, la réponse primaire correspond aux réponses neuroendocrines. En effet, la stimulation de l'hypothalamus va induire la sécrétion dans le sang d'hormones « de stress » telles que les catecholamines ou les corticostéroïdes (Donaldson, 1981; Pottinger, 1994 ; Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999, McCormick, 1999, 2006). Les réponses secondaires sont ensuite déclenchées soit par les réponses primaires soit par le stress lui-même. Des ajustements physiologiques métaboliques tels que la cinétique des réactions de la chaîne respiratoire sont mis en place (e.g. cycle de Krebs, capacité de transport et de stockage de l'oxygène ; Pickering, 1981; Iwama et al., 1997; Mommsen et al., 1999). Enfin au niveau individuel, les réponses tertiaires impliquent des variations des grandes fonctions au niveau de l'organisme comme la capacité métabolique, la croissance ou encore des variations du comportement, fonctions qui jouent un rôle déterminant pour la survie de l'organisme (Wedemeyer and McLeay, 1981; Wedemeyer et al., 1990, Davoodi, and Claireaux, 2007 ; Goncalves et al. 2008). A l'échelle des populations cela se traduit par un impact sur l'abondance et la biomasse par exemple. **Dans le présent travail de thèse, les réponses physiologiques sont étudiées au niveau individuel du poisson via notamment l'étude des performances métaboliques (Chap. I et III) et natatoires (Chap. II et IV) du poisson.**

L'ensemble de ces ajustements cellulaires, physiologiques ou comportementaux observés à différents niveaux d'organisation permettent d'avoir une vue générale de l'impact de la contamination par un ou plusieurs polluants (Depledge, 1993) ou de tout autre facteur environnemental. Ainsi, il est nécessaire d'observer les différents niveaux d'intégrations biologiques affectés par le polluant. Cela implique l'utilisation d'approches faisant appel à différentes disciplines de recherche pouvant être complémentaires (e.g. biochimiques, comportementales, croissance). Ce type d'étude pluridisciplinaire est compliqué à mettre en place et limité mais en partie possible à l'échelle de projets de recherche. Dans ce contexte, le projet ANR CONPHYPOP (CONtamination et PHYsiologies des poissons exposés à des Polluants Organiques Persistants), dans lequel s'inscrit ce travail de thèse, avait pour objectif d'étudier les effets d'une exposition à des mélanges de HAP sur les grands processus physiologiques tels que le développement, la croissance, la reproduction, l'osmorégulation, le métabolisme et le comportement. Ce projet a fait l'objet de 4 doctorats complémentaires permettant de couvrir plusieurs niveaux d'intégration de la contamination (i.e. mise en place de tests embryolarvaires et indicateurs de toxicité prédictifs d'effets tardifs, P. Perrichon et F. Le Bihannic ; croissance, reproduction et comportement, C. Vignet). **L'étude suivante s'est focalisée sur les réponses sub-létales aux polluants organiques persistants au niveau**

**individuel puisqu'il s'agit d'un niveau intermédiaire en termes de pertinence écologique et de sensibilité (Fig. 1). Ces réponses ont été évaluées à travers le métabolisme énergétique, les performances cardiaques et locomotrices qui sont des fonctions biologiques clés pour le développement et la survie d'un individu (e.g. Fry, 1971 ; Priede, 1985 ; Miller et al., 1991, Cooke et al 2004 ; Claireaux et Lefrançois, 2007).** En effet, des perturbations de leurs activités locomotrices peuvent entraîner par exemple une réduction de leur capacité de fuite face aux prédateurs, une augmentation du temps de recherche des proies ainsi que des modifications des activités de migration affectant indirectement leur reproduction et leur survie (Triebkorn et al., 1997).

Tous les organismes ne répondent pas de la même manière face aux contaminations. Les effets observés vont dépendre des caractéristiques tissulaires et/ou physiologiques des espèces, de leur tolérance et de leur sensibilité ainsi que du mode d'action des polluants. Dans la littérature, les réponses biologiques ont été étudiées via l'utilisation d'espèces sentinelles de la qualité du milieu aquatique. Ces espèces bioaccumulatrices, sont utilisées en considérant que les bioconcentrations en polluants et les effets biologiques mesurés sont représentatifs de la contamination de leur milieu environnant. Selon Phillips (1980) une espèce sentinelle doit satisfaire différents critères d'abondance et de taille permettant le prélèvement d'échantillons représentatifs, une sédentarité et une large distribution géographique permettant des comparaisons entre les sites ou encore leur tolérance face au stress engendré par les polluants. Différents organismes aquatiques sont utilisés pour étudier les effets de contaminations tels que les mollusques (Cossa, 1995; Hiss *et al.*, 1999), les échinodermes (Fernandez et Beiras, 2001; Beiras *et al.*, 2003), les crustacés (Rainbow et White, 1989; Clason *et al.*, 2003), les oiseaux (Jenssen, 1994; Bradbury et Kirby, 2006), les mammifères marins (Aguilar *et al.*, 2002; Dolman *et al.*, 2009) ou encore les poissons (Van der Oost *et al.*, 2003, Milinkovitch et al. 2012).

Les poissons représentent des espèces d'intérêt de part leur forte diversité et leur valeur commerciale. Les zones littorales ou estuariennes constituent des zones de reproduction, de nourriceries et de croissance pour les poissons qui sont donc susceptibles de subir les effets des contaminations (Beck *et al.*, 2001; Cabral *et al.*, 2007). Ainsi, dans le but de préserver cette ressource, une meilleure connaissance de leurs réponses biologiques face aux polluants paraît indispensable pour évaluer leur état de santé. De part leur cycle de vie, leur distribution dans les écosystèmes aquatiques ou encore leur comportement, les poissons

jouent un rôle important dans la structuration et le fonctionnement des réseaux trophiques aquatiques et peuvent donc être considérés comme des éléments intégrateurs du milieu. Le flet *Platichthys flesus* est par exemple l'espèce de poisson sentinelle la plus utilisée en Baie de Seine tandis que le gardon *Rutilus rutilus* est fréquemment employé en eau douce (Poisson et al. 2011). Cependant, leur utilisation présente certaines limitations : (i) la durée de leur cycle de vie limite à court terme les études de plusieurs stades de développement, (ii) le nombre de réplicats peut être limité notamment par la taille du poisson et (iii) l'étude en milieu naturel étant difficile, leur utilisation nécessite le maintien des organismes en laboratoire dans des aquariums, ce qui n'est pas toujours possible selon les espèces étudiées. Face à ces contraintes, il est possible de faire appel à des espèces moins pertinentes écologiquement mais présentant certains avantages pour étudier l'effet de contaminations à long terme notamment. Parmi elles, le **poisson zèbre** *Danio rerio* est reconnue comme un modèle de l'altération de fonctions physiologiques et pathologiques chez les vertébrés. Très utilisée dans de nombreux domaines tels que la génétique (Chen et al. 1996 ; Haffter et al. 1996 ; Dooley et al. 2000) ou la biologie du développement (Incardona et al. 2004, 2005, 2011 ; Hill et al. 2005), cette espèce présente plusieurs avantages tels que sa petite taille (i.e. maximum 4 cm à l'âge adulte) ou sa facilité d'élevage en laboratoire en conditions contrôlées. Son développement rapide et son court cycle de vie (i.e. passage du stade embryon à l'adulte en 90 jours) permettent les études sur plusieurs stades de développement voire plusieurs générations de poissons (Lawrence, 2007, Spence et al. 2008, Engeszer et al. 2009)

**Ainsi le présent travail de thèse vise à étudier l'impact d'une exposition chronique par voie trophique à deux types de mélanges de HAP : pyrolytique et pétrogénique lourd. Les réponses biologiques du poisson zèbre ont été évaluées à travers le suivi d'un ensemble de performances physiologiques clés telles que les performances métaboliques via l'estimation de la capacité métabolique aérobie, les performances cardiaques, les performances locomotrices via l'estimation des performances de nage et de la réponse de fuite. Ces fonctions biologiques ont été étudiées à différents stades de développement de poissons zèbre *Danio rerio* directement contaminés (i.e. stades juvénile et adulte) ainsi que sur leur descendance (i.e. stades larvaire et juvénile) dans le but d'évaluer un potentiel transfert parental de la contamination.**

Ce manuscrit est organisé suivant le modèle d'une thèse sur publications en 6 parties.

La première partie de ce document présente le contexte général de l'étude (i.e. Introduction générale) ainsi qu'un état des connaissances concernant les HAP ainsi que la bioénergétique, les performances cardiaques et locomotrices des téléostéens qui seront ensuite au centre des études présentées dans les chapitres I à IV.

Dans la première partie (Chap. I), je me suis intéressée aux effets d'une contamination par voie trophique à des mélanges de HAP de type pyrolytique sur le métabolisme aérobie du poisson zèbre. Une approche de respirométrie statique a été utilisée pour quantifier les performances métaboliques de poissons juvéniles et adultes directement contaminés ainsi que leur descendance dans le but d'évaluer le transfert parental potentiel de la contamination. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication soumise dans *Aquatic toxicology*.

Dans le second chapitre, j'ai comparé les effets d'une contamination par voie trophique à deux types de mélanges de HAP, pétrogénique et pyrolytique, sur les performances de nage du poisson zèbre. Ces performances ont été évaluées à différents stades de développement du poisson (i.e. juvénile, adulte et leur descendance). Les individus ont été soumis à un challenge de nage permettant l'évaluation de la vitesse de nage critique et les coûts énergétiques associés. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication à soumettre prochainement dans le journal *Ecotoxicological and Environmental Safety*.

Dans le chapitre III, je me suis intéressée au transfert parental de la contamination de type pyrolytique sur la descendance d'individus contaminés. Les HAP, en tant que « stressseurs potentiels » sont supposés affecter les performances cardiaques qui sont évaluées via le rythme cardiaque de larves. La capacité métabolique aérobie au même âge a été évaluée. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication soumise prochainement dans un numéro spécial de la revue *Environmental Science and Pollution Reserach* intitulé "*PAHs and fish – Exposure monitoring and adverse effects – from molecular to individual level*".

Dans le chapitre IV, les performances locomotrices du poisson sont évaluées via l'étude du comportement anti-prédateur. Les réponses de fuite individuelles ont été évaluées à l'âge adulte dans le but de mesurer les effets et le potentiel transfert parental d'une contamination trophique à un mélange de HAP de type pyrolytique.

La dernière partie est constituée d'une discussion générale sur l'ensemble des résultats



obtenus, ainsi que d'une conclusion et des perspectives relatives à ce projet de recherche.

Chaque chapitre est sous la forme d'un article en anglais qui est précédé d'un résumé en français présentant le sujet d'étude ainsi que les principaux résultats obtenus et les conclusions.

---

## **Etat de l'art**

---



## **1. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)**

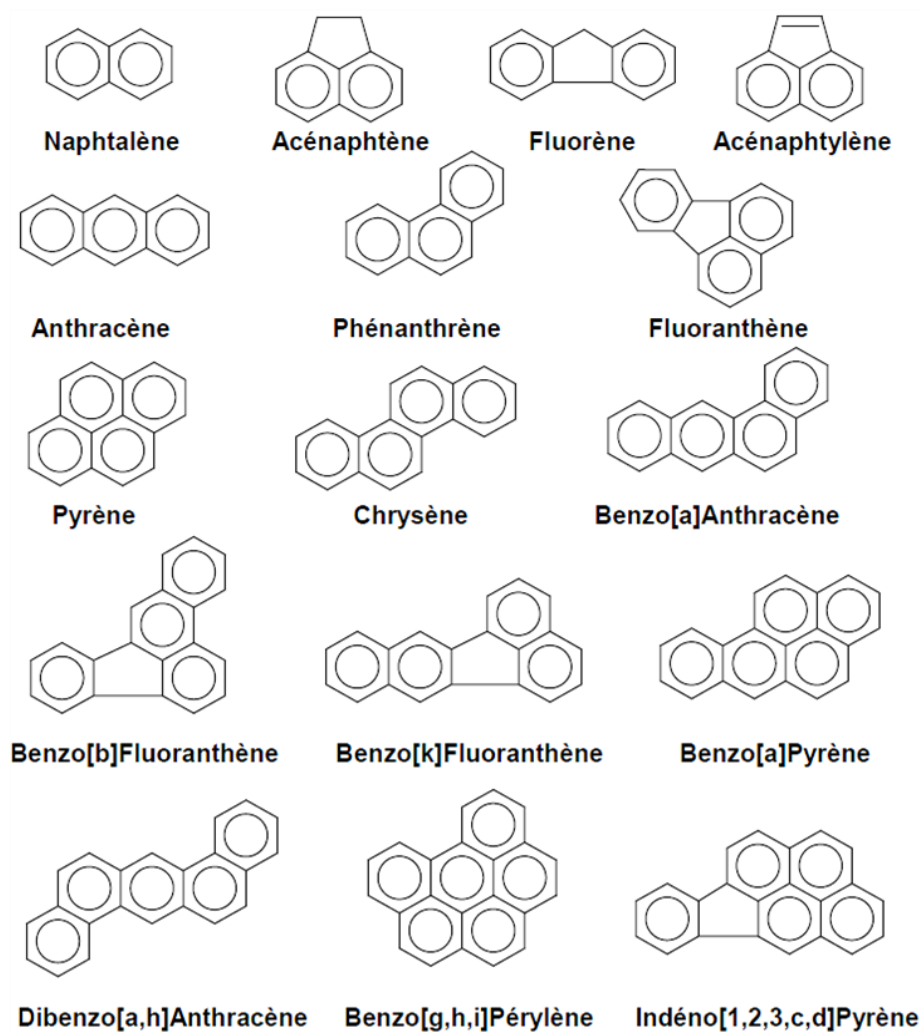
### ***1.1. Les composés***

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques sont des composés organiques relativement stables, constitués presque exclusivement d'atomes de carbone et d'hydrogène. Leur structure se compose généralement de 2 à 7 cycles benzéniques fusionnés et leurs poids moléculaires varient de 130 à 280 g.mole<sup>-1</sup>. Selon le nombre de cycles, ils sont classés en HAP de faible poids moléculaire, appelés HAP légers, lorsqu'ils comportent jusqu'à trois cycles (e.g. naphthalène, fluorène) alors que les HAP de haut poids moléculaire, appelés HAP lourds, sont composés de plus de 3 cycles (e.g. benzo[a]pyrène, benzofluoranthène). Ce nombre de cycles confère aux molécules des propriétés physiques, chimiques et toxicologiques très différentes. Les HAP sont lipophiles et leur solubilité est caractérisée à l'aide du coefficient de partage octanol-eau ( $K_{ow}$ ) correspondant au rapport de concentration d'un composé dissous à saturation dans le solvant n-octanol et l'eau. Plus le coefficient est élevé, moins le composé est soluble dans l'eau et plus son affinité pour les lipides est élevée (Annexe 1).

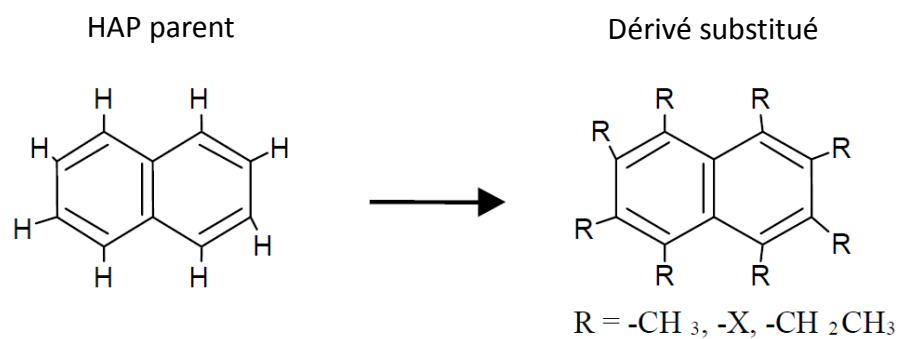
L'agence environnementale américaine (United States Environmental Protection Agency, US-EPA) a identifié certaines de ces molécules comme étant particulièrement toxiques et a ainsi décidé de les regrouper en une liste de HAP prioritaires (Fig. 2). Il est actuellement admis que ces molécules à la toxicité avérée doivent être systématiquement quantifiées lors de la réalisation d'études environnementales.

### ***1.2. Les origines des HAP***

Les HAP sont présents dans l'environnement sous forme de mélanges aux propriétés chimiques et toxicologiques différentes en fonction des molécules présentes et de leur abondance qui sont directement dépendantes de leur origine. Les processus de formation de HAP s'effectuent sous des conditions de température et de pression différentes ce qui génère des composés dont la structure diffère par le degré d'aromaticité (i.e. nombre de cycles) et de substitution (i.e. nombre de carbone associé au HAP, Fig. 3).



**Figure 2.** Seize HAP classés comme prioritaires dans la liste de l'US-EPA (United States Environmental Protection Agency).

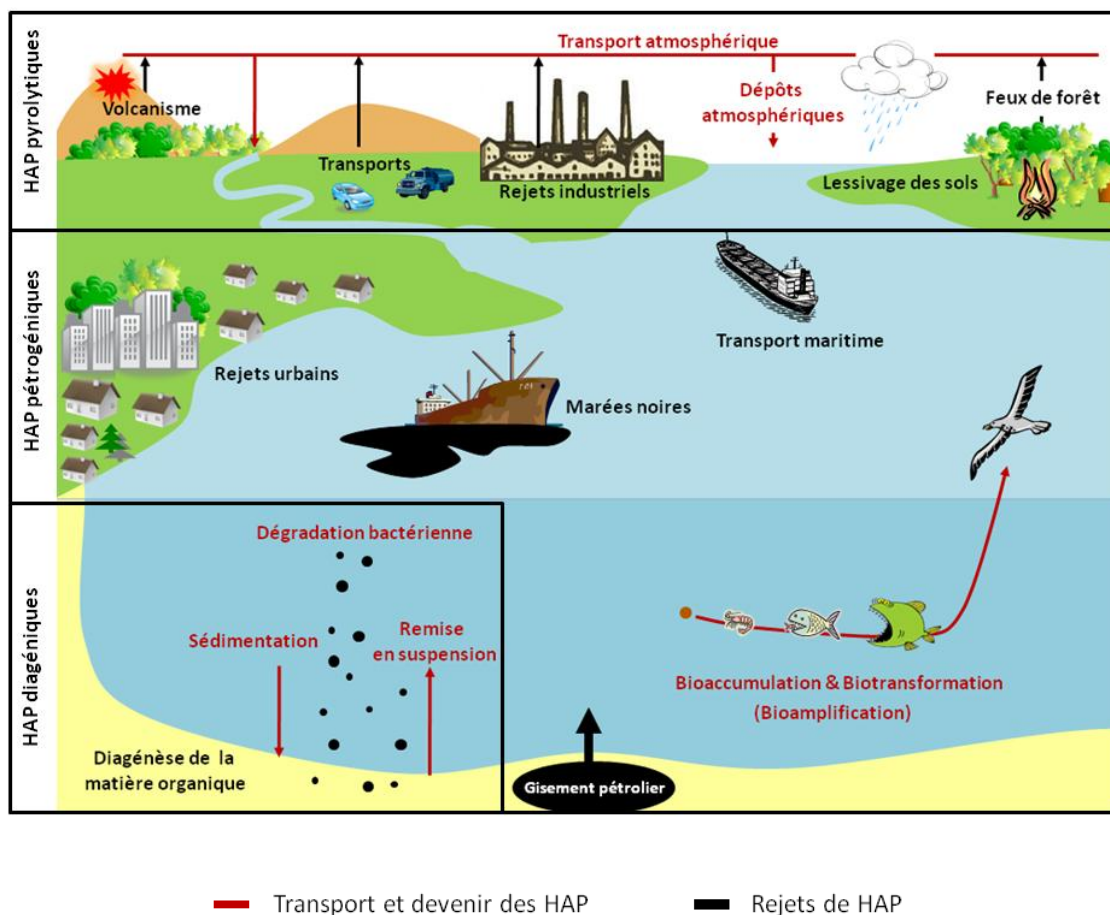


**Figure 3.** Exemple du naphthalène et de son dérivé substitué.

Ainsi, les HAP peuvent être classés en trois catégories :

- Les HAP d'origine **pétrogénique** qui sont issus de pétrole brut. La dégradation de la matière organique à une température inférieure à 200°C est à l'origine de la formation du pétrole brut qui sera plus riche en HAP de plus faible poids moléculaire (e.g. naphthalène, phénanthrène) et de composés substitués (Reed et Kaplan, 1977; Budzinski, 1993). Ces HAP sont introduits dans l'environnement soit lors de rejets naturels ou suintements, soit lors d'événements accidentels à l'image de marées noires ou de dégazages sauvages (Neff, 1979; Laflamme et Hites, 1979; Wakeham et al., 1980a; GESAMP, 1993; U.S. National Academy of Sciences, 2003).
- Les HAP d'origine **pyrolytique** qui proviennent de la combustion partielle de la matière organique à haute température (i.e. pyrolyse, jusqu'à 2000°C ; Hase et Hites, 1978). Cette pyrolyse induit la formation de composés de haut poids moléculaire non substitués tels que le Benzo[a]Pyrène (Hase et Hites, 1978 ; Neff, 1979, McElroy et al., 1989). Les HAP de type pyrolytique peuvent être issus de phénomènes naturels comme les feux de forêt ou les éruptions volcaniques (Greiner et al., 1977 ; Freeman et Cattell, 1990) ainsi que d'activités humaines en étant produits par l'industrie, les automobiles, la combustion de pétrole ou encore l'incinération de déchets. L'origine pyrolytique est considérée comme la source majeure de HAP dans l'environnement. (McElroy et al. 1989).
- Les HAP d'origine **diagénique** qui se forment lors de la dégradation précoce de la matière organique et qui s'accumulent dans les dépôts sédimentaires (Aizenshtat, 1973; Neff, 1979; McElroy et al., 1989). Ils sont caractérisés par la présence de composés tels que le pérylène.

Afin de mieux caractériser la distribution des HAP en fonction de leur processus de formation et donc de leur origine, des indices moléculaires basés sur le rapport entre deux HAP individuels ont été développés (Youngblood et Blumer, 1975; Readman et al., 1987; Budzinski et al., 1993a et b, 1995a, 1997; Yunker et al., 1993, 1999, 2002; Fernandes et Sicre, 1999). Certains indices sont répertoriés pour exemple dans le tableau 1 suivant.



**Figure 4.** Représentation schématique des différentes sources de HAP ainsi que de leur transport et devenir dans l'écosystème aquatique. D'après Mc Elroy (1989)

**Tableau 4.** Exemples de quelques indices moléculaires utilisés pour déterminer l'origine des HAP (D'après Geffard, 2001). Les HAP individuels utilisés sont les suivants: phenantrène (Phe), anthracène (Ant), Fluorène (Fluo), Pyrène (Pyr), Chrysène (Chrys), Benzo[a]Anthracene (BaA), Benzo[e]Pyrène (BeP), Benzo[a]Pyrène (BaP).

Indice	Phe/Ant	Fluo/Pyr	Chrys/BaA	BeP/BaP
Source pyrolytique	1-10	>1	<1	<2
Source pétrogénique	>25	<1	>1	>5
Références	Garrigues et al., 1995	Soclo, 1986	Raoux, 1991	Broyelle, 1997

### **1.3. Bioaccumulation**

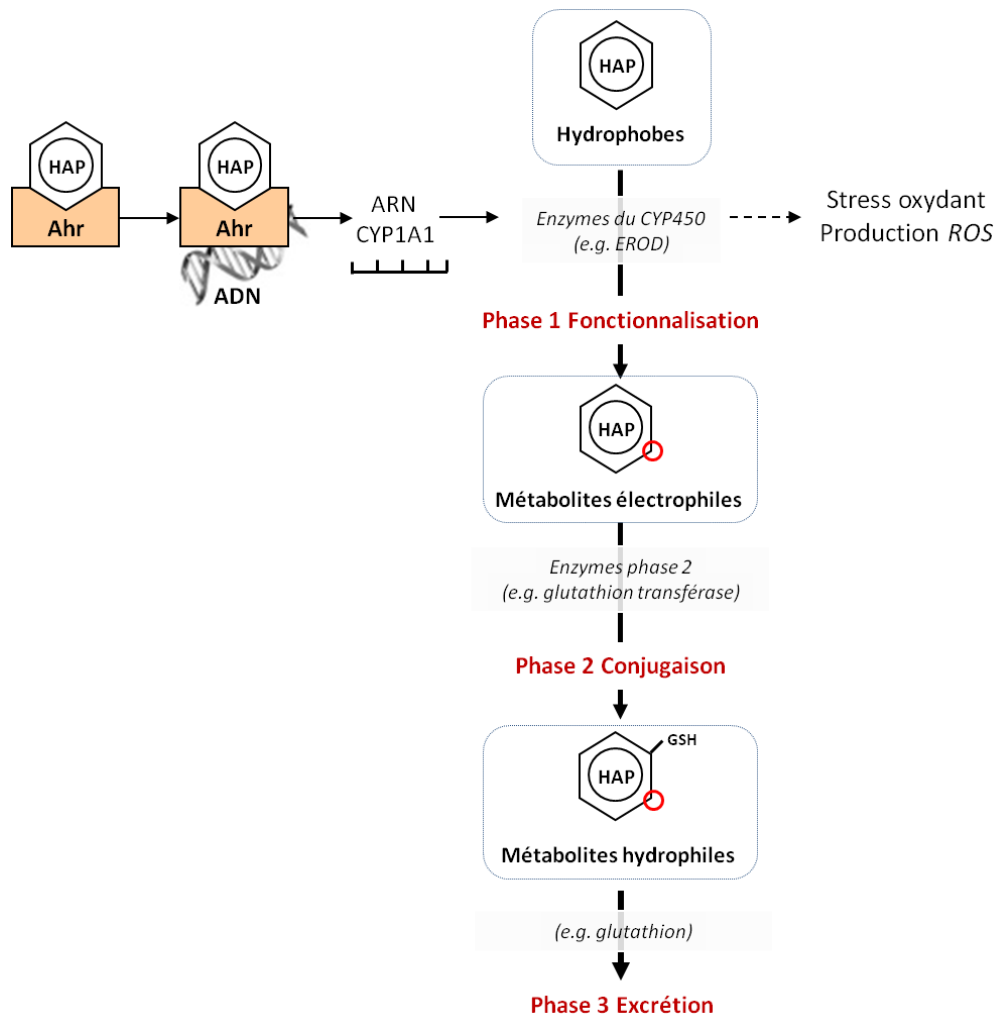
Les HAP sont des polluants organiques persistants ubiquistes puisque présents dans tous les compartiments de l'environnement (Neff, 1979; McElroy et al., 1989; Menzie et al., 1992, Dabestani et Ivanov, 1999). Cette diffusion environnementale s'explique par la diversité de leurs sources et leur stabilité. (Lunde et Bjorseth, 1977; Windsor et Hites, 1979; Neff, 1985; Law et Biscaya, 1994). Dans l'atmosphère, les HAP peuvent être sous forme gazeuse ou adsorbés sur les particules atmosphériques. Ils peuvent être ainsi transportés sur de longues distances dans l'atmosphère (Windsor et Hites, 1979; Bjorseth et Olufsen, 1983) puis transférés au milieu continental ou marin par dépôt sec ou humide (Neff, 1979). Les HAP déposés sur le milieu continental peuvent également atteindre le milieu marin par lessivage des sols (Latimer et al., 1990) puis par les transports fluviaux (Fig. 4). De par leurs propriétés lipophiles, ils sont également facilement adsorbés par les particules sédimentaires en suspension dans les milieux aquatiques, notamment au niveau des estuaires dans lesquels ils sédimentent (Fowler, 1993). Les organismes benthiques, de par leur mode de vie, sont directement en contact avec ces HAP présents dans les sédiments marins et sont donc susceptibles d'être affectés par la contamination. Des phénomènes de bioturbation (i.e. activité des organismes fouisseurs) ou l'action des vagues ou des courants marins peuvent également favoriser la remise en suspension de ces HAP dans la colonne d'eau ce qui va induire la contamination des organismes pélagiques. Après avoir été intégrés par les organismes, c'est-à-dire bioaccumulés, les HAP sont métabolisés en produits dérivés en vue de leur élimination (Medeiros et al., 2005; Medeiros and Bicego, 2004; Rocha et al., 2012; Zanardi et al., 1999). Le terme de bioaccumulation fait référence à la capacité d'un organisme à concentrer et à accumuler des substances chimiques. Elle est directement proportionnelle à l'aptitude des organismes à dégrader ces molécules par l'intermédiaire de leurs systèmes enzymatiques. Lorsque la quantité de polluant ingéré est supérieure aux quantités éliminées, l'organisme bioaccumule et stocke le polluant dans les graisses. Bien que certains organismes aquatiques (e.g. phytoplancton, zooplancton, bivalves, gastéropodes) possèdent de faibles capacités de métabolisation et donc accumulent fortement les HAP, les vertébrés, et en particulier les poissons, les biotransforment en composés qui peuvent être plus toxiques que les molécules d'origine (Hylland, 2006). Ces composés sont alors éliminés par excrétion. Cette faible accumulation par les niveaux supérieurs limite la bioamplification (i.e. augmentation des concentrations) des HAP à travers les chaînes trophiques (Fig. 4 ; Tuvikene, 1995 ; D'Adamo et al. 1997, Van der Oost et al. 2003). Au contraire, les organismes filtreurs



tels que les bivalves ayant une plus faible capacité de métabolisation seront plus exposés à la contamination aux HAP.

#### 1.4. Biotransformation

Une fois absorbés par l'organisme, les HAP étant lipophiles, ils sont facilement bioaccumulés dans les cellules du foie, des gonades, des intestins ou encore du cerveau. La présence de HAP dans les cellules hépatiques induit la mise en place de processus de biotransformation qui vise à les excréter. L'excrétion des métabolites ainsi formés se fait alors par les reins et la vessie (i.e. urines) ou bien via la vésicule biliaire et le système intestinal (i.e. excréments ; Tuvikene , 1995). Les mécanismes de biotransformation sont résumés dans la figure 5.



**Figure 5.** Mécanismes cellulaires de biotransformation amenant à l'excrétion des HAP par les organismes

- *Phase de fonctionnalisation*

Lors de l'incorporation des HAP dans le milieu interne, la première réaction de défense de l'organisme est la biotransformation de phase 1 également appelé fonctionnalisation. Cette biotransformation est initiée par la liaison spécifique d'un HAP sur un récepteur cytoplasmique « aryl hydrocarbon » (i.e. AhR). Ce récepteur AhR s'associe ensuite avec une protéine qui le transporte dans le noyau cellulaire. Ce complexe est alors lié à une séquence spécifique de l'ADN. Cette fixation entraîne une augmentation de la transcription d'ARN messenger du cytochrome P450 1A1 codant pour des enzymes telles que l'EROD (i.e. *éthoxyrésoufurine-O-dééthylase*). Ces enzymes du cytochrome P450 permettent la biotransformation des HAP en composés électrophiles plus hydrosolubles. Cette oxydation des HAP peut provoquer un stress oxydatif via la production de formes instables et très réactives de l'oxygène (*Reactive oxygen species, ROS*) tel que l'oxygène singulet (Adler et al., 1999).

- *Phase de conjugaison*

Les composés électrophiles issus de la phase 1 sont pris en charge par les enzymes de la phase 2 (e.g. glutathion transférase) pour être conjugués à des groupements hydrophiles tel que le glutathion (*GSH*). Les métabolites ainsi formés sont alors excrétés (phase 3) de la cellule et de l'organisme notamment par voie biliaire.

### **1.5. Toxicité**

La toxicité d'une substance représente sa capacité à induire des effets délétères sur un organisme. La toxicité des HAP dépend de leur nature, de leur concentration et de leur biotransformation puisque certains composés intermédiaires sont souvent plus toxiques que les « composés parents » eux même (Hylland, 2006). Ainsi, les HAP n'ont pas tous les mêmes propriétés toxiques. De nombreuses études ont démontré la toxicité des HAP chez les organismes aquatiques au niveau de plusieurs mécanismes physiologiques (Almroth et al. 2008, Oliveira et al. 2008 ; Nahrang et al. 2009). Les HAP sont reconnus pour leurs propriétés génotoxiques, mutagènes et carcinogéniques (Harper et al., 1996 ; Yamaguchi et al. 1996 ; Reynaud et Deschaux, 2006, Sevastyanova et al. 2007 ; Bado-Nilles et al. 2009b). Ils induisent de manière directe des dommages à l'ADN et des mutations pouvant conduire à la formation de tumeurs par exemple (Hawkins, 1990 ; Myers, 1991 ; Cachot et al. 2006). Leur

présence induit également un stress oxydant impliquant la production d'espèces réactives de l'oxygène (*reactive oxygen species* ROS), synonyme de dommages cellulaires notamment (Halliwell et Gutteridge, 1999 ; Oliveira et al. 2008 ; Oliva et al. 2010). Aussi, les HAP sont embryotoxiques puisque leur présence au cours du développement peut provoquer une forte mortalité ainsi que des effets tératogènes tels que des malformations cardiaques (Harper et al. 1996; Incardona et al. 2003, 2004, 2009, 2011; Nagel, 2010 ; Hicken et al. 2011 ; Kerambrun et al. 2012). Des retards de croissance sont également observés (Meador et al. 2006 ; Kim et al., 2008). Le système immunitaire fait aussi partie des cibles des HAP qui peuvent entraîner une immunodéficience de l'organisme via la diminution des lymphocytes par exemple ou encore des lésions cellulaires (Holladay et al. 1998 ; Reynaud et Deschaux, 2006, Danion, 2011). Le comportement est également altéré ce qui peut avoir des effets directs sur la survie de l'organisme et donc sa fitness (Goncalves et al. 2008). Les capacités de reproduction des organismes sont altérées (Seruto et al. 2005 ; Horgn et al. 2010). Ceci peut être dû à des malformations au niveau des gonades et des gamètes liées à des perturbations du système endocrinien par exemple.

La majorité des études se focalisent sur l'impact de HAP individuels tels que le benzo[a]pyrène. En raison des importantes propriétés toxiques de ses métabolites (e.g. génotoxicité) ce composé est le plus étudié chez les vertébrés (Eisler et al. 1987 ; Willet et al. 1995 ; Patel et al. 2006 ; Kim et al. 2008 ; Wessel et al. 2010, Kim et al. 2013). Cependant, les HAP sont présents dans l'environnement sous forme de mélanges de plusieurs composés qui peuvent avoir des effets synergiques carcinogènes et tératogènes sur les poissons en développement par exemple (Wassenberg et Di giulo, 2004a ; Billiard et al., 2008). Il est donc pertinent de prendre en compte également l'effet de HAP en mélange sur les organismes aquatiques. De plus, la majorité des études porte sur l'impact de concentrations aiguës de polluants (Eisler, 1987, Davoodi et Claireaux 2007 ; Nogueira et al. 2008) qui permettent de déclencher et comprendre les mécanismes mis en place face à la contamination. Ces doses, non représentatives des doses environnementales, ne sont donc pas pertinentes d'un point de vue écologique. **Dans ce contexte, le présent travail de doctorat s'est concentré sur l'étude de mélanges de HAP représentatifs qualitativement et quantitativement du milieu aquatique via une approche écophysiological intégrée basée notamment sur les relations énergétiques entre les organismes et leur environnement.**

## **2. Bioénergétique**

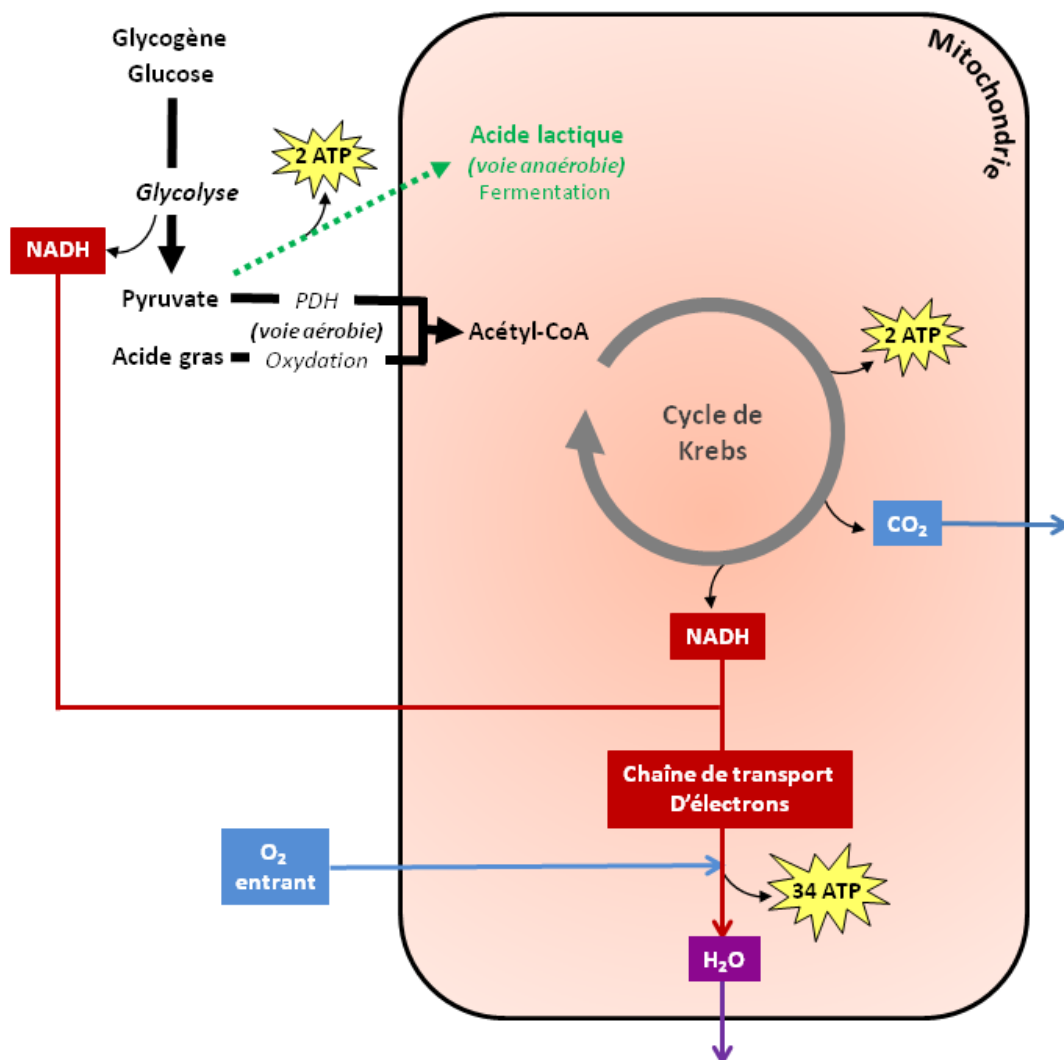
Pour mieux comprendre les interactions énergétiques entre les organismes et leur habitat, l'étude de la bioénergétique permet d'évaluer la répartition des allocations énergétiques au sein de l'organisme en fonction de ses besoins et des contraintes environnementales auxquelles il est soumis.

### ***2.1. La production d'ATP***

Les organismes satisfont la majorité de leurs besoins énergétiques par l'oxydation de substrats énergétiques (e.g. glucides, lipides, protéines) issus de la transformation de la matière organique ingérée. L'ensemble des réactions qui libèrent de l'énergie correspond au **métabolisme énergétique** (Fry, 1971). De manière générale, le métabolisme se réfère à l'ensemble des réactions biochimiques au sein d'un organisme qui lui permettent de se reproduire, de se développer, de se maintenir ainsi que de répondre aux variations environnementales. Le métabolisme se divise en deux voies : (i) l'**anabolisme** qui joue un rôle important dans la régénération des tissus et dans la **croissance** puisqu'il permet la transformation de molécules simples en molécules complexes telles que les protéines et (ii) le **catabolisme** qui permet la dégradation de molécules complexes en molécules plus simples et plus petites avant leur intégration au cycle de Krebs par exemple. Ces réactions de dégradation produisent de l'énergie sous forme de chaleur et **d'adénosine triphosphate (ATP)**. **Le métabolisme énergétique fait donc plutôt référence au catabolisme du métabolisme général.** Les réserves en ATP dans l'organisme étant faibles, il est nécessaire de la produire en permanence. Fabriquée à partir de substrats énergétiques, l'ATP peut également être produite à partir de leurs précurseurs (e.g. le glycogène est un précurseur du glucose stocké dans le foie). Il est donc nécessaire de mettre en réserve ces précurseurs qui seront ensuite hydrolysés en cas de besoin. L'ATP est produite au cours d'un ensemble de processus biochimiques résumés en figure 6 en prenant le glucose comme exemple de substrat énergétique.

Tout d'abord la glycolyse permet de transformer chaque molécule de glucose en 2 molécules de pyruvate. Si l'apport en oxygène n'est plus assez important pour faire face à la demande, comme par exemple lors d'un effort intense, la **voie anaérobie** permet la transformation du pyruvate en lactate (i.e. processus de fermentation) et libère 2 ATP. Au

contraire, si l'apport en oxygène est suffisant, la **voie aérobie** est privilégiée. Le pyruvate est alors dégradé en acétyl-coenzyme A (i.e. Acétyl-CoA) qui va être métabolisée via le cycle de Krebs dans les mitochondries. L'oxygène est ensuite utilisé comme récepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire (i.e. phosphorylation oxydative des substrats) pour la création d'ATP dans le but de répondre aux besoins métaboliques de l'animal. Ainsi, le métabolisme aérobie du glucose permet une production totale de 36 ATP. De fait, les organismes doivent assurer un transport minimal d'oxygène pour pouvoir fournir en quantité suffisante l'énergie nécessaire au fonctionnement de leurs différentes activités (e.g. locomotion, digestion). L'ensemble de ces réactions aérobies permet la production de 36 ATP contre 2 ATP par la voie anaérobie.

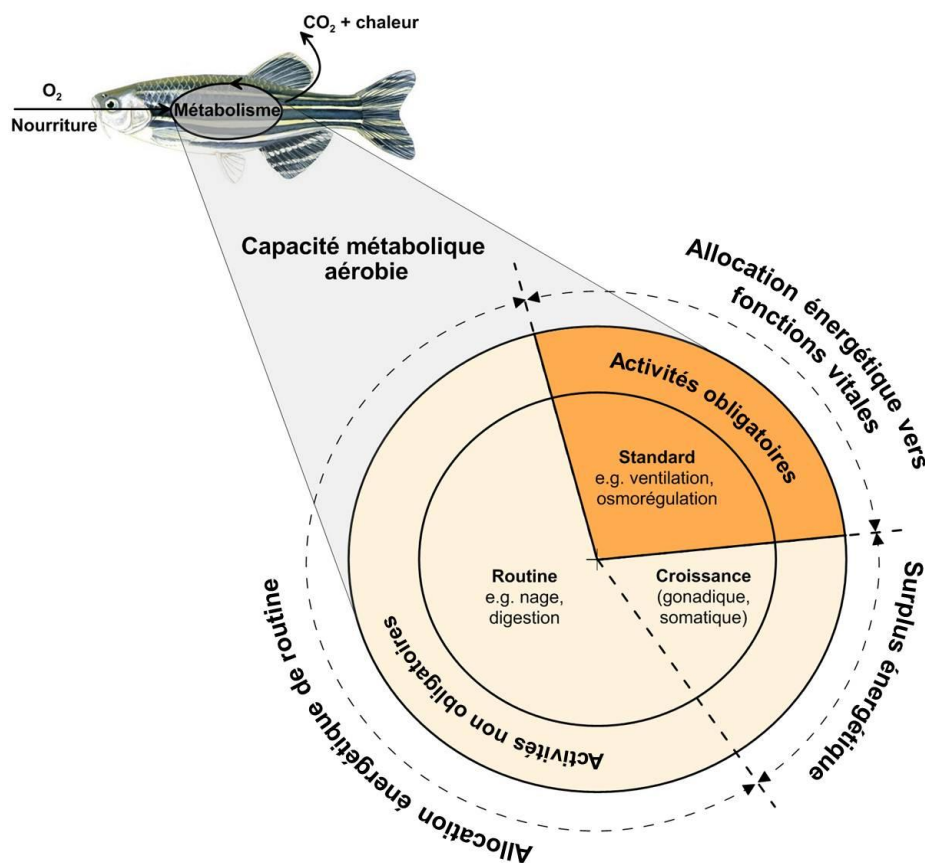


**Figure 6** Représentation schématique de la voie du métabolisme aérobie (i.e. glycolyse, cycle de Krebs, phosphorylation oxydative) et anaérobie (i.e. glycolyse).

## 2.2. Concept de Fry

Dans son concept, Fry (1971) combine une approche « interne » décrivant les mécanismes physiologiques et comportementaux impliqués, et une approche « externe » analysant les conséquences des contraintes environnementales en termes de performances écologiques et de fitness. L'élément central de ce concept est la notion de capacité métabolique énergétique.

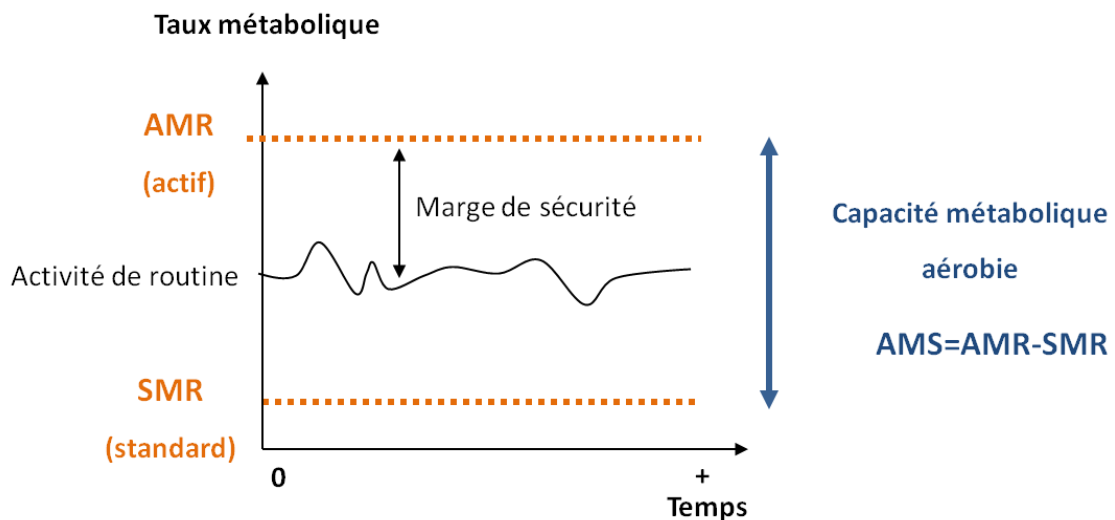
La puissance énergétique d'un organisme représente la quantité d'énergie produite par unité de temps. La quantité d'énergie, principalement sous forme d'ATP, étant majoritairement issue de processus aérobie, la puissance énergétique d'un organisme est souvent estimée à travers son taux métabolique aérobie ou consommation d'oxygène (e.g. Fry, 1971 ; Wieser, 1985 ; Priede, 1985 ; Steffensen et al., 1994 ; Lefrançois et Claireaux, 2003 ; McKenzie et al., 2007 ; Milinkovitch et al., 2012 ; Lucas et al., 2013 in press, Chap. I).



**Figure 7** Subdivisions de la capacité métabolique aérobie en trois compartiments : l'allocation énergétique vers les fonctions vitales obligatoires (i.e. taux métabolique standard), l'allocation énergétique de routine et le surplus énergétique pour les activités non-obligatoires ou discrétionnaires. Modifié d'après Lefrançois (2001).

Cette énergie disponible est répartie en 3 niveaux (Fig. 8; Fry, 1971):

- le **taux métabolique actif** (« *Active Metabolic Rate* », **AMR**) représente la dépense énergétique maximale atteinte lors d'activités soutenues.
- le **taux métabolique de maintenance ou standard** (« *Standard Metabolic Rate*, **SMR**) correspond au niveau métabolique minimal nécessaire au maintien des fonctions vitales (e.g. ventilation, travail cardiaque, osmorégulation, etc.), mesuré à jeun, au repos et hors maturation sexuelle.
- le **taux métabolique de routine** (« *Routine Metabolic Rate* », **RMR**) assure le maintien d'activités non obligatoires comme la nage ou la digestion. Il oscille entre le SMR et l'AMR.



**Figure 8.** Représentation schématique des différents taux métaboliques : AMR, SMR, AMS

La différence entre le taux métabolique actif et le taux métabolique standard a été définie par Fry (1971) comme étant la **capacité métabolique aérobie** (« *Aerobic Metabolic Scope* », **AMS**). Elle représente le potentiel énergétique dont dispose l'animal pour réaliser l'ensemble de ses activités « non-obligatoires » ou discrétionnaires (e.g. croissance, reproduction, nage, digestion, etc., Fig. 7) et est de ce fait souvent appelée « *capacité pour l'activité* » (« *scope for activity* » en anglais). L'AMS est ainsi considérée par de nombreux auteurs comme un proxy

de la fitness de l'animal, c'est-à-dire un indicateur de sa capacité à survivre et se reproduire dans un environnement donné (Priede, 1985 ; Claireaux et Lefrançois, 2007).

La bioénergétique, au travers de la capacité métabolique, participe à une compréhension des interactions entre les organismes et leur environnement. Elle évalue la répartition de l'énergie au sein de l'organisme en fonction de ses besoins et des contraintes environnementales auxquelles il est soumis (Fry, 1971, Pörtner et Farrell, 2008 ; Pörtner, 2010). Ainsi, en 1971, Fry a établi une classification des facteurs environnementaux qui définit l'ensemble des liens fonctionnels entre un poisson et son environnement, concept revisité depuis par plusieurs auteurs (Priede, 1977, 1985 ; Evans, 1990 ; Claireaux et Lefrançois, 2007). Dans ce concept, le poisson est assimilé à un système ouvert dans lequel l'énergie circule. Les processus métaboliques qui transforment l'énergie brute (nourriture, matière organique) en énergie chimique (ATP) sont considérés comme le « moteur physiologique » produisant l'énergie nécessaire à l'ensemble des activités de l'animal. Ce terme d'activités s'applique aux régulations au niveau cellulaire ainsi qu'aux performances de l'individu en entier. Elle comprend : (i) le travail de biosynthèse tel que le renouvellement cellulaire ou la croissance, (ii) le travail osmotique comme les échanges d'ions et (iii) le travail mécanique comme la nage ou la ventilation. Ainsi, au cours de la vie de l'organisme, le taux métabolique fluctue entre l'AMR et le SMR en fonction de ses besoins quotidiens (Fig. 8). A travers des processus d'allocation énergétique, l'organisme doit gérer ses processus métaboliques pour ne pas être trop proche de ses limites physiologiques (Priede, 1985). L'augmentation de la capacité métabolique aérobie contribue à l'augmentation du potentiel énergétique de l'animal, et par conséquent à l'augmentation de la « marge de sécurité » c'est-à-dire l'écart entre son métabolisme de routine et son métabolisme actif (Fig. 8). Il est classiquement admis que les facteurs environnementaux interagissent les uns avec les autres et que leurs effets se combinent, fixant les limites et les conditions de l'adaptation au milieu et, au final, la capacité des organismes à croître, à survivre et à se reproduire (Fry, 1947).

### ***2.3. Classification des facteurs abiotiques selon Fry (1947, 1971)***

La capacité métabolique aérobie d'un organisme est influencée par certains facteurs (i) intrinsèques, comme le statut physiologique et le stade de développement, ou (ii) environnementaux, comme l'oxygène, la température ou les polluants, qui agissent sur le



déroulement des processus d'oxydation relatifs à la production d'énergie. Ces multiples facteurs, variables dans le temps, caractérisent les limites métaboliques à l'intérieur desquelles les organismes doivent évoluer. Ainsi, l'animal verra sa capacité métabolique aérobie fluctuer à travers des mécanismes physiologiques et la sélection de conditions environnementales optimales. Cette complexité des contraintes environnementales et de leurs effets a été reconnue par Fry (1947, 1971) ainsi que par plusieurs auteurs (Priede, 1977, 1985 ; Evans, 1990 ; Claireaux et Lefrançois, 2007). L'impact des facteurs environnementaux a principalement été mis en évidence via des études « mono-factorielles » qui peuvent être complétées par des études « multifactorielles » plus complexes se focalisant sur l'impact de 2 ou 3 facteurs environnementaux en même temps.

Fry propose donc un classement des facteurs environnementaux en se basant sur leurs effets au niveau du métabolisme aérobie. On retrouve ainsi 5 types de facteurs : contrôlants, létaux, limitants, masquants et directifs :

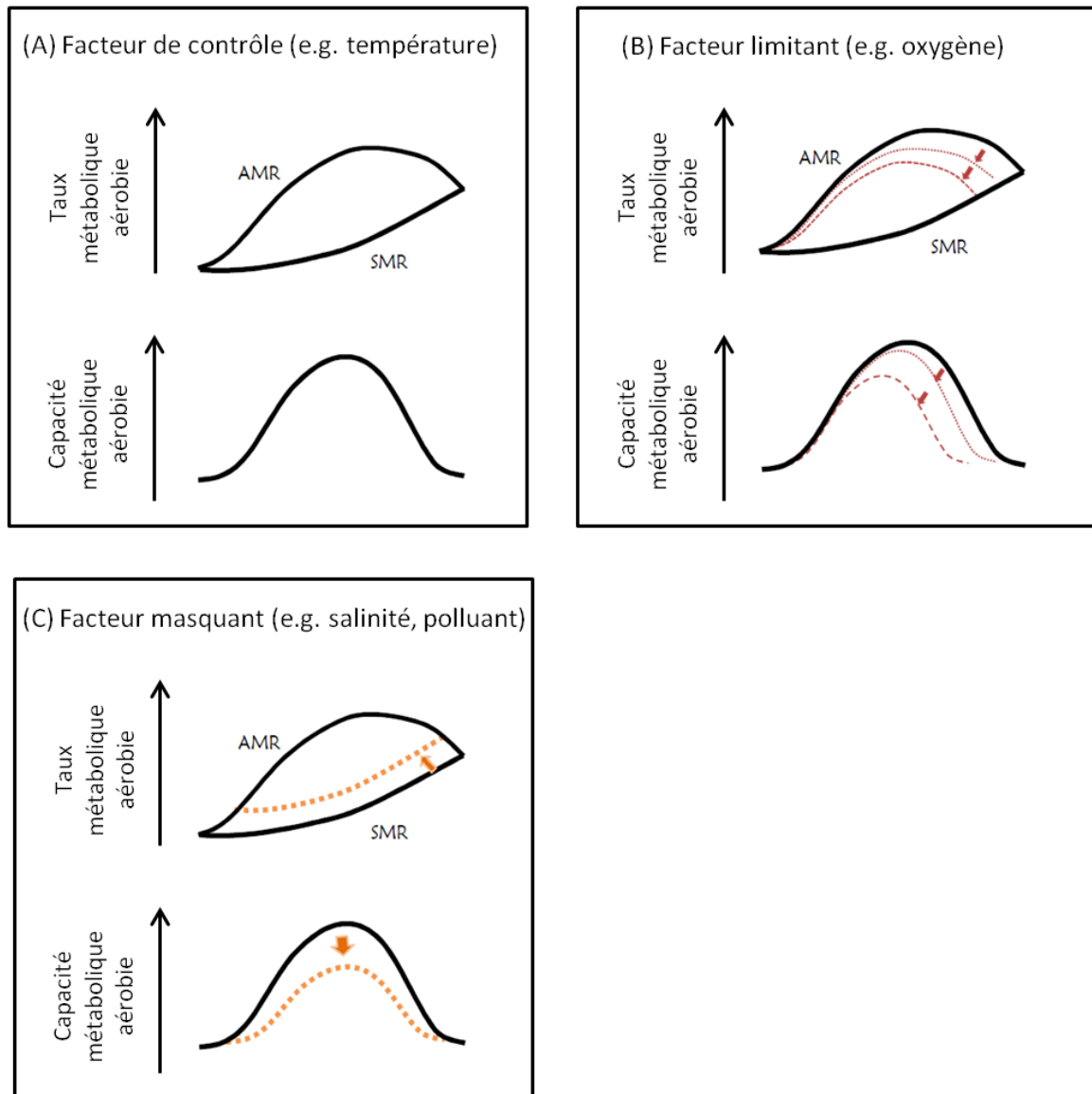
-Les **facteurs de contrôle** (Fig. 9) gouvernent les taux métaboliques actif et standard par leur influence sur la cinétique des réactions biophysiques et biochimiques impliquées dans le métabolisme énergétique. La température est considérée comme un des facteurs de contrôle les plus importants.

-Les **facteurs limitants** (Fig. 9B) soit par leur raréfaction (e.g. oxygène) soit par leur présence (e.g. **polluants**), ralentissent les processus métaboliques ce qui aboutit à la diminution du métabolisme actif de l'organisme.

Les **facteurs masquants** (Fig. 9C) augmentent le coût métabolique de maintenance entraînant une diminution de la capacité métabolique aérobie. Des conditions variables de salinité ou la présence de **polluant**, par exemple, vont engendrer un coût supplémentaire lié à l'osmorégulation ou la détoxification respectivement.

Les **facteurs létaux** provoquent la mort de l'organisme en bloquant les processus métaboliques. La mort de l'organisme dépend de son seuil de tolérance aux variations des facteurs environnementaux. Parmi eux, on retrouve la température, les **polluants** ou encore la concentration en oxygène ou en dioxyde de carbone.

Les **facteurs directs** comme la température, l'oxygène ou la photopériode, déclenchent des réponses comportementales et physiologiques. Ces facteurs orientent l'animal vers des habitats auxquels il est mieux adapté entraînant ainsi une variation des coûts métaboliques.



**Figure 9.** Représentation schématique des effets des facteurs de contrôle (A), limitants (B) et masquants (C) sur les taux métaboliques actif et standard (AMR, SMR) ainsi que les conséquences sur la capacité métabolique aérobie.

#### 2.4. Effet des facteurs environnementaux sur le métabolisme aérobie

La température et l'oxygène sont des facteurs de contrôle, limitants et directifs, primordiaux chez les poissons. Ils déclenchent des réactions comportementales participant à l'exploitation spatio-temporelle de l'environnement et, donc, à la distribution des espèces selon certains gradients (Magnuson et al., 1979). Par exemple, en influençant la cinétique des réactions métaboliques, la température apparaît comme le principal facteur de contrôle de la capacité métabolique de l'animal (Fry, 1971 ; Claireaux & Lagardère, 1999). Lefrançois & Claireaux (2003) ont ainsi montré une augmentation du SMR avec la température chez la sole *Solea solea*, ainsi qu'un AMR réduit au-delà de la gamme de tolérance thermique de l'animal. En condition hypoxique, c'est-à-dire lorsque la teneur en oxygène est faible, la capacité métabolique est également réduite chez la sole (Van den Thillart et al., 1998) et la morue de l'Atlantique *Gadus morhua* (Chabot & Dutil, 1999 ; Claireaux et al., 2000). Une diminution d'oxygène induit également des mécanismes physiologiques compensatoires -tels que l'augmentation de la fréquence de ventilation du poisson- qui induisent des coûts énergétiques supplémentaires et donc une augmentation du SMR (Fry, 1947, Steffensen et al., 1994 ; Schurmann & Steffensen, 1997 ; Lefrançois & Claireaux 2003 ; Davoodi & Claireaux, 2007) Lorsque la teneur en oxygène est critique, le métabolisme anaérobie est activé. Ayant un plus faible rendement énergétique en ATP (Fig. 6), les activités de l'animal sont réduites, mettant ainsi en jeu sa survie à plus ou moins long terme. La diminution en oxygène ou les variations de température peuvent induire des allocations énergétiques différentes et entraîner une diminution de la croissance (Claireaux et al., 2000 ; Taylor & Miller, 2001) ou de la reproduction (Wu et al., 2003) par exemple. Aussi, des variations de salinité dans l'environnement vont induire des processus d'osmorégulation au niveau des branchies induisant des coûts énergétiques supplémentaires et augmentant le SMR (Claireaux & Lagardère 1999 ; Johansen & Jones, 2011). De même, l'augmentation de la fréquence ventilatoire du poisson entraîne une augmentation de l'AMR. Les capacités d'osmorégulation étant limitées, si le seuil de tolérance d'osmolarité est dépassé, les organismes sont susceptibles de ne plus pouvoir fournir l'énergie nécessaire au maintien de leur homéostasie, mettant en cause leur survie.

Plusieurs études ont montré une altération de la capacité métabolique aérobie due à la présence de polluants (Nikinmaa, 1992 ; Wilson et al., 1994 ; Shingles et al., 2001 ; Pane et al., 2004 ; Lannig et al., 2006 ; Davoodi & Claireaux, 2007). Classés parmi les facteurs

limitants, les polluants sont susceptibles d'interférer, par exemple, avec la diffusion et le transport de l'oxygène dans le sang (e.g. métaux lourds, ammoniac Nikinmaa, 1992) et, donc, d'agir sur le taux métabolique maximal. L'exposition à l'ammoniac ou au didecyldiméthylammonium (DDAC) chez la truite arc en ciel engendre ainsi une réduction de l'AMR contribuant à une réduction de l'AMS (Shingles et al., 2001). Ces effets, dus à l'altération des branchies et donc à un apport en oxygène réduit, pourraient également être dus à un dysfonctionnement cardiaque (McKenzie et al., 2007). Également considérés comme des facteurs masquants, les polluants peuvent induire des coûts énergétiques supplémentaires par leur présence ou par les processus de défense et de détoxification associés à leur présence (i.e. enzymes antioxydantes, mécanismes de réparations cellulaires, protéines de stress ; Wendelaar Bonga, 1997 ; Van der Oost et al., 2003, Oliveira et al., 2008, Oliva et al., 2010) augmentant le taux métabolique standard (Lannig et al., 2006). Il en résulte une potentielle diminution de la capacité métabolique aérobie reflétant une diminution de la capacité du poisson à fournir l'énergie nécessaire à l'ensemble de ses activités (Priede, 1985 ; Evans, 1990 ; Claireaux et al., 2000). Ainsi, comme pour la température ou l'oxygène, le surplus énergétique alloué par exemple à la croissance ou à la reproduction risque d'être réduit. Cependant, plusieurs études suggèrent une absence d'effet des polluants organiques sur le métabolisme aérobie du mullet doré *Liza aurata* contaminé aux HAP (Milinkovitch et al. 2012), et de la sole commune *Solea solea* exposée aux PCB (Cannas et al., 2013). Seule l'étude de Davoodi & Claireaux (2007) met en évidence une diminution de 30% de l'AMS associée à une réduction de 27 % de l'AMR chez *Solea solea* suite à une exposition aiguë au pétrole brut.

**Les effets des HAP sur le métabolisme aérobie seront abordés chez le poisson zèbre *Danio rerio* dans les chapitres I, II et III. Dans les chapitres II et III, l'approche métabolique sera respectivement associée à l'estimation des performances de nage et cardiaques.**

### **3. Le système cardio-vasculaire et l'évaluation du rythme cardiaque**

Chez les animaux, l'oxygène est fourni aux organes grâce aux systèmes respiratoires et cardiovasculaires. Chez les poissons, après diffusion dans le sang à travers les branchies, l'oxygène est lié à l'hémoglobine, puis distribué dans l'organisme au même titre que les substrats énergétiques (e.g. acides gras, glucides) ou encore les hormones. L'oxygène est ensuite utilisé comme récepteur d'électrons dans la chaîne respiratoire (i.e. phosphorylation oxydative des substrats) pour la création d'ATP dans le but de répondre aux besoins métaboliques de l'animal.

Les performances cardiaques sont considérées comme un des facteurs limitants de la capacité métabolique aérobie d'un organisme (Priede 1983, Farrell 1997). En effet, la capacité métabolique aérobie d'un animal dépend entre autre de la capacité du système cardio-respiratoire à approvisionner les tissus en oxygène (Fry, 1947, 1971 ; Priede, 1977, 1983 ; Ware, 1982 ; Bennett, 1980 ; Lucas et al., 1993 ; Claireaux et al., 2005 ; Farrell, 2007). Chez les poissons, la limitation majeure est la capacité des branchies à extraire l'oxygène de l'eau, qui dépend principalement de la surface branchiale. Quand les besoins en oxygène augmentent, les activités ventilatoires et cardiaques augmentent activant en retour la diffusion en oxygène dans le sang et son transport vers les tissus par convection (Randall, 1982 ; Taylor et al., 1996 ; McKenzie et al. 2004 ; McKenzie 2011). Ainsi, l'importance des processus intervenant dans le transport de l'oxygène n'est pas à négliger. En effet, pour une meilleure efficacité du transport de l'oxygène, (i) les performances cardiaques, (ii) les processus de diffusion au travers de la surface branchiale vers le système circulatoire et (iii) les mécanismes d'échanges de gaz des tissus doivent être ajustés à la capacité d'échange des gaz au niveau des branchies.

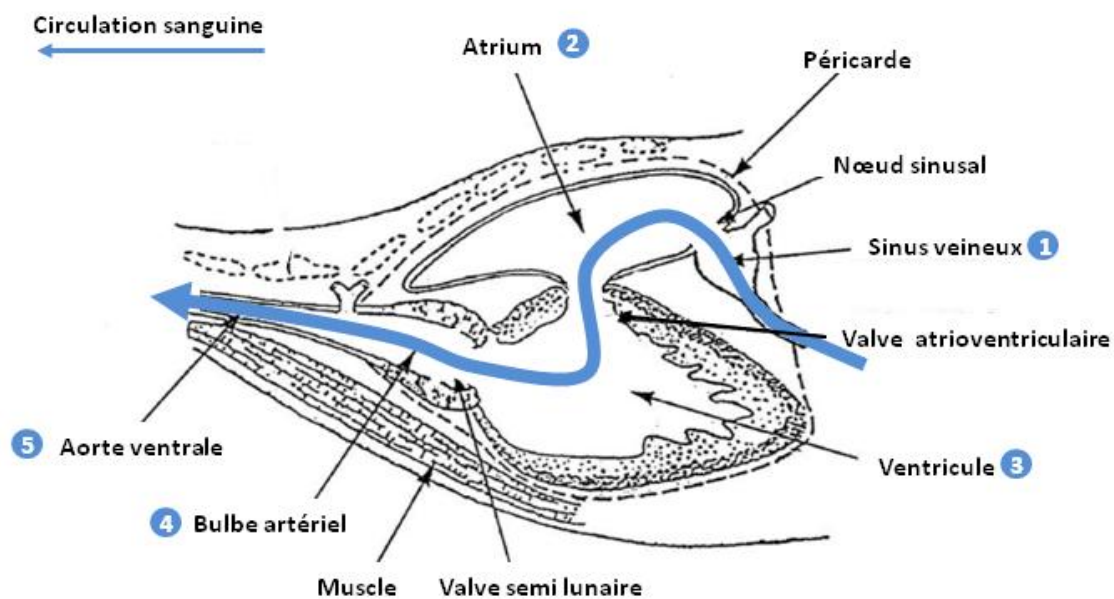
#### ***3.1. Anatomie cardiaque***

Le cœur d'un poisson téléostéen se divise en plusieurs parties (Fig. 10) :

- le **sinus veineux** reçoit le sang veineux depuis les veines hépatiques et jugulaires antérieures. Il permet un apport continu de sang au cœur. Constitué de tissus

spécialisés dans la stimulation cardiaque (i.e. cellules de pacemaker), il initie et contrôle le rythme cardiaque (Santer, 1985 ; Satchell, 1991).

- l'**atrium** présente une fine paroi peu extensible qui permet d'envoyer le sang vers le ventricule suite à une petite pression d'impulsion. Chez les téléostéens, il présente la particularité d'avoir un volume quasiment identique au ventricule.
- le **ventricule** présente une paroi musculaire plus épaisse. La contraction ventriculaire, plus puissante que la contraction atriale, permet l'éjection du sang vers les branchies.
- le **bulbe artériel** se caractérise par un épaissement de la paroi de l'aorte ventrale. Cette paroi non contractile s'étend à chaque battement cardiaque afin d'absorber le flux sanguin éjecté par le ventricule créant ainsi un flux plus continu. Le sang entre dans la circulation branchiale via l'aorte ventrale (5).



**Figure 10.** Représentation schématique du cœur d'un poisson. La flèche bleue indique le sens de la circulation sanguine. D'après Satchel (2011).

### 3.2. Evaluation des performances cardiaques à travers la fréquence cardiaque

Les performances cardiaques peuvent être évaluées via plusieurs indicateurs :

- le débit cardiaque  $Q_c$  qui représente la quantité de sang qui sort de l'aorte par minute (ml par minute),
- le volume d'éjection systolique  $V_{es}$  correspondant au volume de sang éjecté à chaque contraction cardiaque (en ml par battement),
- la **fréquence cardiaque**  $F_c$  qui représente le nombre de battements cardiaques par minute.

Ces variables sont liées par l'équation suivante du débit cardiaque :

$$Q_c = F_c \cdot V_{es}$$

Elles-mêmes sont liées à la consommation d'oxygène via l'équation de Fick :

$$V_{O_2} = Q_c \cdot (CaO_2 - CvO_2)$$

Avec  $V_{O_2}$  la quantité d'oxygène fixée dans le sang (en ml par minute),  $Q_c$  le débit cardiaque décrit ci-dessus (en l par minute),  $CaO_2$  le contenu en oxygène du sang artériel et  $CvO_2$  le contenu en oxygène du sang veineux (en ml par l).

Priede (1985) et Lucas (1993) suggèrent que l'analyse des variations de la  $F_c$  permet d'étudier l'état énergétique du poisson dans un environnement donné. Bien que la fiabilité du rythme cardiaque en tant qu'indicateur du taux métabolique soit débattue par de nombreux auteurs (Armonstrong, 1986 ; Lucas et al., 1991 ; Thorarensen et al. 1996, Webber et al., 1998), cette variable a été évaluée dans le présent travail de thèse (Chap. III). En effet, **l'étude de la  $F_c$  permet d'avoir une mesure non invasive d'un des mécanismes cardiovasculaires dont dépendent les performances cardiaques.** Chez le poisson zèbre, les stades de développements larvaires rendent également possible l'évaluation de la  $F_c$  par transparence. Ainsi le rythme cardiaque a été mesuré dans notre étude par transparence au stade larvaire (i.e.

5 jours post fertilisation) de poisson zèbre. Cet indicateur du fonctionnement de la pompe cardiaque est sensible aux stress environnementaux.

### ***3.3. Impact des HAP sur les performances cardiaques***

Les variations physico-chimiques de l'environnement, comme la température et l'oxygène, ont une forte influence sur les performances cardiaques des poissons (Randall, 1968 ; Satchell, 1991 ; Farrell & Jones, 1992 ; Farrell et al. 1996 ; Farrell, 1997 ; Lefrançois et al. ; 1998). Un rythme cardiaque très élevé, par exemple, est un indicateur de stress environnemental chronique chez le poisson (Priede, 1983). Priede (1983) suggère que lorsque le rythme cardiaque d'un organisme se rapproche de ses limites physiologiques, la probabilité de mortalité de celui-ci augmente. De la même manière, un taux métabolique trop proche des limites énergétiques de l'animal peut engendrer la mort de celui-ci. La détermination du rythme cardiaque peut donc apporter un complément d'information sur l'impact de pressions environnementales exercées sur les organismes. Chez les vertébrés, le cœur est l'un des organes les plus sensibles et les plus affectés par les xénobiotiques tout comme les reins, les gonades ou encore le foie (Hoffman, 2003). L'altération de l'organe dépend du type de polluant, de sa concentration ainsi que de l'espèce considérée (Barton, 2002 ; Hoffman, 2003). Ces travaux, portant sur les dysfonctionnements cardiaques en relation avec les polluants, se sont focalisés ces dernières années sur les stades précoces de poissons soumis à des contaminations chroniques ou aiguës (Billiard, 2006, Incardona et al, 2004 et 2006 ; Wassenberg & Dio Giulio, 2004b ; Wassenberg et al., 2005). Les études d'Incardona et al. (2004, 2005, 2009, 2011) ont mis en évidence plusieurs effets néfastes des HAP sur le cœur d'embryons de poissons. Chez le Hareng du Pacifique *Clupea pallasii*, l'exposition au pétrole brut induit une brachychardie (i.e. diminution importante du rythme cardiaque) et une arythmie irrégulière (Incardona, 2005, 2009). De même, l'utilisation d'anticorps spécifiques pour marquer l'atrium et le ventricule du poisson (i.e. les anticorps MF20 et S46) a permis de mettre en évidence des dysfonctionnements dans la mise en place du cœur chez le poisson zèbre, induisant des malformations cardiaques ainsi que des œdèmes péricardiques suite à une exposition aux HAP (Incardona et al. 2004, 2011). L'étude de Hicken et al. (2011) met en avant les effets cardiotoxiques (e.g. arythmies, malformations) des HAP via l'exposition d'embryons à de fortes concentrations de pétrole brut. Les effets délétères des HAP au niveau cardiovasculaire peuvent se traduire à long terme par une altération des performances de l'organisme telles que la nage.

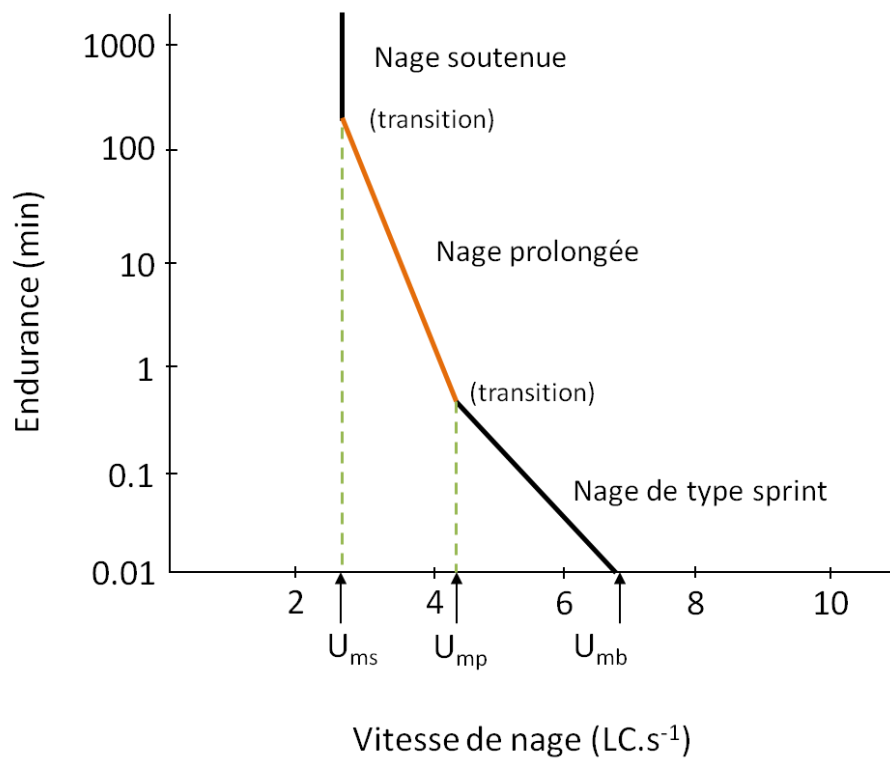


#### **4. Performances locomotrices**

Comme pour de nombreuses espèces, les performances de locomotion sont considérées comme un caractère déterminant pour la survie des poissons dans un environnement donné (Jones et al., 1974 ; Taylor & McPhail, 1986 ; Graham et al., 1990; Rome et al., 1992a ; Young & Cech, 1993 ; Stobutzki & Bellwood, 1994 ; Domenici & Blake, 1997 ; Swanson, 1998 ; Billeberk et al., 2001 ; Lankford et al., 2001 ; Ghalambor et al., 2003 ; Walker et al., 2005). En effet, les performances natatoires sont déterminantes pour la recherche de nourriture, les relations proies-prédateurs, l'évitement d'un danger, les migrations ou encore la reproduction (Videler, 1993 ; Reidy et al., 1995 ; Drucker & Jensen, 1996 ; Watkins, 1996 ; Walker et al., 2005). Toute altération des capacités de nage est donc susceptible d'influencer les interactions entre les individus, la croissance et leur survie.

Les poissons présentent différents types de nage qui peuvent être classés en trois catégories en fonction de la durée de l'effort, des muscles sollicités et des substrats énergétiques utilisés (Beamish, 1978 ; Webb, 1993, 1998 ; Fig. 11). La **nage aérobie soutenue** (i.e. « *sustained aerobic swimming* » en anglais) correspond à un effort enduring du poisson sur une longue période (i.e. supérieure à 200 minutes) sans fatigue musculaire (Fig. 11). Elle peut être observée lors d'explorations de l'habitat ou durant les migrations. Ce type de nage purement aérobie sollicite les muscles rouges (Webb, 1998). Le second type de nage correspond à **un effort intense de courte durée** (i.e. inférieur à 20 secondes) de type **sprint** appelé également « *burst swimming* » en anglais. Elle est typiquement rencontrée pendant les périodes d'accélération, au cours desquelles la nage est instable, comme par exemple un sprint ou un départ rapide (i.e. *fast-start*) lors de la **réponse de fuite** face à un prédateur. Elle sollicite, quant à elle, les muscles blancs caractéristiques d'une activité **anaérobie** (Webb, 1998). Entre ces 2 extrêmes, il y a la **nage prolongée** (i.e. « *prolonged swimming* »). D'une période moins longue que la nage aérobie soutenue (i.e. entre 20 secondes et 200 minutes), elle implique le recrutement de tous les types de fibres musculaires (i.e. rouges et blancs) et donc l'utilisation du métabolisme aérobie et anaérobie. Au cours de ce type de test, le travail musculaire est très majoritairement aérobie et est aussi associé à une augmentation de la demande en oxygène avec la vitesse de nage (Brett, 1964 ; Beamish, 1978 ; Webb, 1993 ; Domenici & Kapoor, 2010). Si la  $U_{crit}$  dépend de la capacité de l'organisme à utiliser l'oxygène et à fournir l'énergie nécessaire à ce type d'effort prolongé, elle dépend aussi du

métabolisme anaérobie. En effet, lorsque la demande métabolique aérobie des muscles rouges dépasse la capacité en oxygène et en nutriments des systèmes respiratoires et cardiovasculaires (Brett, 1964 ; Claireaux, 2005), les muscles blancs sont recrutés et le métabolisme anaérobie déclenché (Peake & Farrell, 2004). Ce type de nage peut être évalué via notamment l'estimation de la vitesse de nage critique  $U_{crit}$  (Brett, 1964 ; Beamish, 1978 ; Hammer, 1995; Plaut, 2001).



**Figure 11.** Identification des différents types de nage soutenue, prolongée et départ rapide et vitesse de nage associée.  $U_{ms}$ = vitesse soutenue maximale,  $U_{mp}$ =vitesse prolongée maximale,  $U_{mb}$ =vitesse « *burst* » maximale. La vitesse de nage critique  $U_{crit}$  se situe au niveau de la droite orange. Repris d'après Bainbridge (1962)

Dans le présent travail de thèse, j'ai étudié plus particulièrement la vitesse de nage critique (Chap. II) et le comportement anti-prédateur (i.e. *fast-start*, Chap. IV) du poisson zèbre.

#### **4.1. La vitesse de nage critique**

##### *4.1.1. Evaluation de la $U_{crit}$*

La  $U_{crit}$  permet d'évaluer les performances natatoires du poisson au niveau individuel à travers un challenge de nage standardisé au cours duquel la vitesse de nage est augmentée par palier (Brett, 1964 ; Hammer, 1995). L'évaluation de la  $U_{crit}$  nécessite l'utilisation d'un tunnel de nage dans lequel il est possible de contrôler la vitesse du courant et donc la vitesse de déplacement de l'animal. Le poisson, placé dans une chambre de nage, est en effet contraint à nager à contre-courant. L'évaluation de la  $U_{crit}$  est cohérente et répétable sur de nombreuses espèces de poissons à court ou long terme (Jain et al., 1998 ; McKenzie et al., 2007b). Créée pour jauger et comparer les performances de nombreuses espèces, cette méthode est de plus en plus utilisée notamment pour évaluer expérimentalement l'impact de facteurs environnementaux (Cairns, 1966 ; Sprague, 1971 ; Hammer, 1995 ; Domenici & Kapoor, 2010).

##### *4.1.2. Impact des facteurs environnementaux sur la $U_{crit}$*

De nombreuses études se sont focalisées sur l'impact de la température (Taylor et al., 1997 ; Farrell, 2007 ; Rome et al., 2007), de l'oxygène (Diaz, 2001 ; Diaz et al. 2004) ou encore de la salinité (Brauner et al., 1992, 1994 ; McKenzie et al., 2001a,b ; Chatelier et al., 2006) sur les performances de nage des poissons. Concernant la température, les poissons étant poïkilothermes, leur température corporelle varie avec celle du milieu, modulant ainsi les réactions biochimiques et physiologiques de l'organisme en fonction de la température ambiante. Il a été démontré par exemple que les performances de nage sont maximales lorsque l'organisme évolue dans son optimum thermique, mais réduites aux limites de température tolérées par l'organisme (Brett, 1971 ; Brett & Glass, 1973 ; Hammer, 1995 ; Domenici et al., 2000 ; Claireaux et al. 2006). Aussi, les variations de températures agissent sur les capacités de contraction des muscles (Rome et al., 1984 ; Randall & Brauner, 1991 ; Rome, 1990, 1992, 2007). Une faible disponibilité en oxygène ou l'acidification du milieu par le dioxyde de carbone sont également des facteurs limitant des performances de nage. En réduisant les apports en oxygène (Bushnell et al., 1984) ou les capacités de transport de ce dernier (Heisler, 1984, 1993 ; Randall & Brauner, 1991), ils réduisent les performances

métaboliques et natatoires du poisson (Davis et al. 1963).

Enfin, Cairns (1966) et Sprague (1971) ont les premiers suggérés l'utilisation des performances de nages aérobies en tant qu'indicateur des effets sub-létaux de polluants. Depuis, de nombreuses études ont démontré une réduction de la  $U_{crit}$  suite à une exposition aux métaux (e.g. Waiwood & Beamish, 1978 ; Wilson et al., 1994 ; Beaumont et al., 1995a, 2003 ; Alsop et al., 1999 ; Pane et al., 2004 ; Thomas et al. 2013), à l'ammoniac (e.g. Shingles et al. 2001, Wicks et al., 2002 ; McKenzie et al. 2003b), ou encore aux polluants organiques persistants comme les PCB (Peterson, 1974) ou les 2, 3, 7, 8,-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (i.e. TCDD, Marit & Weber, 2012). L'action des polluants varie en fonction du type de polluant et du mode d'exposition. Par exemple, dans le milieu aquatique, de fortes concentrations de polluants peuvent induire directement des altérations branchiales (Fracàcio et al., 2003). Par ailleurs, en interférant avec les échanges gazeux de l'organisme, ils limitent le taux métabolique actif et réduisent les performances de nage (Pane et al., 2004; Thomas et al., 2013). L'impact des métaux a été particulièrement bien décrit dans la littérature. Par exemple, en interférant avec l'excrétion d'ammoniac, le cuivre et le zinc induisent son accumulation dans le plasma sanguin. Cette accumulation implique une dépolarisation des muscles blancs compromettant leur recrutement lors d'effort intense réduisant ainsi la  $U_{crit}$  (Beaumont et al, 1995, 2003 ; Alsop et al., 1999 ; McKenzie et al. 2006). Une contamination précoce au 2,4-dinitrophenol (DNP), par exemple, interfère avec le transport d'oxygène en découplant la phosphorylation oxydative et en transportant les protons à travers la membrane mitochondriale. Il s'en suit une augmentation rapide de la consommation en oxygène couplée à une faible production d'ATP. L'énergie alors disponible est moindre, ce qui va limiter les performances de nage et la  $U_{crit}$  des poissons (Marit & Weber, 2011).

L'étude de l'impact des polluants persistants est plus récente que les métaux par exemple. Malgré l'intérêt porté sur ce type de polluant depuis des dizaines d'années, le peu d'études qui existent ne permette pas de dégager une tendance claire des effets. Par exemple, une réduction des performances de nage des poissons zèbres adultes a été mise en évidence suite à une exposition précoce au TCDD (Marit & Weber, 2012). En induisant des malformations cardiaques, cette contamination limite la circulation sanguine périphérique et donc l'apport en oxygène dans les organes. Aussi, il a été observé une mauvaise mobilisation des réserves énergétiques (e.g. triglycérides) expliquant, entre autre, la diminution des performances de nage. A l'inverse, plusieurs études ont suggéré l'absence d'effet des

polluants organiques persistants sur les performances métaboliques et natatoires des poissons (Brauner et al., 1994 ; MacKenzie et al., 2007 ; Milinkovitch et al., 2012). McKenzie et al. (2007) a étudié l'impact de mélanges complexes de polluants sur les performances physiologiques des poissons en milieu naturel dans une rivière polluée. Aucun impact des PCB sur la  $U_{crit}$  de la truite arc en ciel n'a été observé. L'effet potentiel des HAP seuls n'a cependant pas été mesuré dans cette étude. Enfin, l'étude de Milinkovitch et al. (2012) confirme ces résultats avec une exposition au pétrole brut qui ne diminue pas la  $U_{crit}$  ni la capacité métabolique du mulot doré *Liza aurata*).

## 4.2. Le Comportement anti-prédateur

### 4.2.1. Définition

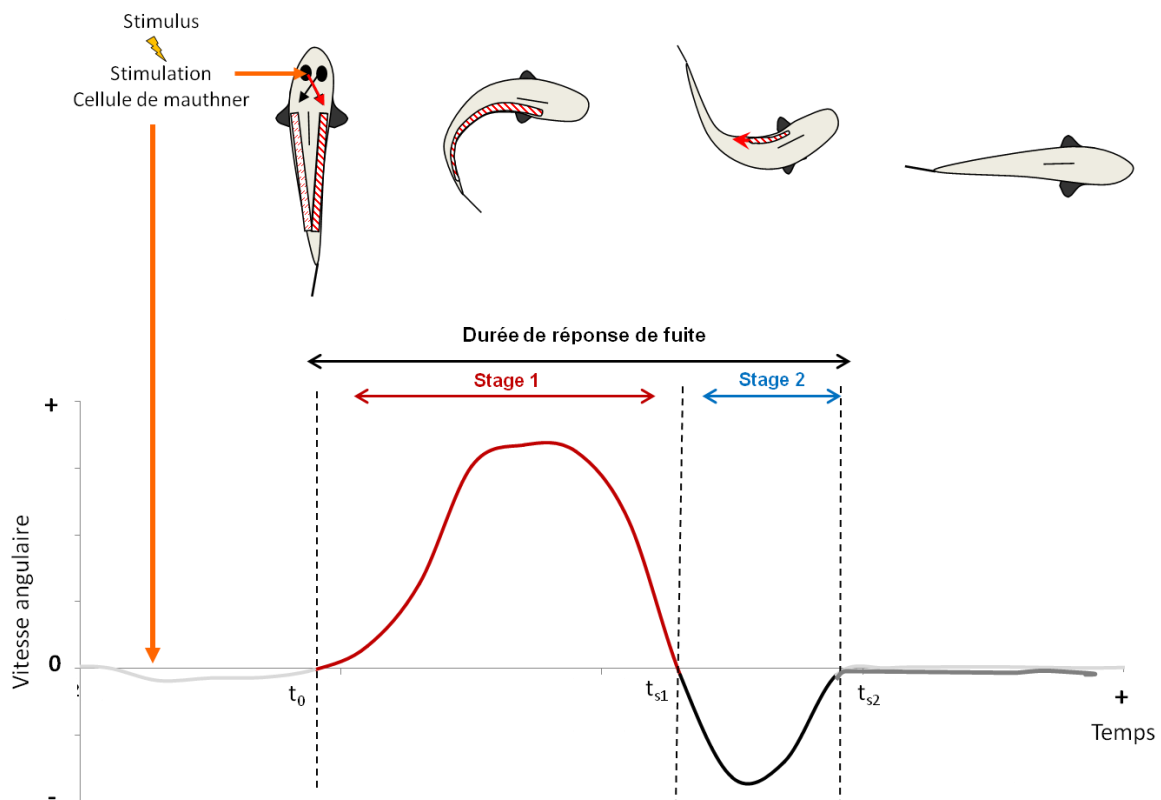
Le comportement de réponse de fuite fait partie des mécanismes « réflexes » observés lors des interactions entre une proie et son prédateur (Walker et al. 2005), dont l'issue dépend en grande partie des performances de nage de chacun. La réponse de fuite est aussi appelée *fast-start* (i.e. départ rapide) et correspond à une brusque accélération du poisson depuis une position de repos suite à une stimulation externe telle que l'approche d'un prédateur (Domenici & Blake, 1997 ; Wakeling, 2000). Ce type de nage rapide s'observe sur un laps de temps très court de moins d'une seconde. Très coûteuse en énergie, il se base sur le recrutement des muscles blancs anaérobies (Domenici et al. 1997).

Deux types de *fast-start* ont été décrits selon la forme du corps de l'animal après la première contraction musculaire (Webb, 1976; Eaton et al., 2001) : (i) Le S-start correspond généralement à l'attaque d'un prédateur alors que (ii) le C-start, correspond plutôt à la fuite d'une proie. C'est ce second type de *fast-start* qui a été considéré dans notre étude.

### 4.2.2. Le C-start

Weih's (1973) est le premier à avoir décrit les trois phases du C-start. Les cellules de Mauthner sont à l'origine du déclenchement du C-start (Eaton et al., 1981 ; Eaton & Hackett, 1984 ; Eaton et al., 1991 ; Eaton & Emberley, 1991). Ces neurones de grande taille sont placés de part et d'autre du cerveau, la cellule placée à gauche étant reliée à la musculature latérale

droite et inversement (A, Fig. 12). La stimulation d'un de ces neurones entraîne une brusque contraction musculaire unilatérale généralement du côté opposé au danger (i.e. musculature controlatérale). Le poisson se courbe alors en forme de « C » ce qui constitue la première étape de la réponse de fuite (*stage 1*, Fig. 12). Puis intervient une seconde phase (i.e. phase propulsive ou *stage 2*, Fig. 12) durant laquelle il change de direction suite notamment à la contraction musculaire de l'autre côté du corps (i.e. musculature ipsilatérale du côté du stimulus, Domenici et Blake, 1997). Enfin, durant la troisième phase qui est variable, le poisson se déplace avec une nage continue ou se laisse glisser avec l'énergie cinétique acquise au cours de la deuxième phase. Dans la plupart des cas, les phases 1 et 2 (*stage 1* et *stage 2*) sont observées, le C-start est alors dit *double-bend*. Lorsqu'elle ne présente que la première étape (*stage 1*), elle sera appelée *single-bend* (Domenici et al., 1997). Dans ce cas-là, le poisson se redresse mais ne change pas de direction.

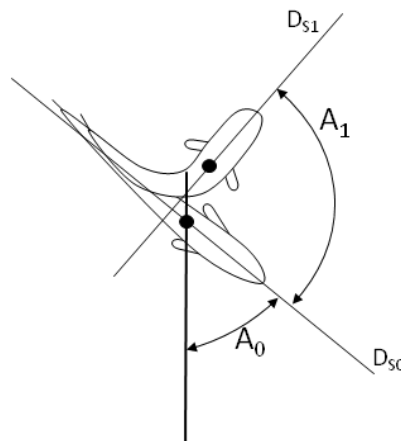


**Figure 12.** Représentation schématique de la réponse de fuite d'un poisson.

La réponse de fuite ou *C-start* joue un rôle primordial lors des rencontres entre proie et prédateur déterminant la survie de la proie. Le succès de la réponse de fuite dépend de

plusieurs variables liées aux performances de locomotion de la proie potentielle (Weihs, 1973 ; Webb, 1976, 1978a ; Domenici & Blake, 1991; Kasapi et al., 1993) :

- La **durée de réponse** de fuite qui correspond à la durée de l'étape 1 (i.e. de  $t_0$  à  $t_{s1}$ ) et de l'étape 2 (i.e. de  $t_{s1}$  à  $t_{s2}$ , Fig. 12). Une longue réponse de fuite réduira les chances de survie de l'organisme (Domenici & Blake, 1997 ; Domenici & Kapoor, 2010).
- La **vitesse maximale** atteinte par le poisson au cours de la réponse de fuite. Plus la vitesse est élevée, plus le poisson fuit rapidement augmentant ainsi ses chances de survie.
- L'**angle parcouru** par la partie antérieure du corps pendant l'étape 1 ( $A_1$ , qui correspond à l'angle entre la droite  $D_0$  et la droite  $D_{S1}$  qui passe par l'axe du poisson respectivement à  $t_0$  et à  $t_{s1}$ , Fig. 12 & 13). Il nous renseigne sur l'amplitude de la réponse et la capacité de l'organisme à manœuvrer, c'est-à-dire à changer de direction face au stimulus de danger.
- La **vitesse angulaire** pendant l'étape 1, exprimée en  $\text{degré.ms}^{-1}$ . Elle est calculée à partir de  $A_1$  et la durée de cette même étape. Comme la vitesse maximale, elle influence les capacités de fuite du poisson et donc sa survie.



**Figure 13.** Illustration des variables angulaires. (D'après Lefrançois, 2005).  $D_{S0}$  représente la ligne passant par le centre de masse et la tête du poisson à  $t_0$  (i.e. au moment de la stimulation),  $D_{S1}$  la ligne passant par le centre de masse et la tête du poisson à la fin du *stage 1* (i.e. à  $t_{s1}$ ),  
 $A_1$  : angle parcouru pendant le *stage 1*.

Associées aux performances locomotrices, les performances sensorielles d'un organisme vont influencer ses capacités à détecter et réagir à la stimulation. Elles sont associées à des variables indicatrices de la réactivité du poisson et apparaissent comme pertinentes, même si peu considérées, dans toutes les études explorant les capacités de réponse de fuite d'un organisme (Lefrançois et al. 2005 ; Lefrançois & Domenici 2006). Parmi ces variables, on trouve :

- le **taux de réponse** qui est déterminé par le nombre d'individus qui réagissent à la stimulation.
- La **direction** de la réponse qui correspond au premier mouvement de la tête du poisson à  $t_0$  ; soit le mouvement du poisson est vers le stimulus, soit il est à l'opposé du stimulus. Elle a un impact non négligeable sur le succès de la fuite et la survie du poisson.
- la **latence** qui correspond au temps entre la stimulation au temps  $t_s$  (i.e. au moment de l'impact du stimulus à la surface) et le premier mouvement de la tête du poisson suite à cette stimulation au temps  $t_0$  (Fig. 12 ; Webb, 1986 ; Domenici & Blake, 1997 ; Domenici, 2002 ; Blake, 2004 ; Walker et al., 2005). Plus le temps de réponse sera long, plus les chances de survie de l'animal sont réduites.

Dans les études des performances de fuite, il est nécessaire de mesurer l'ensemble de ces variables pour représenter les performances de fuite globales du poisson face à l'attaque d'un prédateur. Il a été démontré chez de nombreuses espèces que les performances de fuite étaient sous l'influence de variables environnementales.

#### *4.2.3. Impacts des facteurs environnementaux sur la réponse de fuite*

De nombreuses études concernant les performances de fuite se sont focalisées sur la biomécanique de ce type de nage (Domenici & Blake, 1997 ; Bergstrom, 2002 ; Domenici, 2002 ; Domenici et al., 2004). Quelques études se sont également intéressées à l'impact de facteurs environnementaux. La température est le facteur le plus étudié, ayant des effets sur les performances sensorielles et/ou locomotrices (Fleming et al. 1990 ; Johnston & Temple 2002 ; Preuss, 2003). Par exemple, de faibles températures peuvent réduire la vitesse de conduction du message nerveux suite à une stimulation, augmentant ainsi la latence de la réponse de la proie face aux stimuli de danger (Webb, 1978 ; Preuss & Faber, 2003) et donc sa vulnérabilité. De plus, lorsqu'un poisson se trouve dans des conditions optimales, il se



dirigera préférentiellement à l'opposé de la stimulation, s'éloignant ainsi du potentiel danger. De fortes variations de température induisent une altération de la direction, le poisson se dirigeant vers la stimulation (Johnsso & Benett, 1995 ; Preuss et Faber, 2003). L'impact de l'oxygène a été, quant à lui, moins étudié puisque l'activité locomotrice au cours du *fast-start* dépend du métabolisme anaérobie (§2.2, Domenici & Blake, 1997). Ainsi, si aucun effet n'a été observé sur la vitesse maximale, la distance cumulée ou encore l'accélération chez le bar (Lefrancois & Domenici, 2006), quelques effets liés à l'hypoxie ont cependant été mis en évidence chez les variables liées au système neuro-sensoriel. La réduction du taux de réponse chez le bar commun *D. labrax* (Lefrancois & Domenici, 2006) suggère, par exemple, une réduction de la sensibilité acoustique et visuelle lors d'hypoxie. La direction est également affectée évoquant une altération de la discrimination gauche-droite des individus et donc une mauvaise perception du stimulus.

Les études concernant les polluants sont réduites à l'ammoniac et quelques métaux lourds. L'ammoniac est connu pour être neurotoxique pour tous les vertébrés, affectant, par exemple, la transmission musculaire (Raabe & Lin, 1985 ; Ip et al., 2001 ; Randall & Tsui, 2002 ; McKenzie et al., 2003). Dans leur étude, McKenzie et al. (2008) démontre l'effet négatif de l'ammoniac sur la réactivité et la locomotion du mulot doré (*Liza aurata*). Bien que la direction et le taux de réponse ne soient pas affectés, la latence augmente avec la concentration de polluant. De plus, l'ammoniac augmente les proportions de « *single bend* », altérant particulièrement les variables locomotrices telles que la distance parcourue, la vitesse maximale ou encore l'accélération. Enfin, l'étude des métaux lourds, tels que le mercure ou le cadmium, a permis de mettre en évidence une réduction du taux de réponse, une augmentation de la latence et de la vitesse de réaction chez le bar commun *Dicentracus labrax* (Faucher et al., 2006) et le poisson zèbre *D. rerio* (Weber, 2006). L'altération des performances sensorielles est liée dans les deux cas à des dysfonctionnements au niveau de la ligne latérale. Ceci peut s'expliquer par les propriétés neurotoxiques des métaux qui vont interférer dans la détection de toute stimulation mécano-acoustique et altérer la transmission du signal nerveux.

A l'heure actuelle, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact des HAP sur les performances de fuite des poissons. Pourtant, de par leurs propriétés génotoxiques, mutagènes et carcinogéniques, les HAP peuvent causer des malformations. Des malformations au niveau musculaire pourraient avoir un impact direct sur les performances locomotrices (e.g. vitesse maximale, accélération, distances parcourues) en réduisant la contraction musculaire limitant

la manœuvrabilité durant la réponse. De même, de par ces propriétés, l'exposition au HAP pourrait interférer avec la mise en place du système nerveux et plus particulièrement les cellules de Mauthner ou bien la ligne latérale du poisson, structures impliquées dans la détection du stimulus (Eaton et al., 2001).



---

**Chapitre I : Métabolisme aérobie du  
poisson zèbre *Danio rerio* exposé aux  
hydrocarbures aromatiques polycycliques  
d'origine pyrolytique**

---



## Résumé

Les HAP sont des polluants toxiques et ubiquistes présents dans l'environnement sous forme de mélanges qui diffèrent selon leurs origines. Les HAP de type pyrolytique sont émis lors de la combustion partielle de la matière organique (e.g. gaz d'échappement, feux), puis retombent dans les milieux aquatiques via les dépôts atmosphériques. Au contraire, les HAP d'origine pétrogénique proviennent de rejets naturels, suintements de pétrole ou d'événements accidentels pétroliers. En fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de leur toxicité, les HAP sont susceptibles d'affecter certaines fonctions biologiques clés telles que la croissance (Heintz, 2007; Kim et al., 2008; Meador, Sommers, Ylitalo, & Sloan, 2006) ou la reproduction (Collier *et al.* 1992 ; Seruto et al. 2005) ce qui peut, en conséquence, impacter le développement des populations de ces organismes. En plus de la concentration et du type de polluant, les effets pouvant être mise en évidence dépendent de la voie et de la durée de contamination ainsi que du niveau d'organisation biologique ciblé (i.e. de la molécule à l'individu).

Dans ce premier chapitre, l'impact d'une contamination par voie trophique à des concentrations sublétales de HAP pyrolytiques a été étudié sur la **capacité métabolique aérobie** du poisson zèbre *Danio rerio*. Ces effets sont observés (i) à différents stades de développement correspondant à 2 durées de contamination (i.e. juvéniles de 2 mois et adultes de 6mois F<sub>0</sub>), ainsi que (ii) sur leur descendance F<sub>1</sub> âgée de 2 mois dans le but d'explorer les effets du transfert parental de la contamination. La capacité métabolique aérobie est une variable biologique permettant l'estimation de l'énergie dont l'animal dispose pour ses activités, telles que la locomotion, la digestion, ou la croissance. Cette fonction intégratrice des variations environnementales est considérée comme une valeur prédictive de la fitness de l'organisme (Priede, 1985 ; Claireaux et Lefrançois, 2007). La capacité métabolique aérobie d'un organisme est connue pour être influencée par les facteurs environnementaux qui agissent sur le déroulement des processus d'oxydation relatifs à la production d'énergie (Fry, 1947, 1971). Seules quelques études se sont intéressées à l'impact des HAP suggérant dans l'ensemble qu'une contamination chronique aux HAP n'affecte pas la capacité métabolique aérobie (Davoodi & Claireaux 2007; McKenzie et al. 2007; Milinkovitch et al. 2012).

Dans ce cadre, deux hypothèses principales ont été testées dans ce travail :

- L'exposition aux HAP de type pyrolytique induit une diminution de la capacité métabolique aérobie suite à (i) une réduction du taux métabolique actif (AMR, p.25) et/ou (ii) une augmentation du taux métabolique standard (SMR, p.25) due à la mise en place de processus de défense et de détoxification de l'organisme qui engendreraient des coûts énergétiques supplémentaires (Lannig et al. 2006).
- L'exposition aux HAP engendrerait un stress chez les géniteurs induisant la production d'hormones de stress telles que le cortisol. Transférée dans les œufs, ces hormones peuvent influencer la capacité métabolique de la descendance (McCormick, 1999)

Aucune modification des taux métaboliques actif et standard, ni de la capacité métabolique aérobie, n'a été observée quelle que soit la concentration à laquelle ils ont été exposés par voie trophique (i.e. 0.3X, 1X, 3X avec  $X=5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de nourriture, en poids sec), le temps d'exposition (i.e. 2 ou 6 mois), ainsi que la génération considérée (i.e. génération directement exposée  $F_0$  ou descendance  $F_1$ ). Ces résultats suggèrent que, dans nos conditions expérimentales, le métabolisme aérobie de l'individu ne serait pas impacté par l'exposition aux HAP et, par ce biais, ni la réalisation des activités coûteuses en énergie, ni la fitness de l'animal. Il se pourrait cependant que l'absence d'effet soit due à des mécanismes compensatoires à des niveaux d'organisation biologique inférieurs, au niveau de l'organe ou de la cellule, qui ne seraient pas visibles à l'échelle individuelle.

Si les performances de nage du poisson dépendent de la capacité métabolique aérobie et du transport de l'oxygène dans l'organisme, elles dépendent aussi du métabolisme anaérobie, de la puissance musculaire ou encore de la morphologie de l'animal. Ainsi, les performances de nage seront étudiées dans le chapitre II afin d'apporter un supplément d'information via une approche permettant de contrôler l'activité du poisson. Contrairement à cette étude de respirométrie statique, les deux types de mélanges de HAP (i.e. pyrolytique et pétrogénique) seront testés.

**Trophic contamination by pyrolytic polycyclic aromatic hydrocarbons does not affect aerobic metabolic scope in zebrafish *Danio rerio***

*Soumis dans Aquatic Toxicology*

Lucas J. <sup>(1,2)</sup>, Bonnieux, A. <sup>(1)</sup>, Lyphout L. <sup>(2)</sup>, Le Menach, K. <sup>(3)</sup>, Budzinski H. <sup>(3)</sup>, Cousin X. <sup>(2,4)</sup>, Miramand, P. <sup>(1)</sup>, Lefrancois C. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 7266 Littoral Environnement Sociétés (LIENSs), Institut du Littoral et de l'Environnement - 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La rochelle, France ;

<sup>(2)</sup> Ifremer, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France ;

<sup>(3)</sup> Université de Bordeaux 1 (EPOC/LPTC, UMR CNRS 5805), 351 Cours de la Libération, F33405 Talence Cedex, France

<sup>(4)</sup> Inra LPGP, Campus de Beaulieu - Bâtiment 16A - 35042 RENNES Cedex, France.

*Keywords:* trophic exposition, petroleum hydrocarbons, metabolic rate, sublethal zebrafish





### **I.1. Abstract**

Aerobic metabolic scope is considered as a proxy of fitness permitting to assess the effect of environmental stressors such as pollutants upon aquatic species. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the most widespread organic pollutants. Focussing on a mixture of PAHs compounds from pyrolytic origins (e.g. produced by incineration processes), this study aims at determining the impacts of a contamination by trophic pathway on aerobic metabolism of zebrafish *Danio rerio* along its lifecycle. Fish were contaminated with PAHs mixtures at several sub-lethal concentrations. Larvae were fed from the first meal (5 days post fertilization) onward with contaminated, dry and size-adapted pellets. Two months juveniles, six months adults (F<sub>0</sub> generation) and 2 months juveniles of the progeny (F<sub>1</sub> generation) were tested individually. Oxygen consumption was measured by intermittent flow respirometry. Oxygen measurements were carried out during resting period and after chasing in order to establish the SMR and the AMR. Whatever the concentration of PAHs in diet, no significant difference was observed. This suggests that, in our experimental conditions, PAHs exposure did not influence aerobic metabolism of this species.

### **I.2. Introduction**

Increasing of anthropic activities in coastal area (e.g. industrialisation, urbanisation, discharges) leads to the introduction in aquatic ecosystems of xenobiotics such as persistent organic pollutants. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are one of the most widespread organic pollutants, characterised by a high persistence in the environment (Dabestani & Ivanov, 1999). Because of their stability and the diversity of sources, PAHs are also considered to be ubiquitous pollutants (McElroy et al., 1989). Due to their high liposolubility, they are typically adsorbed by organic matter or marine sediments, and bioaccumulated by organisms through trophic chains (Medeiros et al., 2005; Medeiros & Bicego, 2004; Rocha et al., 2012; Zanardi et al., 1999). In a context of environmental changes and risk management (i.e. Registration, Evaluation and Authorisation of Chemicals REACH, EC 19/07/2006, DCE 2000/60/CE), assessment of PAHs toxicity is requested to evaluate their impairments upon the aquatic life. Past studies on fish demonstrated that hydrocarbons have carcinogenic, genotoxic (e.g. DNA damage; Holth et al., 2008; Nogueira et al., 2009) and ontogenic effects, especially during embryonic development (Incardona et al., 2011; Singh et al., 2008, Horng et al., 2010). At the individual level, they were also found to affect reproduction (Collier et al., 1992;

Seruto et al., 2005), growth (Meador et al., 2006 ; Heintz 2007; Kim et al., 2008) or behaviour (Gonzales et al., 2008).

In presence of environmental stressors, organisms generally present biological responses at different levels of organisation (i.e. from molecular to individual), which participate to optimize the adaptation of the organism in the new and variable environment (Barton, 2002). Responses are grouped as primary, secondary and tertiary type (Barton, 2002). Primary responses consist in hormonal changes with production of stress hormones such as catecholamines (e.g. adrenaline, dopamine) or cortisol (McCormick, 1999, 2006; Pottinger, 1994; Reid et al., 1998). Secondary responses are related to physiological adjustments in metabolic reactions, cellular responses or immune function for example. Then tertiary responses, which can be influenced by the others, occur on the whole-animal. These responses involve changes in growth, metabolic scope, behaviour or survival (Barton, 2002; Davoodi & Claireaux, 2007; Wedemeyer & McLeay, 1984; Wedemeyer et al., 1990).

Our investigation aims at studying tertiary responses through the assessment of aerobic metabolic scope (AMS; Fry, 1947) at the individual level. AMS represents the oxygen carrying capacity of an organism to perform its energy-demanding activities (e.g. locomotion, digestion, feeding; Fry, 1947, 1971). AMS is considered as a proxy to assess physiological performances and fitness of fish in a given environment (Claireaux & Lefrançois, 2007; Priede, 1985). It is defined as the difference between (i) active metabolic rate (AMR) which is the maximal metabolic rate under maximal activity and (ii) the standard metabolic rate (SMR), the metabolic rate when the organism is at rest (Brett, 1964; Fry, 1947). AMS is known to be modulated by a set of environmental parameters such as temperature, dissolved oxygen or pollutants (Johansen & Jones, 2011; Lefrançois & Claireaux, 2003; Shurmann and Steffensen, 1997). For instance, Davoodi & Claireaux (2007) showed a 30% decrease of AMS in the common sole *Solea solea* exposed to a short term acute exposure to a fuel comparable to the ERIKA oil. Focussing on a mixture of PAHs compounds from pyrolytic origins (e.g. produced by incineration processes of organic matter), the present study aims at determining the impacts of a contamination by trophic pathway on aerobic metabolism of zebrafish *Danio rerio* along its lifecycle. This small teleost species presents biological characteristics that make it suitable for experimental studies (e.g. small size, easy breeding, high fecundity; Lawrence, 2007; Miklosi & Andrew, 2006); its short life cycle and rapid development also facilitate investigations regarding the effects of pollutants on different life stages.

In the present study, zebrafish were exposed to environmentally relevant concentrations of pyrolytic PAHs. The main hypothesis was that chronic exposure to PAHs may impair aerobic metabolic scope by increasing SMR and/or reducing AMR. PAHs are indeed supposed (a) to cause malfunctions at cellular and organs levels involved in oxygen transport (e.g. heart), and thereby decrease AMR and/or (b) to induce detoxification processes, which could increase SMR. The potential consequent reduction of AMS would reflect a reduction of fish to sustain energy-demanding activities. We assessed these metabolic variables in juveniles and adults after long-term chronic exposure to PAHs as well as in their offspring. In fact, the progeny could be exposed through maternal transfer to harmful molecules that may affect their development, such as PAH bioaccumulated in gonads, as well as elevated quantity of cortisol produced by the parents bred in PAH-stressful environment (Tintos et al., 2008; Aldegunde et al., 1999; Lotufo, 1998; Miller, 1993).

### **I.3. Materials & methods**

#### *I.2.1 Experimental zebrafish and eggs production*

Couples of *Danio rerio* (wild-type Tuebingen strain, TU) were reared together in 10 l tank filled with mix water. Water was obtained through a mix of osmosis and filtered tap water. Rearing conditions were characterized by the following parameters: temperature  $28 \pm 0.5$  °C, conductivity  $300 \pm 50$   $\mu$ S/cm, oxygen saturation  $\geq 80$  %, pH  $7.5 \pm 0.5$ , photoperiod of 14 h light/10 h dark. Ammonia, nitrite and nitrate remained within recommended ranges (Lawrence, 2007). The fish were fed twice daily with commercial dry food (INICIO Plus, BioMar, France) and once by *Artemias sp.* nauplii (Ocean Nutrition, Belgium), occasionally supplemented with red sludge worms (Boschetto-Frozen fish food). Each week during one month, spawns were obtained from these couples. The day before the spawn, couples of fish were isolated in 1 l breeding tanks (AquaSchwarz, Germany). To avoid a potential egg predation, a metal grid of 1 mm-mesh was placed into the breeding tank. Spawning and fertilization took place within around 30 min after the onset of light in the morning. Eggs were cleaned and sorted out using a binocular microscope in order to select fertilized and normally developed eggs. Egg fertilization rate had to be  $\geq 70$  % and spawns were mixed to

avoid a potential spawning effect. From 2 weeks onwards, fish were kept in groups of 30 individuals in 10l aquaria.

### *1.2.2 Protocol of food contamination*

Fish contamination occurred through trophic pathway with size-adapted food (i.e.  $\leq 125\mu\text{m}$ ,  $125\text{-}315\mu\text{m}$ ,  $315\text{-}500\mu\text{m}$ ,  $\geq 500\mu\text{m}$ ) related to the fish age. Artificial dry food was contaminated with a mixture of PAHs. Briefly, natural sediment was sampled in the superficial layer of sediments in the site of Oissel (Seine Bay, one of the highest polluted site in France). First, PAHs were extracted from the sediments and the concentration of the 16 individual PAHs of the US-EPA was quantified according to a protocol described in Budzinski et al. (1997) and Cachot et al. (2007). Then food was spiked using protocol adapted from Vicquelin & al. (2011). Briefly, the adequate amount of dry food was placed in a round-bottom glass flask and immersed in dichloromethane. Then, aromatic fraction obtained from the natural sediment from Seine estuary was added with quantities in relation with amount needed to reach the target final concentration. Control evaporation was performed using a rotavapor (RV10 Basic, VWR International) equipped with a heating water bath (HB10 Basic, VWR International) set at  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  until the food was visually completely dry. Potentially remaining traces of organic control were eliminated leaving the food overnight at room temperature and in darkness under an extractor hood. Finally, spiked food of each treatment was divided into several aliquots. The experimental chemical contamination of the food with regards to PAHs contamination was characterized and detailed in table I.1. Based on PAHs concentration measured in mollusks in the Seine estuary, the environmental concentration of reference targeted was  $5\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , called  $X$  in the rest of the manuscript. Based on this reference concentration, two other treatments were tested: (i) a lower concentration, i.e.  $0.3X$  and (ii) a higher concentration, i.e.  $3X$ . A fourth treatment was added for which dry food was exposed only to the solvent dichloromethane, and was considered as a control.

### *1.2.3 Protocol of zebrafish contamination*

Contamination through food pathways was conducted by feeding the larvae obtained from uncontaminated couples as described above. Fish were fed by one of the 4 treatments twice a day: control,  $0.3X$ ,  $1X$  and  $3X$ . Feeding started from the first meal (5 day post fertilization dpf) to the ages of the tests: 2 months-juveniles ( $n_{\text{control}}=22$ ,  $n_{0.3X}=21$ ,  $n_{1X}=23$ ,  $n_{3X}=22$ ; Table 2) and

6 months-adults ( $n_{\text{control}}=14$ ,  $n_{0.3X}=12$ ,  $n_{1X}=14$ ,  $n_{3X}=15$ , Table I.2.). This produced a first generation of contaminated individuals further called  $F_0$  generation. When mature, some of these contaminated fish were used to form couples to obtain a new generation called  $F_1$ . In order to study the parental effect of the contamination, fish of the second generation  $F_1$  were fed with normal dry food (Inicio plus, Biomar, France) until they attain 2 months to be tested ( $n_{\text{control}}=12$ ,  $n_{0.3X}=10$ ,  $n_{1X}=13$ ,  $n_{3X}=8$ ; Table 2). For all fish, brine shrimp (Ocean Nutrition Europe BVBA, Belgium) was given as complementary food once day.

**Table I.1.** Biometry of fish for each treatment tested (Mean $\pm$ SE). Two generations of fish were tested:  $F_0$  as direct contaminated fish and  $F_1$  the progeny of these fish.

Treatment	Lifestage	Fish	Weight (g)	SL (cm)	TL (cm)
<b>Solvent</b>	juveniles $F_0$	n=24	0.20 $\pm$ 0.08	2.23 $\pm$ 0.29	2.72 $\pm$ 0.37
	adults $F_0$	n=15	0.63 $\pm$ 0.19	3.08 $\pm$ 0.28	3.80 $\pm$ 0.35
	juveniles $F_1$	n=12	0.09 $\pm$ 0.03	1.83 $\pm$ 0.20	2.10 $\pm$ 0.56
<b>0,3X</b>	juveniles $F_0$	n=23	0.21 $\pm$ 0.12	2.18 $\pm$ 0.27	2.73 $\pm$ 0.20
	adults $F_0$	n=12	0.68 $\pm$ 0.11	3.26 $\pm$ 0.20	3.94 $\pm$ 0.20
	juveniles $F_1$	n=10	0.11 $\pm$ 0.05	1.84 $\pm$ 0.26	2.26 $\pm$ 0.30
<b>1X</b>	juveniles $F_0$	n=24	0.178 $\pm$ 0.04	2.21 $\pm$ 0.08	2.69 $\pm$ 0.15
	adults $F_0$	n=15	0.57 $\pm$ 0.13	3.00 $\pm$ 0.32	3.69 $\pm$ 0.30
	juveniles $F_1$	n=13	0.16 $\pm$ 0.08	2.07 $\pm$ 0.26	2.52 $\pm$ 0.25
<b>3X</b>	juveniles $F_0$	n=24	0.18 $\pm$ 0.08	2.18 $\pm$ 0.29	2.65 $\pm$ 0.33
	adults $F_0$	n=15	0.44 $\pm$ 0.16	2.84 $\pm$ 0.40	3.36 $\pm$ 0.41
	juveniles $F_1$	n=8	0.13 $\pm$ 0.07	1.80 $\pm$ 0.36	2.35 $\pm$ 0.39

**Table I.2** Concentration of individual PAHs in contaminated diet. Values are expressed as mean±S.E., in ng.g<sup>-1</sup> of dry food; n.d.=not detectable.

Molecules	Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	Solvent	0.3X	1X	3X
Naphtalene	128	6 ± 6	15 ± 7	56 ± 14	157 ± 74
Acenaphthylene	152	1 ± 0	11 ± 2	35 ± 6	114 ± 23
Acenaphthene	154	2 ± 1	14 ± 12	29 ± 7	89 ± 24
Fluorene	166	2 ± 1	14 ± 3	42 ± 8	137 ± 28
Dibenzo[b,d]thiophene	184	2 ± 3	11 ± 1	34 ± 5	102 ± 26
Phenanthrene	178	8 ± 4	95 ± 21	291 ± 60	895 ± 213
Anthracene	178	1 ± 0	49 ± 13	159 ± 41	482 ± 165
Fluoranthene	202	3 ± 3	130 ± 28	523 ± 182	1782 ± 353
Pyrene	202	3 ± 3	112 ± 24	447 ± 160	1496 ± 311
Benzo[a]anthracene	228	1 ± 0	171 ± 75	581 ± 221	1671 ± 763
Chrysene+Triphenylene	228	1 ± 0	215 ± 91	744 ± 290	2144 ± 1032
Benzo[b]naphtho[2,1-d]thiophene	234	5 ± 3	52 ± 26	156 ± 70	472 ± 230
Benzo[b,k,j]fluoranthene	252	2 ± 1	273 ± 72	868 ± 220	2740 ± 674
Benzo[e]pyrene	252	1 ± 0	109 ± 29	346 ± 86	1084 ± 286
Benzo[a]pyrene	252	1 ± 0	118 ± 33	373 ± 95	1168 ± 346
Perylene	252	1 ± 0	37 ± 9	121 ± 27	390 ± 83
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	276	0 ± 0	123 ± 41	349 ± 89	1188 ± 265
Dibenzo[a]anthracene + Dibenzo[a]chrysene	276	2 ± 2	32 ± 11	108 ± 43	301 ± 106
Benzo[g,h,i]perylene	276	0 ± 0	87 ± 27	268 ± 67	893 ± 191
<b>Sum PAH</b>		<b>34 ± 6</b>	<b>1670 ± 448</b>	<b>5532 ± 1383</b>	<b>17305 ± 4798</b>

#### *1.2.4 Respirometry*

To assess the aerobic metabolic rate of fish, 8 identical size-adapted respirometers (diameter: 3.75cm, volume: 0.061 l for juveniles and 7.50 cm, 0.179 l respectively for adults) were simultaneously employed. This set-up was submerged into two buffer tanks (depth x length x height: 10x75x75xcm for both juveniles and adults) and filled with temperature-controlled and oxygenated water. Oxygen consumption was measured by intermittent flow-respirometry where the water supply in each respirometer was provided by flush pumps controlled by a timer. This system permitted to alternate phases of oxygen renewal with phases of oxygen consumption ( $MO_2$ ) measurements following a period of 30:30 min. The set-up was completed by a multichannel peristaltic pump to create a continuous water flow and insure water mixing inside each of the chambers. Each respirometer was equipped with an optic fiber sensor (Presens, Germany) connected to a multichannel oxygen measuring system (OXY 4 mini, Presens, Germany) to record the level of dissolved oxygen in the water. Oxygen data was sampled each five seconds with the program Oxyview (PreSens, Germany).

#### *1.2.5 Experimental protocol*

Fishes were starved 24h prior to the experimental trial of respirometry. For each experimental trial, 8 fish (two of each treatment) were tested individually in one of the 8 respirometers. Each trial consisted in two consecutive steps. First, to increase its energy-demanding activities and assess AMR, each fish was chased with a stick in a 1 l-tank (Schurmann and Steffensen, 1997; Lefrançois & Claireaux, 2003; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010; Cannas *et al.*, 2013, Clark *et al.*, 2012). When fish fatigues (i.e. when fish did not respond to the stimulation), it was transferred into an individual respirometer to measure  $MO_2$  during 30 min. To confirm the accuracy of the AMR assessment, each fish was chased again into the respirometer and its  $MO_2$  measured. The second step consisted to a resting period of 48 hours to reach and estimate SMR. During this period fish were undisturbed and  $MO_2$  was regularly and automatically measured by intermittent flow respirometry. After the 48h period of  $MO_2$  measurements, fishes were removed from the respirometers and anesthetized using benzocaïne ( $50\text{mg.l}^{-1}$ ). The length (i.e. standard and total length) and the mass of each individual were determined. To quantify microbial oxygen consumption in the respirometer, a blank measurement was performed before and after each trial. We assumed a linear change in



background  $MO_2$  over the 48h-experimental trial and subtracted the expected value to the corresponding total  $MO_2$  measured. Each fish was tested once.

### I.2.6 Calculations

#### I.2.6.1. Oxygen consumption ( $MO_2$ )

Oxygen consumption  $MO_2$  is expressed in  $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$  and calculated according to the following formula:

$$MO_{2meas} = \Delta[O_2] \cdot V \cdot \Delta t^{-1} \cdot M_{meas}^{-1} \quad \text{equation (1)}$$

where  $\Delta[O_2]$  (in  $mgO_2 \cdot l^{-1}$ ) is the variation in oxygen concentration during the measurement period  $\Delta t$  (in h) and  $V$  (in l) is the volume of the respirometer minus the volume of the fish,  $M_{meas}$  (in g) is the fish mass measured.

An allometric relationship exists between oxygen consumption and body mass, which permits to correct  $MO_{2meas}$  using the following formula:

$$MO_{2cor} = MO_{2meas} \cdot (M_{meas} \cdot M_{cor}^{-1})^{1-b} \quad \text{equation (2)}$$

where  $MO_{2cor}$  (in  $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ) is the oxygen consumption related to a standard fish of 1g-fish ( $M_{cor}$ ),  $MO_{2meas}$  (in  $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ) is the oxygen consumption estimated for experimented fish whose mass was  $M_{(meas)}$  (in g) and  $b$  is the allometric scaling exponent describing the relation between oxygen consumption and body mass of fish. Prior experiments permitted to determine  $b$  for *D. rerio*. In this study we used  $b_{AMR}=0.926$  for the estimation of active metabolic rate and  $b_{SMR}=0.965$  for the estimation of standard metabolic rate as describing in Lucas et al. (2013, *in press*, Annexe 2).

#### I.2.6.2. Active metabolic rate (AMR), standard metabolic rate (SMR) and aerobic metabolic scope (AMS)

AMR was assessed as the maximal  $MO_2$  obtained after the fish being chased. SMR was estimated according to the method described by Steffensen *et al.* (1994). Briefly, the frequency distribution of  $MO_2$  values recorded during the last 24 hours of the test was plotted. This generally produces a bimodal frequency distribution due to the routine activity of the

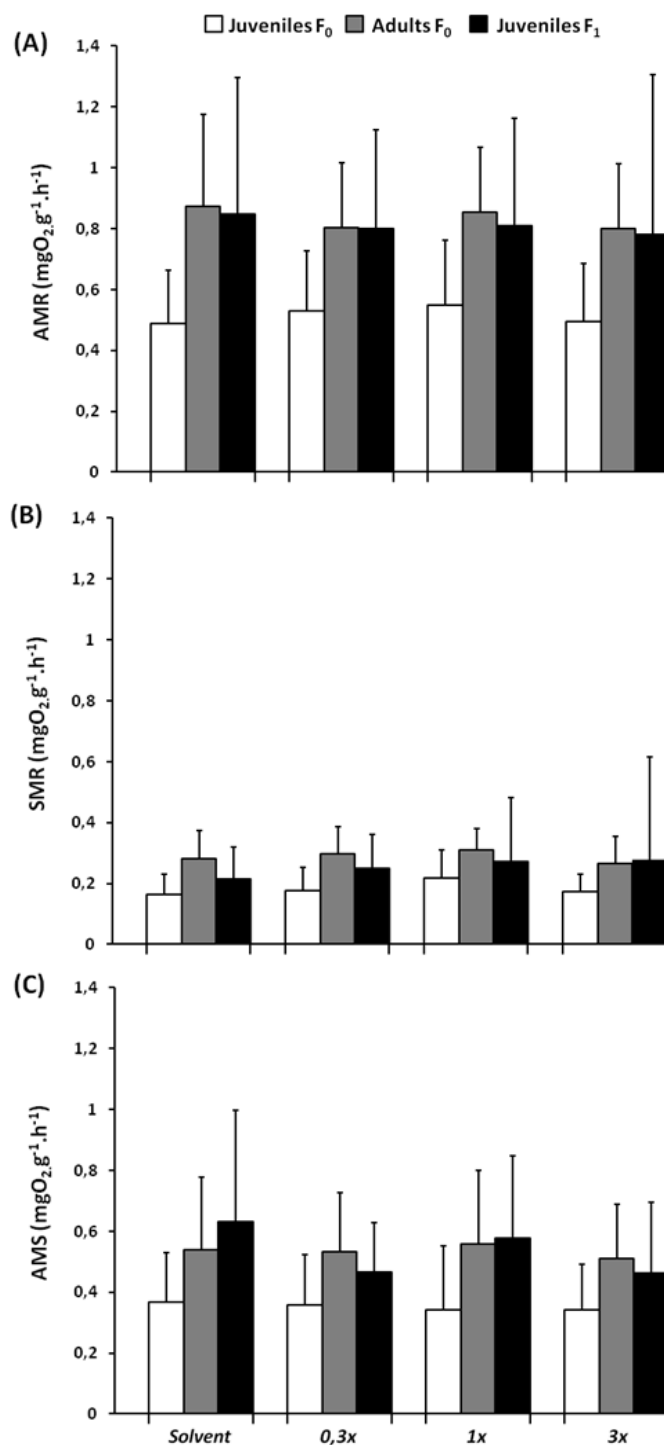
fish. The higher mode (i.e. the first peak) is considered to reflect the SMR and the lower mode (i.e. the second peak) corresponds to the routine metabolic rate (RMR), i.e. the energy required by the fish for normal activity. Aerobic metabolic scope (AMS) is the difference between AMR and SMR. AMR, SMR and AMS were assessed for each individual.

#### *I.2.6.3. Statistical analysis*

Statistical analysis was carried out using Graphpad Prism software. The normality (using the Kolmogorov-Smirnoff test) and homoscedaticity (using the Barlett test) of data were found to be not respected. Therefore, for each tested status (juvenile F<sub>0</sub>, adults F<sub>0</sub> and juvenile F<sub>1</sub>), non-parametric test of Kruskal-Wallis was used to determine significant differences due to the treatment. If necessary, a Dunn post-hoc test was applied to determine which treatments differed significantly. The results were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ .

### **I.3. Results**

Regarding AMR, whatever the life stage considered, no significant difference was found between the treatments (i.e. control, 0.3X, 1X, 3X; Kruskal-Wallis test,  $p=0.45$ ,  $p=0.93$  and  $p=0.94$  for juveniles F<sub>0</sub>, adults F<sub>0</sub> and juveniles F<sub>1</sub> respectively). Similarly to the pattern observed for the AMR, no significant difference in SMR was observed between the treatments for each life stage (KW,  $p=0.23$ ,  $p=0.74$ ,  $p=0.66$  for juveniles F<sub>0</sub>, adults F<sub>0</sub> and juveniles F<sub>1</sub>, respectively). As it was observed for AMR and SMR, AMS never differed significantly between the treatments for juveniles F<sub>0</sub> (KW,  $p=0.59$ ), adults F<sub>0</sub> (KW,  $p=0.89$ ) and juveniles F<sub>1</sub> (KW,  $p=0.56$ ).



**Figure I.2.** Active metabolic rate (AMR, A), standard metabolic rate (SMR, B) and aerobic metabolic scope (AMS, C) of zebrafish *Danio rerio* exposed to one of the following treatments: control, 0.3X, 1X and 3X . The environmental reference concentration X is 5.5  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  of dry food (Table I.1). On each graph, aerobic metabolic rate was estimated at different life stages: juveniles ( $\square$ ) and adults ( $\blacksquare$ ), both of the first generation  $F_0$ , and juveniles ( $\blacksquare$ ) of the second generation  $F_1$ .

#### I.4. Discussion

This is the first study assessing the aerobic metabolism of zebrafish chronically exposed to a mixture of pyrolytic PAHs. The results suggested that in the present experimental conditions and at the two tested life stages, the trophic exposure to PAHs did not affect SMR, AMR nor AMS of this species.

Comparisons with other studies are limited even if it exists investigations concerning aerobic metabolism in uncontaminated zebrafish (e.g. Barrionuevo et al., 2010; Thomas et al., 2013). In fact, the fish rearing conditions, the developmental stage of the tested fish or the experimental protocols used generally differ from the current study. On the contrary, study of Barrionuevo & Burggren (1999) is quite similar to our own experimental approach, since they measured oxygen consumption in 28°C-acclimated zebrafish at the age of 2 months and in resting conditions. They estimated SMR to be  $0.19 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , which is in accordance with the present study (Fig. I.1B). In addition, Lucas et al. (2013, *in press*) have studied the allometric relationship between body mass and aerobic metabolism in zebrafish. Aerobic metabolism was estimated through similar protocol, which permits the comparison of data. They estimated SMR to be  $0.31 \pm 0.11 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  and  $0.35 \pm 0.16 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  in juveniles and adults respectively, which is in the range of the values found in the current study (Fig. I.1B). No significant difference in SMR was found among the four treatments, which suggests that, in our experimental conditions, exposure to pyrolytic PAHs did not induce significant supplementary costs of energy in *D. rerio*. It is worth noticing that PAHs and their metabolites were not measured in the present study. Even if the dosage of these hydrocarbons compounds on organism may have permit to evaluate the exact level of the contamination, zebrafish, as observed in other species, are supposed to bioaccumulate PAHs, as well as their metabolites. Indeed, because of their lipophilic properties, these compounds are known to be accumulated by organism in various organs (e.g. gonads or liver; Tuvikene et al., 1995; Monteverdi & Giulio, 2000). The lack of modification of the SMR in *D. rerio* is contrary to one of our initial hypotheses, i.e. exposure to pollutants was expected to induce an increase of the costs of maintenance due to detoxification processes and the supplementary associated energetic costs (Lesvesque et al., 2002; Singh et al., 2008). For instance, the study of Lannig *et al.* (2006) on cadmium-exposed oyster, *Crassostrea virginica*, showed a 40-86% increase of SMR. The lack of effect suggests that even the highest level of contamination tested, i.e. threefold higher than the average environmental concentration (Table I.1), was likely not

enough elevated to induce a significant variation of SMR in our experimental conditions. Others studies carried on fish exposed to persistent organic pollutants highlighted a similar pattern. For instance, Cannas et al. (2013) investigated the effects of PCB in the common sole. Despite the high PCB level tested, i.e. four-fold higher than the levels measured in wild soles from the Bay of Seine (i.e. the most polluted estuary in France), no clear impairment in aerobic metabolism was observed.

Focusing on AMR, the previous study of Lucas *et al.* (2013, *in press*) found AMR to range between 0.92 and 0.94 mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> in juveniles and adults zebrafish. This is in agreement with the current results (Adults F<sub>0</sub> and juveniles F<sub>1</sub>, Fig. I.1A), while slightly higher than AMR measured in juveniles F<sub>0</sub> (Fig. I.1A). As for SMR, no significant modification of AMR or AMS was observed between the four treatments whatever the life stage considered. This suggests that capabilities of fish to sustain maximal energy-demanding activities such as locomotion, digestion or growth were not affected by the PAHs contamination. Contrary to our results, Davoodi & Claireaux (2007) observed a 30 % decrease of AMS and a 27 % decrease of AMR in contaminated fish (i.e. common sole, *solea solea*) by crude oil. However, contrary to our experimental conditions, the sole contamination occurred by aqueous pathway, which could explain gills alteration and the associated reduction in oxygen diffusion in blood. In addition, sole were exposed to crude oil in order to mime an acute pollution such as oil slick (e.g. Erika), which differs from the present study where chronic contamination occurred by trophic exposure

Another interest of this study was to assess metabolic impairments in the progeny of adults zebrafish exposed to pyrolytic PAHs. No significant difference in aerobic metabolic rates was found in the progeny (juveniles F<sub>1</sub>, Fig. I.1C), whatever the treatment their parents were exposed to. This is contrary to the hypothesis that PAHs could have direct or indirect effects on the progeny of contaminated fish. In fact, depending on their metabolization and their bioaccumulation in organism, PAHs are likely to be transferred into the eggs (Lotufo, 1998; Miller, 1993). Aquatic organisms and especially fish are known to quickly metabolize PAHs to hydroxylated derivatives (Blahova et al., 2013, Dévier et al., 2013; Tuvikene, 1995). PAHs or their derivatives could be accumulated in parent's gonads too and transferred to the eggs, as shown in some studies in aquatic animals. For instance, the study of Monteverdi and Giulio (2000) showed that hydrocarbons contamination induce oocytic PAHs accumulation in gravid *Fundulus heteroclitus*. Hall and Oris (1991) observed that a maternal exposure to

anthracene induced teratogenic effects (e.g. oedema, eyes and yolk deformities) on the progeny of fathead minnows (*Pimephales promelas*). PAHs could have indirect effects too. In fact, recent studies have shown that maternal stress influences offspring characteristic through the production of some stress hormones such as cortisol. Level of cortisol is commonly used as an indicator of the degree of stress experienced by fish (Barton, 2002; Barton & Iwama, 1991; Wendelaar Bonga, 1997). In literature, increase of cortisol level after PAHs or organic pollutants exposure have been observed in several studies on fish like rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Aldegunde et al., 1999; Tintos et al., 2008), pacific herring (*Clupea pallasii*, Kennedy & Farrell, 2005) or round goby (*Neogobius melanostomus*; Marentette et al., 2013). By this increase of hormonal level, pollutants could disrupt physiological processes regulated by cortisol such as metabolism or reproduction (Gesto et al., 2008; Tintos et al., 2007, 2008). In addition, maternal cortisol produced under stressor could be accumulated in eggs and affect the gametes quality (Campbell et al., 1992, 1994), the size or the quality of the progeny of fish (McCormick 1998, 1999, 2006). In the present study, the cortisol level was not measured because this would have involved the death of the fish during the experimentation. However, as observed in other species (Aldegunde et al., 1999; Kennedy & Farrell, 2005; Tintos et al., 2008; Marentette et al., 2013), *D rerio* are likely to present an elevation of the production of stress hormone induced by the exposure to pyrolytic PAHs.

## **I.5. Conclusion**

The lack of effect in our study is in accordance with other studies on fish regarding persistent organic pollutants. For instance, Milinkovitch et al. (2012) observed no modification of SMR, AMR and AMS of golden grey mullet (*Liza aurata*) after exposure to crude oil and dispersants. McKenzie et al. (2007) observed that organic pollutants did not affect metabolic rates of chub (*Leuciscus cephalus*) and carp (*Cyprinus carpio*). Globally, persistent organic pollutants such as PAHs did not impair aerobic metabolism independently of the experimental condition tested in these studies.

Concentration and/or type of PAHs tested were probably not enough toxic to induce severe impairments in the mechanisms involved in metabolic regulation. However, it is also worth noticing that, organisms which have to cope with long-lasting environmental stressors are known to present physiological adaptations to maintain their homeostasis (Barton, 2002). Chronic exposure to PAHs may have induced such adaptations in *D rerio*, and therefore hide

potential PAHs effect. This study will be completed by future results regarding cardiac and swimming performances in order to improve our understanding of the potential effect of pyrolytic PAHs mix on the physiology of *Danio rerio*.

### **Acknowledgements**

We thank Didier Leguay and Michel Prineau, for their help during the experiment. All experiments were carried out at Ifremer (Plateforme d'Ecophysiologie des Poissons), La Rochelle station, France. This study was financially supported by the ANR project ConPhyPoP (CES 09\_002) and JL received a doctoral grant of the Regional Council of Poitou-Charentes. This study was conducted under the approval of Animal Care Committee of France under the official licence of Marie-Laure Bégout (17-010).

---

**Chapitre 2 : Contamination trophique à des mélanges d'hydrocarbures aromatiques polycycliques d'origine pyrolytique et pétrogénique : effets sur les performances de nage du poisson zèbre *Danio rerio***

---





## Résumé

Le chapitre précédent n'a permis de mettre en avant aucune modification de la capacité métabolique aérobie chez les poissons contaminés aux mélanges de HAP d'origine pyrolytique quelle que soit la concentration testée, la durée d'exposition et la génération considérée. En parallèle de cette approche de respirométrie statique, nous avons voulu évaluer les performances de nage des poissons au niveau individuel. En effet, ces dernières jouent un rôle fondamental dans le cycle de vie des poissons, puisqu'elles sont déterminantes dans la recherche alimentaire, les relations proies-prédateurs ou encore l'évitement d'un danger. Pour chacun des mélanges, pyrolytique et pétrogénique lourd, seuls deux traitements ont été testés, le contrôle et la plus forte concentration d'exposition 3X, toujours par voie trophique. Cette étude a pour objectif de (i) confirmer les résultats du chapitre I pour le mélange pyrolytique, (ii) d'évaluer la capacité métabolique aérobie des poissons contaminés aux HAP d'origine pétrogénique, ainsi que (iii) de mesurer pour les deux mélanges les performances de nage via l'estimation de la vitesse de nage critique,  $U_{crit}$ . Cette dernière est en partie liée à la capacité métabolique aérobie, puisqu'elle dépend de la capacité de l'organisme à utiliser l'oxygène et fournir l'énergie nécessaire à ce type d'effort prolongé, mais aussi du métabolisme anaérobie sollicité lorsque l'organisme n'est plus capable de répondre à la demande en oxygène (Brett, 1964). La  $U_{crit}$  est estimée à travers un challenge de nage standardisé, qui est une méthode de plus en plus utilisée notamment pour évaluer expérimentalement l'impact de facteurs environnementaux (e.g. Cairns, 1966 ; Sprague, 1971 ; Hammer, 1995 ; Domenici & Kapoor, 2010).

Les résultats mettent en évidence des effets différents entre les deux mélanges testés. L'exposition pyrolytique induit une diminution du taux métabolique actif, et de la capacité métabolique aérobie, uniquement sur la descendance  $F_1$  (i.e. juvéniles de 2 mois) issue des poissons exposés à la plus forte concentration (i.e. 3X). Cela suggère un effet parental de la contamination qui peut-être du à (i) une exposition directe des œufs aux HAP au sein de la femelle par exemple ou encore (ii) au transfert d'hormones de stress (e.g. cortisol) connues pour altérer la descendance (McCormick 1999). Cette réduction du métabolisme aérobie est également observée suite à une exposition aux HAP d'origine pétrogénique, mais cette fois ci chez les adultes  $F_0$  directement exposés, et est associée à une diminution de la vitesse de nage critique. L'altération de la reproduction n'a pas permis d'étudier la descendance de ces

poissons.

Plusieurs études ont mis en évidence que les altérations à des niveaux d'intégration inférieurs (i.e. au niveau de l'organe par exemple), telles que des malformations et dysfonctionnements cardiaques, pouvaient être à l'origine d'une réduction des performances de nage et de la capacité métabolique (e.g. Davoodi & Claireaux, 2007 ; Hicken et al, 2011 ; Marit et Weber, 2012). En effet, ces deux fonctions biologiques dépendent notamment de la capacité de l'organisme à transporter et fournir l'oxygène nécessaire à la production d'énergie. Une analyse histologique a permis de mettre en évidence une altération morphologique du cœur uniquement chez les adultes  $F_0$  directement exposés aux HAP pétrogéniques (Larcher, *communication personnelle*), ce qui est apparemment cohérent avec nos résultats mettant en évidence la réduction de la capacité métabolique et natatoire chez ces mêmes individus. Cette approche histologique n'ayant pas été réalisée chez la descendance pyrolytique, il serait intéressant de mener ce type d'étude, ou toute autre investigation permettant d'évaluer l'intégrité fonctionnelle du cœur. Aussi, l'étude de Hicken et al. (2011) suggère que des dysfonctionnements cardiaques précoces (i.e. stades larvaires) induisent à plus long terme une réduction des performances de nage du poisson zèbre adulte. Ainsi pour mieux comprendre l'effet parental de la contamination sur la descendance des poissons exposés aux HAP pyrolytiques, il paraîtrait pertinent d'évaluer le métabolisme aérobie, ainsi que d'explorer les performances cardiaques à des stades plus précoces que celui étudié dans ce chapitre. Cette étude a fait l'objet du chapitre suivant, et est cette fois-ci centrée sur les larves de 5 jours nées de parents exposés aux HAP de type pyrolytique (Chap. III). Aussi, les poissons présentent d'autres types de locomotion que la nage aérobie soutenue, évaluée par la  $U_{crit}$  dans ce chapitre. Parmi elles, la nage de type *fast-start* basée sur les performances anaérobies, intervient dans les relations proies-prédateurs notamment et sera l'objet du chapitre IV. .

*Les résultats de ce chapitre ont fait l'objet d'un poster et d'une présentation orale lors du meeting annuel de la Society of Experimental Biology SEB à Salzburg (juillet 2012) et à Valencia (juillet 2013).*

**Trophic contamination by pyrolytic and petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: effects on swimming performance in zebrafish *Danio rerio*.**

Lucas J. <sup>(1,2)</sup>, Percelay I. <sup>(1)</sup>, Larcher T. <sup>(3)</sup>, Lefrancois C. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 7266 Littoral Environnement Sociétés (LIENSs), Institut du Littoral et de l'Environnement - 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La rochelle, France ;

<sup>(2)</sup> Ifremer, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France;

<sup>(3)</sup> INRA UMR 703, APEX, Oniris – La Chantrerie, 44300 Nantes, France

*Key words:* trophic exposition, petroleum hydrocarbons, critical swimming speed, aerobic metabolic rate, sub-lethal concentration, zebrafish



## II.1. Introduction

As for many species, locomotion performance is considered as a relevant variable participating to fish survival in a given environment (Jones et al., 1974; Graham et al., 1990; Stobutzki & Bellwood, 1994; Swanson, 1998, Plaut, 2001). It is commonly assumed that swimming performance are related to predators-prey interactions, food research or migration, which are essential for fish survival or development (Hammer, 1995; Plaut, 2001; Videler, 1993; Reidy et al., 1995; Drucker & Jensen, 1996; Watkins, 1996; Walker et al., 2005). Impairment of swimming performance is therefore expected to affect the fitness of an organism (Reidy et al., 2000, Langerhans et al., 2004; Walker et al., 2005; Langerhans, 2009). Swimming performance in general is known to be modulated by biotic and abiotic factors such as temperature (Taylor et al. 1997; Farrell, 2007; Rome et al. 2007), oxygen (Diaz, 2001; Diaz et al. 2004), salinity (McKenzie et al., 2001a,b ; Chatelier et al. 2006) or pollutants (Waiwood et Beamish, 1978; Alsop et al., 1999; Shingles et al. 2001; Marit & Weber, 2012; Thomas et al. 2013). To evaluate the impairments of environmental factors, critical swimming speed ( $U_{crit}$ ) is a variable frequently employed, which consists to challenge the fish following a swimming step protocol during which the velocity is incrementally increased until the fish exhaustion (Brett, 1964; Beamish, 1978; Hammer, 1995; Plaut, 2001).

Several previous studies investigating pollutants effects (e.g. pesticides, metals, ammonia, hydrocarbons) showed a decrease of  $U_{crit}$  (Webb and Brett, 1973; Wicks et al., 2002; Marit & Weber, 2011). For instance, *Danio rerio* showed a reduction of  $U_{crit}$  of 15 and 22 %, while exposed to crude oil (Hicken et al., 2011) and to TCDD (i.e. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin; Marit & Weber, 2012) respectively. Assessment of aerobic metabolic performance is often associated to studies regarding  $U_{crit}$ . Indeed,  $U_{crit}$  directly depends on the maximal ability of fish to provide energy during sustained swimming activity. Therefore, even if fish also uses anaerobic pathway to provide energy when oxygen disponibility and aerobic metabolism are not sufficient,  $U_{crit}$  and aerobic metabolic performance are often closely related.

Aerobic metabolic scope (AMS; Fry, 1947, 1971) is defined as the difference between (i) active metabolic rate (AMR), which is the maximal metabolic rate under maximal activity and (ii) standard metabolic rate (SMR), the metabolic rate when the organism is at rest (Fry, 1947; Brett, 1964). AMS can be modulated by a set of environmental parameters such as

temperature, dissolved oxygen or pollutants (Shurmann & Steffensen, 1997; Lefrançois & Claireaux, 2003; Johansen & Jones, 2011), and is therefore considered as a proxy to assess physiological performances and fitness of an individual in a given environment (Priede, 1985; Claireaux & Lefrançois, 2007). Specifically to hydrocarbons, the study of Davoody & Claireaux (2007) showed a 30% decrease in AMS due to a 27% reduction of AMR on the common sole (*Solea solea*) exposed to an acute oil contamination. Furthermore, exposure to toxicants is known to induce detoxification processes, as well as damages and repair of cells and/or tissues (Lesvesque et al., 2002; Campbell et al., 2003; Singh et al., 2008). These processes are energy-costly, which is likely to increase costs of maintenance and consequently standard aerobic metabolism (Lannig et al. 2006). Increase of SMR and/or decrease of AMR reduce AMS and the capacity of fish to cope with energy demanding-activities such as swimming (e.g. Claireaux & Lefrançois, 2007).

In order to evaluate the effect of pollutants on both swimming and aerobic metabolic performance on fish, the present study focused on polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), which are one of the most common persistent organic pollutants in environment (McElroy *et al.*, 1989, Dabestani and Ivanov, 1999). Their high concentration in aquatic ecosystems is usually associated to anthropogenic activities (e.g. urbanization, industrialization, discharges of petroleum) on coastal areas. Characterized by hydrophobicity, PAHs could be adsorbed to suspended particules and consequently accumulated in marine sediments, which is a direct source of contamination for benthic organisms. Due to their lipophilicity, PAHs are bioaccumulated by aquatic organisms and through trophic chain (Zanardi et al., 1999, Medeiros and Bicego, 2004; Medeiros et al., 2005). They are present in the environment as mixtures of individuals PAH, which can be classified into light or heavy PAHs depending on their molecular weight and their rings number. Both PAHs from pyrolytic and petrogenic origins were considered in our study; petrogenic PAHs being mainly originated from fossil fuels, while pyrolytic PAHs are produced by incineration processes of organic matter.

The present study aimed at investigating the impairments induced by these 2 different types of PAHs mixtures on zebrafish *Danio rerio*; a small freshwater species well described in literature (Lawrence, 2007) and commonly used in experimental studies. *D. rerio* is characterized by rapid development and short lifecycle permitting investigations at different life stages. We hypothesized that pyrolytic or petrogenic PAHs contamination by trophic pathway may affect swimming capabilities. PAHs are expected to reduce the energy available for costly activities by increasing costs of maintenance due to detoxification processes for

example. Another hypothesis is that, due to mutagenic or carcinogenic effects, PAHs could affect cardiac structure (Hawkins, 1990; Myers, 1991). PAHs could have indirect effects too, by inducing oxidative stress (Sundt et al. 2006; Oliveira et al. 2008, Oliva et al., 2010) and altering muscular functioning. Swimming and metabolic variables were assessed in juveniles and adults after long-term (2 and 6 months) chronic exposure to PAHs, as well as in their offspring.

## II.2. Materials & Methods

### III.2.1 General production of zebrafish

Zebrafish (wild-type Tuebingen strain, TU) were reared at the laboratory. They were fed twice daily with uncontaminated commercial dry food (INICIO Plus, BioMar, France) and once by *Artemias sp.* nauplii (Ocean Nutrition, Belgium), occasionally supplemented with red sludge worms (Boschetto-Frozen fish food). They were maintained in tanks filled with a mix of osmosis and filtered tap water which was characterized by the following parameters: temperature  $28 \pm 0.5$  °C, conductivity  $300 \pm 50$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ , oxygen saturation  $\geq 80$  %, pH  $7.5 \pm 0.5$ . Fish were reared with a photoperiod of 14 h light/10 h dark. Ammonia, nitrite and nitrate remained within recommended ranges (Lawrence, 2007). As described in Lucas et al. (2013, *In press*, Annexe 2), the tested fish came from weekly spawn of few selected couples. Briefly, the day before the spawn, these couples of fish were isolated in 1 l breeding tanks (AquaSchwarz, Germany). After cleaning, fertilized and normally developed eggs were selected using a binocular microscope. To avoid a potential spawning effect, spawns were mixed. From 2 weeks onwards, fish were kept in groups of 30 individuals in 10l aquaria.

### III.2.2 Protocol of food contamination

Pyrolytic fraction (*PY*) was extracted from natural sediment sampled in the site of Oissel (Seine Bay, France), while petrogenic fraction (*HO*) was extracted from heavy Erika fuel oil. For both type of mixtures, *PY* and *HO*, quantification of the 16 individual PAHs of the US-EPA list was made according to a protocol described in Budzinski et al. (1997) and Cachot et al. (2007). The concentration  $5000 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$  (in dry weight) was considered to be representative of the concentration of the the 16 PAHs sum from the US-EPA the organisms may be exposed to, in their natural environment (Cachot et al. 2006, Cailleau et al. 2007, Payne et al. 2008). This value will be called *X* in the rest of the manuscript. To highlight the toxicological effects



on the physiological performances investigated in this study, the targeted concentration of PAHs the fish were exposed to was 3X. Artificial dry food (Inicio plus, Biomar France) was accordingly spiked with the extracted *PY* or *HO* fractions according to a protocol adapted from Vicquelin & al. (2011) and described in Lucas et al. (*submitted*, Chap. I). Food size was adapted to the developmental stage of *D. rerio*. A *control* treatment was also performed, and consisted in feeding groups of fish with uncontaminated food only treated by the solvent dichloromethane. This solvent was used to improve PAHs incorporation in the food, and then evaporated. PAHs compositions and concentrations in diet are described in detail in Vignet et al. (*submitted*) and in the Annexe 3.

### III.2.3 Protocol of zebrafish contamination

Contamination through diet pathways was conducted by feeding larvae zebrafish obtained from uncontaminated couples (wild-type Tuebingen strain, TU). Diet started from the first meal (5 days post fertilization, dpf) and lasted 2 or 6 months, which produced contaminated juveniles ( $J_0$ ) and adults ( $A_0$ ), respectively, further called  $F_0$  generation which characteristics are described in Table II.1. Fish of this first generation  $F_0$  were fed twice a day with a ration of food corresponding to 2% of the fish biomass. In parallel and on the same duration, groups of fish were fed with the *control* food. The treatments *Control* and 3X, identified in the manuscript by the subscript  $c$  and  $3X$  respectively, were tested for both type of contamination: *PY* and *HO*. *PY* exposure took place during the second semester of 2011 and the following numbers of replicates were obtained:  $n J_{0-C}=21$ ,  $n J_{0-3X}=22$  for 2-months juveniles  $J_0$  and  $n A_{0-C}=16$ ,  $n A_{0-3X}=15$  for 6-months adults  $A_0$ . *HO* exposure was carried out in summer 2013 and the following number of replicates were obtained:  $n J_{0-C}=15$ ,  $n J_{0-3X}=12$  in 2-months juveniles  $J_0$  and  $n A_{0-C}=19$ ,  $n A_{0-3X}=11$  in 6-months adults  $A_0$ . In order to study the parental effect of the contamination, when mature, some of the contaminated  $F_0$  fish exposed to *PY*-PAHs and some of the  $F_0$  fish exposed to the *control* treatment were used to form couples to obtain a new generation called  $F_1$  which is described in Table II.1. All the fish of this generation  $F_1$  were then fed with normal dry food (Inicio plus, Biomar, France) until the age of 2 months, and the following number of replicates were obtained:  $n J_{1-C}=14$ ,  $n J_{1-3X}=17$ . For fish of all treatments, brine shrimps (Océan Nutrition Europe BVBA, Belgium) were distributed as complementary food once a day. Regarding contamination to *HO*-PAHs, the parental effect was not investigated, because the level of reproduction in adults exposed to the 3X treatment was impaired, which prevented the production of offspring.

**Table II.1.** Biometry of fish for each treatment tested (Mean±SE). Two generations of fish were tested: F<sub>0</sub> as direct contaminated fish for both PAHs fractions and F<sub>1</sub> the progeny of these fish was only tested for *PY* fraction.

	Treatment	Lifestage	Fish	Weight (g)	SL (cm)	TL (cm)
Pyrolytic PAH	Solvent	juveniles F <sub>0</sub>	n=21	0.19±0.06	2.20±0.19	2.68±0.35
		adults F <sub>0</sub>	n=16	0.68±0.21	3.13±0.25	3.88±0.35
		juveniles F <sub>1</sub>	n=14	0.10±0.04	1.81±0.22	2.25±0.25
	3X	juveniles F <sub>0</sub>	n=22	0.17±0.05	2.10±0.26	2.59±0.26
		adults F <sub>0</sub>	n=15	0.48±0.13	2.81±0.24	3.50±0.22
		juveniles F <sub>1</sub>	n=17	0.12±0.09	1.88±0.34	2.37±0.38
Petrogenic PAH	Solvent	juveniles F <sub>0</sub>	n=15	0.09±0.03	1.82±0.28	2.26±0.34
		adults F <sub>0</sub>	n=19	0.30±0.06	2.62±0.19	3.29±0.23
	3x	juveniles F <sub>0</sub>	n=12	0.07±0.03	1.55±0.26	1.97±0.29
		adults F <sub>0</sub>	n=11	0.12±0.04	1.79±0.33	2.27±0.32

### III.2.4 Aerobic metabolic scope and critical swimming speed

#### II.2.4.1 Experimental set-up

For both type of contamination (i.e. *PY* and *HO-PAHs*), 2 identical 170-ml swimming respirometers (Loligo system, Denmark) were used to assess swimming and metabolic performances of fish. Fish were individually submitted to a swimming challenge. Each experimental trial consisted in challenging two fish in parallel: (i) one fish fed by the *control* food and (ii) one fish exposed to the 3X treatment (containing *PY*- or *HO-PAHs*). Each swimming respirometer was composed of (a) a swimming chamber, where the fish was placed to be tested, (b) a motor fitted with a three bladed-propeller to control water flow and (c) honeycomb placed at each side of the swimming chamber to laminarize the water flow. Each swimming respirometer was submerged in a 20 l buffer tank, filled with temperature controlled (i.e. 28°C) and oxygenated mix water as described above. Oxygen consumption

( $\text{MO}_2$  in  $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) associated with the activity of fish was measured by intermittent flow-respirometry. Water supply in each swimming respirometer was provided by flush pumps, which controlled water flow from the buffer tank to the swimming respirometer. This allows alternation between phases of oxygen renewal and phases of  $\text{MO}_2$  measurements with a cycle of 5:20 min. In addition, a peristaltic pump is used to create a continuous water flow from the respirometer to the oxygen probe (Flow through oxygen mini senso, Presens, Germany). The probe is connected to an oxymeter (Microx, Presens, Germany) to record the level of dissolved oxygen in the water every five seconds.

#### *II.2.4.2 Experimental protocol*

The tested fish were starved 24h prior to each experimental trial. For each experimental trial, 2 fish were transferred individually in a swimming respirometer. Fish were submitted to a short acclimation swimming period (~5min) during which the velocity was increased until 2 body length per second ( $\text{BL} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Then, fish were left undisturbed with a water flow of  $0.5 \text{ BL} \cdot \text{s}^{-1}$  during 2 hours. The swimming challenge started by increasing water flow by steps of  $1.5 \text{ BL} \cdot \text{s}^{-1}$  from  $0.5 \text{ BL} \cdot \text{s}^{-1}$  to  $6.5 \text{ BL} \cdot \text{s}^{-1}$  and steps of  $0.75 \text{ BL} \cdot \text{s}^{-1}$  to the end of the test. Each step lasted 20 min. The experiment stopped when fish fatigued, i.e. when it did not manage to swim against the current and stay on the honeycomb. Speed was then decreased to  $0.5 \text{ BL} \cdot \text{s}^{-1}$  and a recovery period of 1.5 hours started. Fish were removed from the swimming respirometer and anesthetized using benzocaine ( $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ). Standard and total length, mass and sex of each individual were determined. Before and after each trial, a blank measurement was performed to quantify microbial oxygen consumption in the swimming respirometer. The average of these 2 values was subtracted from the measured oxygen consumption. Each fish was tested once.

#### *II.2.4.3 Calculations*

##### *II.2.4.3.1 Critical swimming speed*

The critical swimming speed  $U_{\text{crit}}$  (in Body length per second,  $\text{BL} \cdot \text{s}^{-1}$ ) was calculated according to the formula of Brett (1964):

$$U_{\text{crit}} = U_t + t_1 \cdot t^{-1} \cdot U_1 \quad \text{equation (1)}$$

Where  $U_t$  (in  $\text{BL} \cdot \text{s}^{-1}$ ) is the highest velocity maintained for an entire step,  $t_1$  (in min) is the

time spent until the exhaustion of fish at the last step,  $t$  (in min) is the swimming period for each step (i.e. 20 min in our study) and  $U_1$  is the increment velocity (0.75 or 1.5 BL.s<sup>-1</sup>).

#### II.2.4.3.2 Oxygen consumption ( $MO_2$ )

Oxygen consumption  $MO_2$  is expressed in mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> and calculated using the following formula:

$$MO_{2meas} = \Delta[O_2] \cdot V \cdot \Delta t^{-1} \cdot M_{meas}^{-1} \quad \text{equation (2)}$$

where  $\Delta[O_2]$  (in mgO<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>) is the variation in oxygen concentration during the measurement period  $\Delta t$  (in h) and  $V$  (in l) is the volume of the respirometer minus the volume of the fish,  $M_{meas}$  (in g) is the fish mass measured.

An allometric relationship exists between oxygen consumption and body mass, which permits to correct  $MO_{2meas}$  using the following formula:

$$MO_{2cor} = MO_{2meas} \cdot (M_{meas} \cdot M_{cor}^{-1})^{1-b} \quad \text{equation (3)}$$

where  $MO_{2cor}$  (in mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) is the oxygen consumption related to a standard fish of 1g fish ( $M_{cor}$ ),  $MO_{2meas}$  (in mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) is the oxygen consumption estimated for experimented fish whose mass was  $M_{(meas)}$  (in g) and  $b$  is the allometric scaling exponent describing the relationship between oxygen consumption and body mass of fish. We used  $b_{AMR}=0.926$  for the correction of active metabolic rate and  $b_{SMR}=0.965$  for the correction of standard metabolic rate (Lucas et al., in press, Annex 1).

#### II.2.4.3.3 Standard metabolic rate (SMR), active metabolic rate (AMR) and aerobic metabolic scope (AMS)

Oxygen consumption increases exponentially with swimming speed (Brett, 1964). The following equation can be therefore fitted and allows the assessment of SMR:

$$MO_2 = SMR \cdot \exp^{bU} \quad (\text{equation 4})$$

where  $MO_2$  is the oxygen consumption (in mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), SMR is the intercept which means the  $MO_2$  when  $U = 0$  BL.s<sup>-1</sup>,  $b$  is a constant,  $U$  the swimming speed (in BL.s<sup>-1</sup>).

AMR is evaluated as the maximum oxygen consumption measured during the swimming challenge. AMS is the difference between AMR and SMR.  $U_{crit}$ , SMR, AMR and AMS were assessed for each fish except for petrogenic juveniles. No data of SMR were indeed recorded for these individuals, because of the small size of fish (relatively to the swim tunnel volume) and the low quality of the oxygen probe signal.

### III.2.5 Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using Graphpad Prism software. Normality and homoscedaticity of data were checked using Kolmogorov-Smirnoff test and Barlett test, respectively. Student t-tests were used to compare individuals exposed to *control* treatment with individuals exposed to PAHs, for each tested status/duration of exposure (juvenile  $J_0$ , adults  $A_0$  and juvenile  $J_1$ ) and for each type of contamination (*PY* and *HO*). The results were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ .

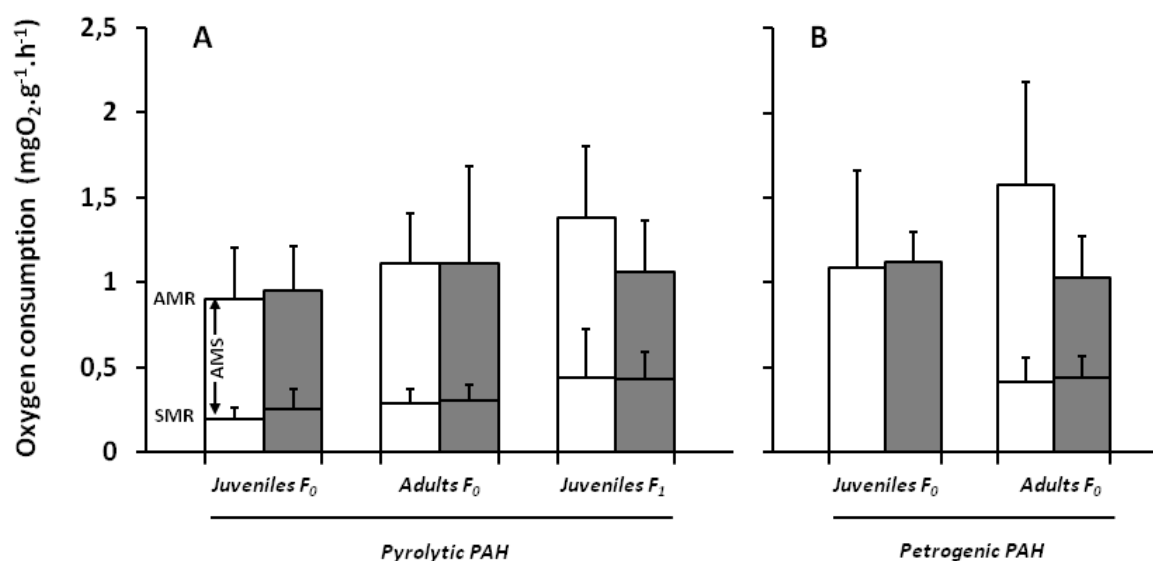
## II.3. Results

### II.3.1 Composition of PAH mixtures

*PY* and *HO* mixtures differ by their chemicals composition. Pyrolytic diet is most composed of heavy PAHs (i.e. four- to six-ring), such as benzofluoranthene or chrysene and only 5 % of methylened compounds. Petrogenic diet is characterized by 47 % of methylened compounds and by a majority of three- four-rings PAHs such as pyrene or phenanthrene. Globally, concentration of the 16 individual PAHs from the US-EPA list are higher in the pyrolytic mixtures than petrogenic mixtures (Annex 3).

### II.3.2 AMR, SMR, AMS

Whatever the types of PAHs contamination, the duration of exposure, the generation considered ( $F_0$  or  $F_1$ ), no significant difference was found between SMR measured in PAHs-contaminated fish and individuals exposed to *control* treatment regarding both *PY* exposure (Fig. II.1A, Student t-test:  $ddl=32$  and  $p=0.40$ ,  $ddl=26$  and  $p=0.46$ ,  $ddl=28$  and  $p=0.38$  for juveniles  $J_0$ , adults  $A_0$  and juveniles  $J_1$  respectively) and *HO* exposure (Fig. II.1B, Student t-test:  $ddl=27$  and  $p=0.35$ , adults  $A_0$ )



**Figure II.1.** Standard metabolic rate (SMR), active metabolic rate (AMR) and aerobic metabolic scope (AMS) of zebrafish *Danio rerio* exposed to food containing solvent (in white), pyrolytic (A) or petrogenic (B) PAHs (in grey). PAH concentrations in food was 3X; the environmental reference concentrations corresponding to  $X_{py}=18151\pm 4983\mu\text{g.g}^{-1}$  and  $X_{pe}=14317\pm 8\mu\text{g.g}^{-1}$  of dry food (Annex 3). Aerobic metabolic rate was estimated at two life stages: juvenile and adults both of the first generation F<sub>0</sub>. For pyrolytic treatment, juveniles of the second generation F<sub>1</sub> were also tested. Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation.

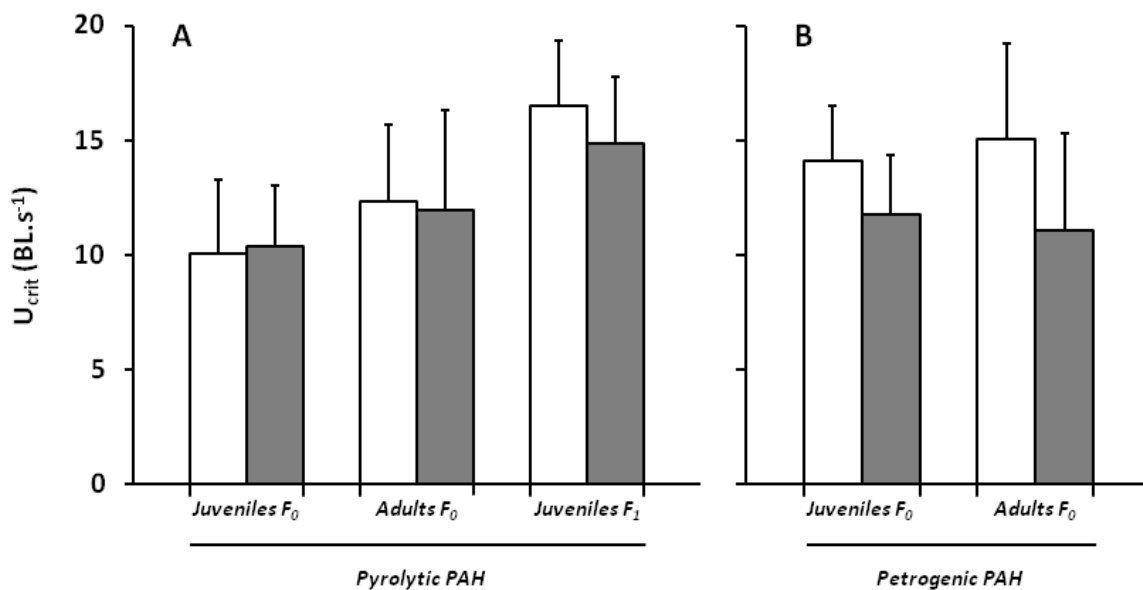
Contrary to SMR, active metabolic rate showed different patterns depending of the type of contamination and exposure duration. After 2 or 6 months of exposure, fish directly exposed to PY-PAHs did not show any significant change in AMR when compared to *control* individuals (Student t-test: ddl=34 and  $p=0.29$ , ddl=26 and  $p=0.44$  for juveniles J<sub>0</sub> and adults A<sub>0</sub>, respectively, Fig. I.2). On the contrary, their descendants juveniles J<sub>1</sub> showed a significantly lower AMR in comparison to descendants of the parents exposed to the *control* treatment (Student t-test: ddl=28,  $p=0.01$ ). In *D. rerio* which ingested food contaminated with HO-PAHs, AMR was significantly impaired but only in adults A<sub>0</sub> (Student t-test: ddl=20 and  $p=0.43$ , ddl=27 and  $p=0.006$ , for juveniles J<sub>0</sub> and adults A<sub>0</sub>, respectively).

As for AMR, AMS was significantly reduced (a) in the progeny J<sub>1</sub> of PY- contaminated fish (Student t-test: ddl=26 and  $p=0.0005$ ) and (b) in the adults A<sub>0</sub> exposed to HO contamination

(Student t-test:  $ddl=27$  and  $p=0.003$ ). On the contrary, no significant difference in AMS was found between the fish directly exposed to *PY*-PAHs and the *control* whatever the exposure duration: 2 months for juveniles (Student t-test:  $ddl=34$  and  $p=0.29$ ) and 6 months for adults (Student t-test:  $ddl=26$  and  $p=0.44$ ). For juveniles  $J_0$  exposed to *HO* treatment, AMS was not estimated due to the lack of SMR data.

### II.3.3 $U_{crit}$

Critical swimming speed tends to decrease in the fish exposed to *PY*-PAHs, but no significant difference was found between *control*- and *3X*- exposed fish whatever the duration of exposure and the generation considered (Student t-test,  $J_0$   $ddl=41$ ,  $p=0.34$ ;  $A_0$   $ddl=26$ ,  $p=0.40$ ;  $J_1$   $ddl=29$ ,  $p=0.06$ ). Regarding *HO* contamination,  $U_{crit}$  decreased significantly in both contaminated juvenile and adults compared to solvent-exposed individuals (Student t-test:  $ddl=24$  and  $p=0.011$ ,  $ddl=28$  and  $p=0.01$  for juveniles  $J_0$  and adults  $A_0$ , respectively).



**Figure II.2.** Critical swimming speed ( $U_{crit}$ ) of zebrafish exposed to solvent (in white) or to PAHs from pyrolytic (A) or petrogenic (B) origins (in grey). PAHs concentrations in food was  $3X$ ; the environmental reference concentrations  $X$  corresponding to  $X_{py}=18151\pm4983\mu\text{g.g}^{-1}$  and  $X_{pe}=14317\pm8\mu\text{g.g}^{-1}$  of dry food (Annex 3).  $U_{crit}$  was evaluated in juvenile and adults both of the first generation  $F_0$ . In addition, for pyrolytic contaminations, juveniles of the second generation ( $F_1$ ) were tested. Results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviation.

## II.4. Discussion

This study assessed metabolic and swimming performance in zebrafish chronically exposed to 2 different mixtures of PAHs through trophic pathway. The results suggested that, in our experimental conditions, exposure to PAHs impaired differently the fish depending on (a) the type of PAHs, i.e. pyrolytic or petrogenic, and (b) the metabolic rate considered. AMR was indeed influenced by PAHs exposure, while SMR did not.

Since only one other study has looked at aerobic metabolism in PAHs-exposed zebrafish (Lucas, submitted, Chap. I), comparison with other investigations will be mainly focused on *control* individuals. Focusing on SMR, Barrionuevo & Burggren (1999), working on 28°C-acclimated and 2 months-old zebrafish, estimated SMR to be 0.19 mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. Lucas et al (submitted, Chap. I) estimated SMR in 2-months juveniles J<sub>0</sub> and J<sub>1</sub>, as well as in 6 months-adults A<sub>0</sub>. They employed the same strain of zebrafish, which was reared in the same way than in the present study. On the contrary, the approach to assess metabolic rate was different: static respirometry was used in Lucas et al (submitted, Chap. I) and swimming respirometry in the present study. Despite this difference of protocol, they found an average SMR ranging between 0.16 and 0.28 mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, which is consistent with the values found in the present study; except in juveniles J<sub>1</sub>, whose SMR tended to be higher (Fig. 1). Regarding AMR in *control* fish, average values ranged between 0.9 and 1.6 mgO<sub>2</sub>. h<sup>-1</sup>.kg<sup>-1</sup> (Fig. II.1.). When measured through swimming challenge by Thomas & Janz (2011), AMR in zebrafish tended to be 1.5 times higher. Compared with Lucas et al., (2013, *in press*) and Lucas et al. (*submitted*). the maximal oxygen consumption measured by static respirometry method was on the contrary from 30 to 50 % lower. Such differences observed in SMR and AMR estimation could be explained by differences in the general physiological status of the tested groups of zebrafish (e.g. related to age, thermal acclimatization, rearing conditions). In addition, differences in protocol may influence the assessment of both SMR and AMR. For instance, even if reduced (due to the adapted-size of the respirometer for static respirometry or to the controlled current speed in swim tunnel), fish may present spontaneous activity, which would tend to over-estimate SMR. Regarding maximum metabolic rate, even if both of these approaches (static and swimming respirometry) are recognized by many authors to give an acute evaluation of AMR (Schurmann & Steffensen, 1997; Lefrançois & Claireaux, 2003; Jourdan-Pineau et al., 2010; Clark et al., 2012; Cannas et al., 2013) it is likely that, in zebrafish, the swimming challenge tends to raise more efficiently metabolic rate to the active



value. However, it is also worth noticing that Peake & Farrell (2006) underlined the importance of behavioural regulations in assessing fish performance through swimming challenges. They suggested that behavior, rather than physiological exhaustion, participates to the fatigue observed in fish tested in a swim flume, increasing thereby the variability of the measured parameters (e.g. AMR and  $U_{crit}$ ).

Concerning PAHs impact, lack of SMR change in pyrolytic PAHs-exposed zebrafish was also demonstrated by Lucas et al (*submitted*, Chap. I); while the absence of study regarding petrogenic contamination does not allow further comparisons. The lack of effect on SMR suggests that in our experimental conditions, PAHs exposure (whatever the type and the duration) did not induce supplementary costs of maintenance in zebrafish (Wilson et al., 1994; Lannig et al. 2006; Sokolova and Lannig, 2008, Lucas et al. *submitted*).

Contrary to SMR, significant impairments were observed in AMR and AMS in the progeny  $J_1$  of *PY*-PAHs exposed fish and in adults  $A_0$  directly exposed to *HO*-PAHs (Fig. II.1). PAHs metabolites were not measured in the juveniles and adults zebrafish. However, following the same protocol, Vignet et al (*submitted*) estimated the concentration of these compounds in 15 dpf-larvae of zebrafish exposed to *PY* or *HO*-PAHs (annex 4 of the present PhD thesis). They observed that the quantity of PAHs metabolites increased with the concentration of PAHs contained in the food the fish were fed with. In particular, in the 15 dpf-larvae exposed to the *3X* treatment, the concentration found was in average  $136 \text{ ng.g}^{-1}$  of larvae *PY* and  $42 \text{ ng.g}^{-1}$  of larvae *HO*, while it was 2 or  $4 \text{ ng.g}^{-1}$  in the *control* fish *PY* and *HO* respectively. Even if not estimated, it is also likely that PAHs metabolites concentration increased proportionally with the duration of exposure; also because PAHs are known to be accumulated or biotransformed by fish due to their lipophilic properties (Tuvikene 1995, Hylland 2006). Adults that were exposed during 6 months to PAHs are therefore expected to have more PAHs metabolites than juveniles, which coped with PAHs exposure only during 2 months. This may contribute to the fact that exposure to *HO*-PAHs induced a significant reduction of AMR in adults  $A_0$ , and not in juveniles  $J_0$ . However, this pattern was not observed in juveniles and adults exposed to *PY*-PAH (Fig. II.1B). Indeed as observed by Lucas et al (*submitted*, Chap I), exposure to this type of PAHs did not induce any significant reduction in AMR, whatever the duration of exposure. This could have several explanations. First, the level of *PY* contamination may be not sufficient to reach the threshold triggering mechanisms involved in metabolic regulations. Second, independently of the level of the concentration, these two PAHs mixtures have different chemical properties depending on their composition in individuals PAHs. Mainly

characterized by three- and four-rings PAHs, and 47% of methylated compounds, *HO*-PAHs could induce more toxic effects than *PY* one (Hylland 2006). In addition, histology analyses were carried out on the same adults zebrafish used for the present experimental study when they were 7 months-old. Histology permitted to observe smaller and more numerous curved hearts associated with oedemas in fish exposed to *HO*-PAHs in comparison to those exposed to *PY*-PAHs (Larcher, personal communication). Cardiac lesions were associated to these oedemas: pericardium appeared dilated with fluid, and heart very small and rounded with a thin ventricular wall. These lesions are characteristic of cardiac insufficiency with secondary collection of fluids in the connective tissues and the body cavities (Larcher, *personal communication*). These lesions may therefore participate to a reduction of cardiac performance, impairing the capacity to transport oxygen and thereby limiting aerobic metabolism especially during high level of activity, such as it occurs during swimming (Fry, 1947, 1971; Priede 1983, Farrell 1997, 2007; Claireaux et al. 2005).

Finally, if we considered specifically exposition to *PY*-PAHs, it induced significant effects on AMR only in the progeny ( $J_1$ , Fig. II.1B). This suggests that in the present experimental study, *PY*-PAHs impaired the zebrafish only through the parental effect. On that subject, it worth noticing that *PY* mixtures are mainly composed by individual PAHs (95%, Annex 3) characterized by a majority of heavy compounds and especially 50% of four-ring compounds. Among these PAHs, benzo[a]pyrene or chrysene are known to have carcinogenic and teratogenic effects during embryonic stages (Harper et al. 1996; Incardona et al. 2004; Nagel, 2010 ; Kerambrun et al. 2012). Through accumulation in gonads (Tuvikene et al., 1995; Monteverdi & Giulio, 2000), the contamination may be transferred to the eggs (Lotufo, 1998; Miller, 1993). Maternal exposure to *PY*-PAHs was already demonstrated to induce early contamination and teratogenic effects such as cardiac deformities (Hicken et al., 2011) or oedema on the progeny (Hall & Oris, 1991).

Regarding fish swimming performance, effects also depended on the type of PAHs they were exposed to. First, for a general comparison, some studies regarding swimming performance in uncontaminated zebrafish can be found in literature. For instance, Plaut and Gordon (1994) tested swimming performance of zebrafish *Brachydanio rerio* and estimated  $U_{crit}$  to be 13  $BL.s^{-1}$ . Plaut et al. (2000) determined  $U_{crit}$  to be 15.5  $BL.s^{-1}$  in adults *Danio rerio* and, in a more recent study, Palstra et al. (2010) measured  $U_{crit}$  to be 18  $BL.s^{-1}$  in average. The present data are in the range of what these authors observed since average  $U_{crit}$  ranges between 10 and 16.5  $BL.s^{-1}$  in *control* individuals (Fig. II.2).

In zebrafish exposed during six months to *HO*-PAHs ( $A_0$ , Fig. II.1), decrease in AMR was combined with an impairment of swimming performance illustrated by a 26.5% reduction in  $U_{crit}$ . A similar pattern was observed in literature regarding pollutant effects on swimming performance (Howard, 1975; Cheng and Ferrell, 2007; Hicken et al., 2011; Marit and Weber, 2011, 2012; Thomas and Janz, 2011). On the contrary, some inadequacies are observed when comparison is made between AMR and  $U_{crit}$  variations in others PAHs-exposed fish. For instance, among fish directly exposed to *HO*-PAHs, the two months-juveniles ( $J_0$ ) showed a significant decrease in  $U_{crit}$ , whereas AMR was found constant when compared with *control* group. The contrary was observed in the progeny  $J_1$  born to the adults directly exposed to *PY*-PAHs: AMR was significantly impaired while  $U_{crit}$  was not. It is worst noticing that  $U_{crit}$  depends on both aerobic and anaerobic metabolism (Webb, 1998). However, anaerobic part of the metabolism requested to attain  $U_{crit}$  was not assessed in the present study, neither the oxygen debt after the swimming test (e.g. Vagner et al 2008).

## II.5. Conclusion

The lack of effect on aerobic metabolism after direct exposure to *PY*-PAH is in accordance with Lucas et al (submitted). The fact that impairments of AMR and AMS depend on the type of PAHs and the duration of exposure could be explained by different chemical compositions and toxicity properties. This study on swimming performance and associated energetic costs will be completed by future investigations regarding escape performance. This type of swimming depends on anaerobic way, as well as on sensorial and locomotion performance. This could complete our understanding of effects of PAHs mixtures on physiological performance in fish.





---

**Chapitre III : Transfert parental d'une  
contamination aux HAP de type  
pyrolytique : effet sur le métabolisme  
aérobie et la fréquence cardiaque au stade  
larvaire de poisson zèbre *Danio rerio***

---



## Résumé

L'objectif de ce chapitre était d'étudier l'impact d'une exposition aux HAP de type pyrolytique sur le stade larvaire de la descendance  $F_1$  de poissons directement exposés. En effet, le chapitre II a permis de mettre en évidence une réduction de la capacité métabolique aérobie chez la descendance âgée de 2 mois et dont les géniteurs avaient été exposés à la plus forte concentration de 3X, supposant une altération de la capacité du poisson à transporter l'oxygène et/ou à produire de l'énergie. Afin de mieux évaluer les effets parentaux de ce type de contamination et ses effets précoces, la capacité métabolique aérobie et le rythme cardiaque de larves  $F_1$  de 5 jours ont été évalués dans ce chapitre pour tous les niveaux de concentration proposés dans le cadre du projet (i.e. 0,3X, 1X, 3X).

Le rythme cardiaque constitue un indicateur du fonctionnement de la pompe cardiaque qui est sensible aux stress environnementaux (Gamperl & Farrell, 2004). Il permet d'avoir une mesure non invasive d'un des mécanismes cardiovasculaires dont dépendent les performances cardiaques. En effet, l'un des avantages de l'utilisation du poisson zèbre est l'absence de pigmentation chez les embryons et les larves dans les premiers jours permettant la mesure par transparence du rythme cardiaque. L'intérêt supplémentaire de cette étude est le lien fonctionnel existant entre le cœur et le métabolisme aérobie, qui est la fonction principalement étudiée dans ce travail de thèse vu son caractère intégrateur au niveau individuel et qui dépend de la capacité de l'organisme à transporter et fournir l'oxygène nécessaire aux processus métaboliques produisant de l'énergie. Tout dysfonctionnement à un niveau d'organisation inférieur, i.e. au niveau cardiaque par exemple, pourrait donc se ressentir au niveau de la capacité métabolique aérobie.

Plusieurs hypothèses ont été émises dans ce chapitre :

- Le stress induit chez les parents par l'exposition aux HAPs d'origine pyrolytique, ou la présence de composés toxiques durant les stades précoces induisent une altération du cœur et une réduction du rythme cardiaque.
- La modification des performances cardiaques entrainerait une diminution de la capacité métabolique aérobie.
- La capacité métabolique aérobie est modifiée suite à une augmentation des coûts de détoxification augmentant le taux métabolique standard (cf. Chap. I).



Les résultats obtenus mettent en évidence une tachycardie chez les larves F<sub>1</sub> issues des adultes du traitement 1X, mais aucune modification de la capacité métabolique aérobie quelle que soit l'exposition initiale subie par les parents (*contrôle*, 0.3X, 1X, 3X), contrairement à ce qui a été observé dans le chapitre précédent chez les juvéniles âgés de 2 mois. Ces observations laisseraient à penser que l'exposition parentale aux HAPs de type pyrolytique n'affecte que très peu les performances cardiaques et, par conséquent, les capacités de transport en oxygène. Toutefois, d'autres paramètres interviennent dans le transport de l'oxygène, comme le volume d'éjection systolique et le débit cardiaque. Claireaux et Davoodi (2010) ont pu observer une réduction de ces deux paramètres chez la sole suite à une contamination au pétrole brut, associée à la diminution du métabolisme aérobie actif. Il paraît ainsi pertinent de compléter ces résultats chez le poisson zèbre en considérant ces autres paramètres représentatifs des performances cardiaques, ainsi qu'en menant une étude à plus long terme permettant d'observer la modulation des performances métaboliques et cardiaques au cours du temps. Aussi, il aurait été intéressant d'étudier la morphologie du cœur au stade larvaire pour avoir une vision globale de l'état de cet organe.

**The effect of parental trophic exposure to pyrolytic polycyclic aromatic hydrocarbons on aerobic metabolism and cardiac frequency in zebrafish larvae, *Danio rerio***

Lucas J. <sup>(1,2)</sup>, Perrichon P. <sup>(2)</sup>, Nouhaud M. <sup>(1)</sup>, Audras A. <sup>(1)</sup>, Le Menach, K. <sup>(3)</sup>, Budzinski H. <sup>(3)</sup>,  
Lefrancois C. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 7266 Littoral Environnement Sociétés (LIENSs), Institut du Littoral et de  
l'Environnement - 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France ;

<sup>(2)</sup> Ifremer, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France ;

<sup>(3)</sup> Université de Bordeaux 1 (EPOC/LPTC, UMR CNRS 5805), 351 Cours de la Libération,  
F33405 Talence Cedex, France

*Keywords:* trophic exposition, maternal transfer, petroleum hydrocarbons, sub-lethal concentration, metabolic rate, heart rate, zebrafish



### III.1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute an important family of persistent organic pollutants (POPs) characterized by their resistance and ubiquity (Dabestani & Ivanov, 1999). PAHs come from natural and anthropogenic sources. Pyrolytic PAHs are released through partial combustion of organic matter at high temperature (Hylland et al., 2005) and enter in aquatic ecosystem through atmospheric deposition. This mixture is mainly composed by high molecular weight PAHs (four- to six-rings) and a small proportion of alkylated compounds (e.g. methylated compounds). On the contrary, natural discharges of petroleum or oil accidents introduce petrogenic PAHs which are dominated by low-molecular weight compounds (two- to four- ring) and alkylated compounds. The lipophilic properties of PAHs induce adsorption by suspended particles in aquatic ecosystem which are deposited in marine sediments (Fowler, 1993; Latimer & Zheng, 2003). PAH are also known to be bioaccumulated and biotransformed by aquatic organisms, such as fish (Van der Oost et al., 2003; Wessel et al., 2010). In fact, they are known to bind with Aryl hydrocarbons Receptor (AhR) and activate transcription of *cyp1a* genes through binding (Tuvikene, 1995; Nebert et al., 2004, Billiard et al., 2008). Found as complex mixtures in environment, PAHs are related to multiple mechanisms of toxicity driven by their composition of individual compounds, which may act through several pathways and not necessarily through AhR activation. All these compounds could have synergic or antagonist effects depending on their chemical properties and biotransformation (Barron, 1999; Van der Oost et al., 2003, Wassenber & Di Giulio, 2004; Billiard et al., 2008).

In addition to the risk for human health, PAHs are well described in literature especially for their carcinogenic, genotoxic and mutagenic effects on fish (Hawkins et al. 2003; Myers et al., 1991; Tuvikene, 1995; Larcher et al, *submitted*). PAHs are also known to impact growth, reproduction and survival of aquatic organisms (Meador et al. 2006; Kim et al., 2008; Horng et al., 2010). In aquatic environment, fish eggs could be directly affected by PAHs by contact with sediment or water, and through maternal transfer, which could affect the offspring. For instance, hydrocarbons such as anthracene or benzo[a]pyrene are known to impair reproduction, leading to a reduction of gametogenesis, of the size of the gonads and the number of eggs produced in fathead minnows (*Pimephales promelas*, Hall & Oris, 1991), as well as in both baltic and winter flounder (*Platichthys flesus*, Von Westernhagen et al., 1981; *Pseudopleuronectes americanu*, Fletcher et al., 1982). Maternal effects are recognized as an important pre-natal source of life history variation (McCormick, 2009). In addition, maternal

transfer of all sorts of xenobiotics has been documented in freshwater fish (Hall & Oris, 1991; Latif et al., , 2001; Miller et al.,1993) and marine fish (Monteverdi & Di Giulio, 2000; Von Westernhagen et al., 1981). Transfer to eggs of POPs and their metabolites induce deleterious effects on early life-stage of fish and reduce survivorship offspring (Hall & Oris, 1991; Von Westernhagen et al., 1981). In addition, Lucas et al. (Chap. II) showed that parental chronic exposure to pyrolytic PAHs induces a decrease of aerobic metabolism in the progeny. They observed in 2 months-zebrafish a 23% decrease in active metabolic rate during swimming challenge. They suggested that parental exposure to PAH induces early contamination and that it would be relevant to investigate metabolic performance in earlier stages, such as larval one. In fact, precocious exposure to PAHs lead teratogenic effects such as cardiac deformities in *Danio rerio* directly exposed (Incardona et al. 2003, 2004, 2009, 2011; Hicken et al., 2011) or oedema on the progeny (Hall & Oris, 1991). Any cardiac dysfunction is likely to impair the ability of fish to transport oxygen and thereby could influence aerobic metabolism and associated physiological performance later in life and, in turn, reduce survival (Hicken et al., 2011). In this context, the main objective of this study was to investigate the effects of pyrolytic contamination through parental transfer. In order to do so, aerobic metabolism and cardiac frequency were measured in 5 days post fertilizations (dpf) larvae born to genitors exposed to pyrolytic-PAHs through trophic pathway.

## III.2. Material & Methods

### III.2.1 Protocol of food contamination

Pyrolytic PAHs fraction (*PY*) has been extracted from sediment in the Seine Bay (France). According to the protocol described by Budzinski et al. (1997) and Cachot et al. (2007), the 16 more toxicant PAHs listed by the US Environmental Protection Agency (US-EPA) have been extracted and quantified. Age-adapted food (INICIO Plus, Biomar, France) was then spiked with *PY* fraction using protocol adapted from Vicquelin & al. (2011) and described in Lucas et al. (*submitted*). The concentration  $5\mu\text{g.g}^{-1}$  of food was considered as an environmental relevant value, since it is representative of what is measured in mollusks in the Seine bay (Cachot et al. 2006). Based on this concentration of reference called *X*, three treatments were tested: *0.3X*, *1X* and *3X* which corresponds to the concentrations targeted in the experimental food. A fourth treatment was tested for which food contained only dichloromethane, the solvent used to spiked the food. This treatment was considered as the

*control*. PAHs compositions and concentrations in diet used for exposure are described in detail in Annex 3.

### III.2.2 *Zebrafish exposure*

The tested progeny came from genitors directly exposed to pyrolytic PAH by trophic pathway. These genitors were themselves obtained from uncontaminated couples (wild-type Tuebingen strain, *TU*) as described in Lucas et al. (*submitted*). They were fed from the first meal (5 dpf) to the adult stage by one of the 4 types of food (i.e. control, 0.3X, 1X or 3X). These groups of contaminated individuals represented the first generation called F<sub>0</sub>. When they were mature (from 4 months old), some of these fish were used to form couples to obtain a new generation called F<sub>1</sub>. Until 5dpf, embryos and larvae F<sub>1</sub> were maintained in Petri dishes (6-7 ml) into ionic enriched solution of E3 at constant temperature of 28°C and at a photoperiod of 14 h light/10 h dark. Because of enough yolk sac reserves that fulfill dietary needs and the mouth opening that occurs at the age of 5 dpf, larvae never received food before the test.

### III.2.3 *Respirometry*

#### III.2.3.1. *Experimental set-up*

The set-up consisted of 8 independent glass micro respirometer chambers (diameter  $d= 1.12$  cm, volume  $V= 0.98.10^{-3}$  l; Loligo systems, Denmark). Respirometers were submerged into buffer tanks (depth x length x height: 10x20x31 cm) and filled with oxygenated E3 solution at a constant temperature of 28°C. Peristaltic pumps controlled the water supply from the buffer tank to each respirometer. Each pump was controlled by a timer, allowing intermittent flow respirometry (Steffensen, 1989) where phases of oxygen renewal alternated with phases of oxygen consumption measurements with a period of 15:15 min. Each respirometer was equipped with a fiber optic sensor (PreSens) connected to a multichannel oxygen measuring system (OXY 4 mini, PreSens) to record dissolved oxygen levels. Optic fibers were calibrated at 0% and 100% of air saturation at a temperature of 28°C. A factor of conversion based on oxygen solubility into water was used to convert oxygen data from percentage saturation to  $\text{mgO}_2.\text{l}^{-1}$  (i.e. 100% was equivalent to  $7.94 \text{ mgO}_2.\text{l}^{-1}$  for a 28°C temperature and a 0 salinity). Oxygen saturation was recorded every five seconds with the program Oxyview (PreSens).

#### III.2.3.2. *Experimental protocol*

Each experimental trial consisted in testing simultaneously groups of 10 larvae F<sub>1</sub> whose

parents were exposed to one of the four treatments (0.3X, 1X, 3X and control). A total of groups was tested ( $n_{control}=9$  groups,  $n_{0.3X}=8$  groups,  $n_{1X}=12$  groups,  $n_{3X}=7$  groups). Each experimental trial involved two steps. First, to assess *AMR*, metabolism of larvae F<sub>1</sub> was increased through chasing (Schurmann & Steffensen, 1997; Lefrançois & Claireaux, 2003; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010; Cannas *et al.*, 2013, Clark *et al.*, 2012). Groups of 10 larvae were chased with a stick into petri dishes. When exhausted (i.e. did not respond to stimulation), each group was transferred into one of the 8 respirometers to assess a first oxygen consumption over the next 15 min. Second, to estimate *SMR*, larvae were left undisturbed in the respirometer for 48h, during which oxygen consumption was regularly and automatically measured. After this period of measurements, larvae were removed from the respirometers and slightly anesthetized with benzocaïne at a concentration of 50mg.l<sup>-1</sup>. The body mass of each individual was determined using a microbalance. The tested groups showed homogenous weights; the average ‘group weight’ being  $M= 0.20\pm 0.02$  mg (mean  $\pm$  S.E). Before and after each trial, a blank measurement was performed to quantify microbial oxygen consumption in the respirometer. The average of these 2 values was subtracted from the measured oxygen consumption. Each group of larvae was tested once.

### III.2.3.3. Calculations

#### Oxygen consumption ( $MO_2$ )

Oxygen consumption  $MO_2$  is expressed in mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> and calculated according to the following formula:

$$MO_{2meas} = \Delta[O_2] \cdot V \cdot \Delta t^{-1} \cdot M_{meas}^{-1} \quad \text{equation (1)}$$

where  $\Delta[O_2]$  (in mgO<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>) is the variation in oxygen concentration during the measurement period  $\Delta t$  (in h) and  $V$  (in l) is the volume of the respirometer minus the volume of the group of 10 larvae,  $M_{meas}$  (in g) is the mass of each tested group of 10 larvae .

An allometric relationship exists between oxygen consumption and body mass, which permit to correct  $MO_{2meas}$  using the following formula:

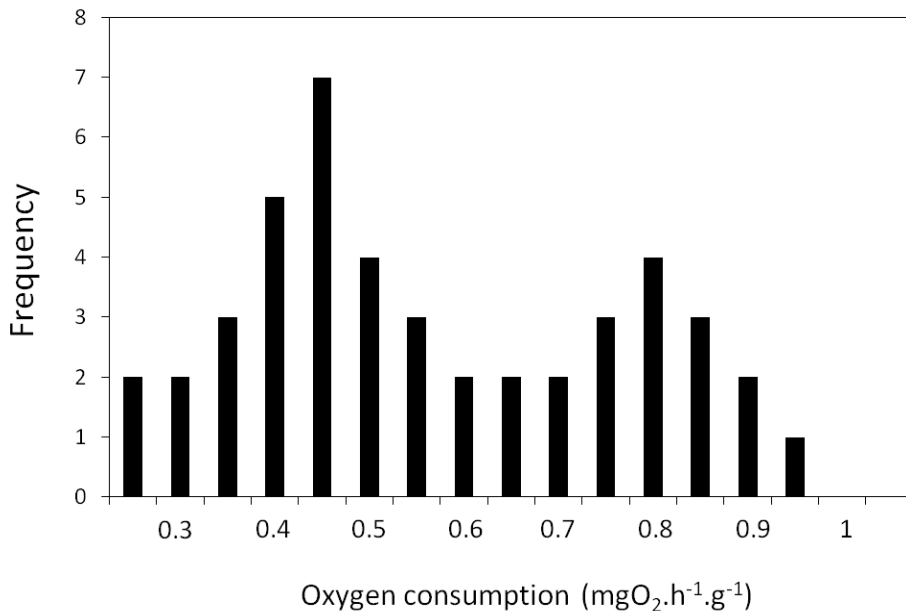
$$MO_{2cor} = MO_{2meas} \cdot (M_{meas} \cdot M_{cor}^{-1})^{1-b} \quad \text{equation (2)}$$

where  $MO_{2cor}$  (in mgO<sub>2</sub>.g<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) is the oxygen consumption related to a standard fish of 1g

( $M_{cor}$ ),  $MO_{2meas}$  (in  $mgO_2 \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ ) is the oxygen consumption estimated for experimented fish whose mass was  $M_{(meas)}$  (in g) and  $b$  is the allometric scaling exponent describing the relationship between oxygen consumption and body mass of fish. We used  $b_{AMR}=0.926$  for the correction of active metabolic rate and  $b_{SMR}=0.965$  for the correction of standard metabolic rate (Lucas et al., in press, annex 2).

*Active metabolic rate (AMR), standard metabolic rate (SMR) and aerobic metabolic scope (AMS) assessment*

AMR was assessed as the maximal  $MO_2$  obtained after chasing the larvae. SMR was estimated according to the method described by Steffensen *et al.* (1994). Briefly, the frequency distribution of  $MO_2$  values recorded during the last 24 hours of the test was plotted. This generally produces a bimodal frequency distribution due to the routine activity of the fish. The higher mode (i.e. the first peak, Fig. III.1) is considered to reflect the SMR and the lower mode (i.e. the second peak, Fig. III.1) corresponds to the routine metabolic rate (RMR), i.e. the energy required by the fish for spontaneous activity. Aerobic metabolic scope (AMS) is the difference between AMR and SMR. AMR, SMR and AMS were assessed for each group.



**Figure III.1.** An example of frequency distribution of oxygen consumption in larvae. The left and right peaks represent SMR and RMR, respectively.



### III.2.4 Cardiac frequency

#### III.2.4.1. Experimental protocol

In order to assess cardiac frequency  $f_H$ , larvae  $F_1$  (different from thus tested in respirometry) were tested individually ( $n_{control} = 22$ ,  $n_{0.3X} = 30$ ,  $n_{1X} = 23$ ,  $n_{3X} = 26$ ). The low pigmentation and transparency of larvae at 5dpf permitted to measure  $f_H$  visually through the body wall. In order to do so, individuals were placed into 2% agar groove on petri dishes (i.e. 6-7 ml). The addition of 3% methylcellulose permitted to maintain larvae motionless in lateral position. Previous tests permitted to determine that two hours acclimation were necessary to distress from the transfer and reach basal heart rate. Three consecutive videos of 30 seconds were recorded to observe *in vivo* beating heart of each larva. The use of a microscope (Olympus SZX9), above which was placed a color camera (DMK 31AU03- The Imaging sources, Germany), permitted to record videos on IC Capture software at 15 images per second.

#### III.2.4.2. Videos analysis

Estimation of  $f_H$  was based on the principle that each passage of blood from atrium to ventricle corresponds to a cardiac contraction. In transparent larvae, blood circulation between these two areas induces a difference in contrast on which the video analysis will be based. To improve grey contrasts, Virtual Dub software was used to convert the video in black and white through the addition of filter. Videos were recorded in bitmap format. As each movie lasted 30s and was recorded at 15 images per second, around 450 images were extracted for each video. Each of these sequences of images was then imported in the software Image J, where the use of the Plugin *ROI* (i.e. Region of interest) permitted to automatically delimit the atrium and the ventricle, and to calculate the alternate circulation between these two areas of interest. Data obtained were exported in Statistica for Fourier analysis. This analysis allows deduction of cardiac frequency from the periodical movement of the cardiac contraction.

### III.2.5 Statistical analysis

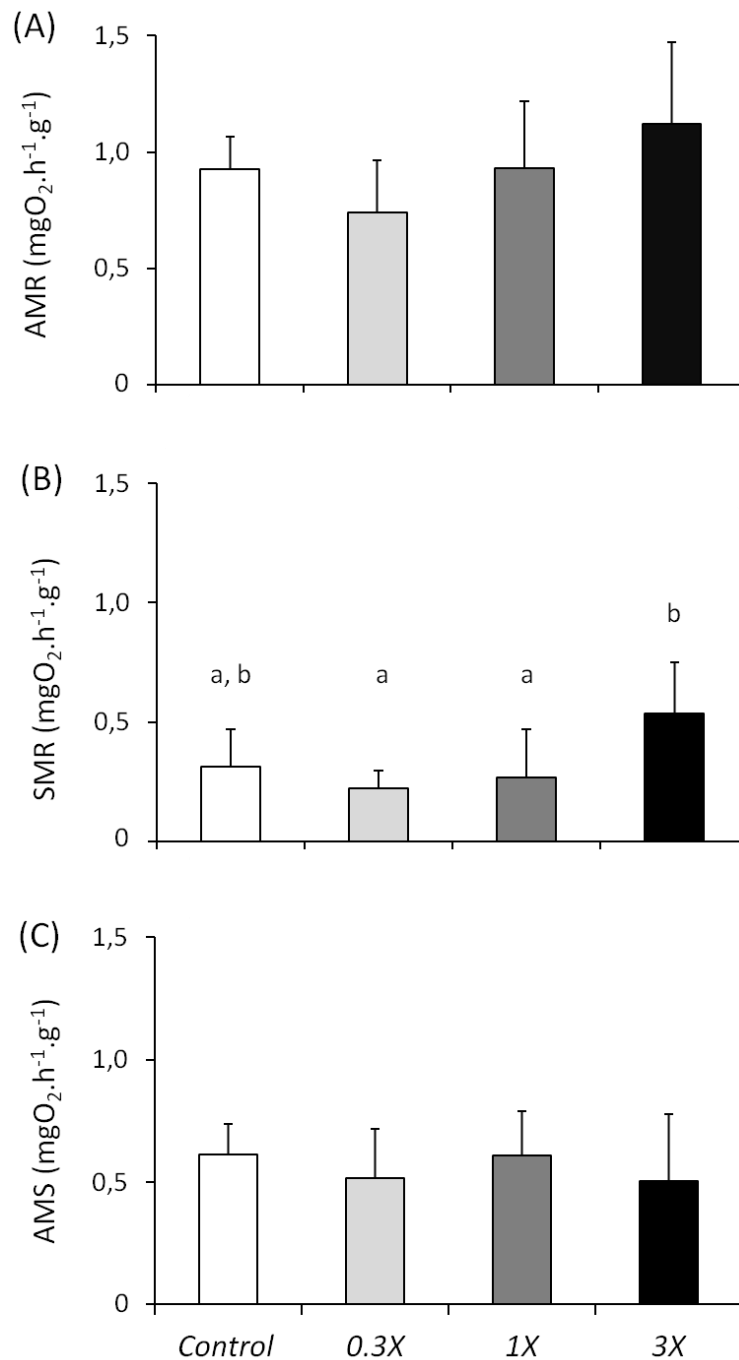
The statistical analysis was carried out using Statistica software. The normality and homoscedaticity were checked through the Shapiro test and Barlett test respectively. These conditions necessary to apply parametric tests were respected. A parametric test of ANOVA was therefore used to determine significant differences due to the treatment (0.3X, 1X, 3X, control). If necessary, a Tuckey post-hoc test was applied to determine which treatments

differed significantly from the control. The results were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ .

### III.3. Results

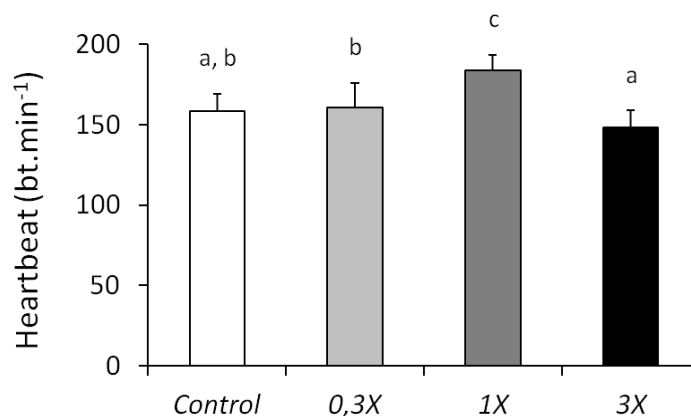
#### III.3.1 AMR, SMR, AMS

Statistical analyses did not show any significant effect of the treatment on AMR (Fig. III.2A, Anova,  $ddl=3$ ,  $F=2.46$ ,  $p=0.08$ ) and on AMS (Fig. III.2C, Anova,  $ddl=3$ ,  $F=0.32$ ,  $p=0.81$ ). On the other hand, the treatment had a significant effect on SMR (Fig. III.2B, Anova,  $ddl=3$ ,  $F=32.61$ ,  $p < 0.01$ ). However, post-hoc test revealed that none of the three treatments (i.e. 0.3X, 1X, 3X) differ significantly from control (Tuckey test  $p > 0.05$  in each case). Significant effect was indeed due to a significant difference observed between larvae from parents exposed to 3X treatment and both of the other PAH treatments (i.e. 0.3X, 1X; Tuckey test  $p_{0.3X-3X}=0.013$ ,  $p_{1X-3X}=0.022$ ).



**Figure III.2.** Active metabolic rate (*AMR*, *A*), standard metabolic rate (*SMR*, *B*) and aerobic metabolic scope (*AMS*, *C*) of 5dpf larvae F<sub>1</sub> zebrafish *Danio rerio* coming from genitors exposed to one of the following treatments: control, 0.3X, 1X and 3X. The environmental reference concentration *X* was 5.5 µg.g<sup>-1</sup> of dry food (Annex 3). For *SMR* (*B*), treatment with common superscript are not significant different.

## III.3.2 Cardiac frequency



**Figure III.3.** Cardiac frequency of 5dpf larvae F<sub>1</sub> zebrafish *Danio rerio* coming from genitors exposed to one of the following treatments: control, 0.3X, 1X and 3X. Mean values ± standard deviation are plotted and treatment with common superscript are not significantly different.

Cardiac frequency  $f_H$  was measured in 5dpf larvae coming from parents exposed to one of the 4 treatments tested (i.e. control, 0.3X, 1X and 3X). PAH exposure induced a significant effect on the cardiac frequency of the progeny (ANOVA,  $ddl=3$ ,  $F=32.61$ ,  $p<0.01$ ). Post hoc test revealed that only cardiac frequency from 1X genitors was significantly different than control with an average  $f_H = 183.8 \pm 9.7$  bt.min<sup>-1</sup> (Tuckey test,  $p<0.01$ ).

### III.4. Discussion

This study assessed the effects of parental exposure to PAHs mixtures on metabolic and cardiac performance in the progeny of zebrafish. Cardiac frequencies measured (i.e.  $158.2 \pm 10.7$ ) are consistent with previous investigations regarding zebrafish development, such as Barrionuevo & Burggren (1999) and Burggren (2005) in which cardiac frequency at 5dpf could be estimated in average to 155 bt.min<sup>-1</sup>. The present results showed a 12.5% significant increase of cardiac frequency in larvae born to parents exposed to PAH with the 1X treatment (Fig. III.3). This suggests that parental exposure involving tachycardia on the progeny whose parents were exposed to the targeted environmental concentration 1X, but not in the case of the highest exposure 3X as it could have been expected. Indeed, even if the concentration of both PAHs and their metabolites have not been assessed in the genitors

directly exposed to the pollutants, Vignet et al (submitted) measured it in the larvae after 15 days of exposure. They showed that concentration of PAH and metabolites in these larvae tended to be proportional to the PAH content of the food they received (Annex 3 & 4). Therefore, because of their lipophilic character, it is likely that PAH and metabolites bioaccumulate in older individuals, and that this proportion remains/was preserved. However, their respective progeny showed a quite stable concentration in PAH and metabolites (Annex 4). This may participate to the fact that no clear pattern regarding the effect of parental exposure to PAH on the progeny cardiac frequency can be established. In addition, it is worth noticing that cardiac frequency was estimated in individuals, while PAH and metabolites dosages were made on larval pools. This could participate to a mismatch in the variability related these two variables. Finally, the lack of effect seems to be in accordance with the low quantity of metabolites compounds measured on larvae F<sub>1</sub> and the same pattern of metabolites distribution observed between treatments (Annex 4). PAHs metabolites concentration was probably not sufficient to reach the threshold required to trigger visible detoxification processes or impair maximal energetic capabilities of larvae.

In addition, recent studies that have investigated cardiotoxicity of PAHs in early life-stages of zebrafish showed effects, such as arrhythmia, bradycardia, but never tachycardia as observed in the present study for the PAH treatment IX (Incardona et al. 2003, 2004, 2005, 2006, 2011; Hicken et al. 2011). Cardiac dysfunctions are indeed generally traduced by decrease in performance through impairment of pacemaker cells, which triggers the contraction (Satchell 1991). For instance, the present results differ from the study of Claireaux & Davoodi (2010) where exposure to petroleum hydrocarbons have been showed to decrease cardiac output in the common sole (*Solea solea*), through a reduction of both frequency and stoke volume. However, comparison is limited since (i) most of these investigations have tested individual compounds at unrealistic environmental concentrations in order to trigger toxic mechanisms that impair physiological or metabolic functions (Incardona et al. 2005, 2006, 2011) and (ii) fish were directly exposed to pollutants whereas in the present study contamination was expected to occur by parental transfer.

Aerobic metabolism of the progeny coming from genitors directly exposed to PAH never differed significantly compared to control; even for the treatment IX for which cardiac frequency was impaired. Very few studies have examined influence of PAHs exposure linking cardio-respiratory performance (e.g. Claireaux & Davoodi, 2010, Hicken, 2011). Associated to decrease in cardiac performance, Claireaux & Davoodi (2010) have observed that fuel-

exposed common sole displayed lower aerobic metabolism compared to control, which is in opposition with our results. Study of Hicken et al. (2011) also demonstrated that early exposure to crude oil altered cardiac morphology (by modifying ventricular shape), which reduced cardio-respiratory performance and aerobic capacity in adult zebrafish. Indeed, the aerobic performance of an organism is linked to the capacity of cardio-vascular system to transport oxygen (Farrell, 2007). On the contrary, in the present study, variations in aerobic metabolism and cardiac frequency did not match (Fig. III.2 and III.3). This may have different explanations. First, it is worth noticing that cardiac frequency is only one cardiac parameter on which depends the oxygen transport; taking in consideration other parameters such as the stroke volume should give a better overview of an organism cardiac performances. Second, the proportion of cutaneous respiration is expected to be high in early life stage, which can distort measure of aerobic metabolism. Third, larvae were tested in group of 10 individuals, while cardiac frequency was measured in individuals. This may also count for the fact that the lack of effects on larvae metabolism differs from what was observed later in 2-months juveniles from the same generation F<sub>1</sub>, i.e. a significant decrease in both AMR and AMS in the treatment 3X (Lucas et al., *submitted*). These juveniles were indeed individually tested, which allowed more acute measurements of metabolic rates.

### III.5. Conclusion

The lack of notably impairments we observed does not imply that PAHs effects were absent but that the level of integration is probably finer at larval stage. Investigation on heart morphology could provide complementary information regarding these results. For instance, as these capacities depend on cardiac form and function, it could be interesting to observed atrial and ventricular shape in 5dpf larvae through specific antibodies marking on these structures. Moreover, as suggested by few studies, maternal transfer of pollutant to fish eggs and larvae could acclimatize them to toxicants, inducing potential compensations at lower level of organization (Peake et al. 2004, Nye et al. 2007).

### Acknowledgements:

We wish to thank Antoine Bonnieux, Didier Leguay, Michel Prineau, and Lucette Joassard for their help during the experiment. All experiments were carried out at Ifremer (Plateforme d'Ecophysiologie des Poissons), La Rochelle station, France. This study was financially supported by the ANR project ConPhyPoP (CES 09\_002) and JL received a doctoral grant of

the Regional Council of Poitou-Charentes. This study was conducted under the approval of Animal Care Committee of France under the official licence of Marie-Laure Bégout (17-010).

---

**Chapitre 4 : Impact d'une contamination  
par voie trophique à des HAP de type  
pyrolytique sur les performances de fuite  
du poisson zèbre *Danio rerio*.**

---





## Résumé

Dans le chapitre II, les performances de nage aérobie ont été évaluées via l'estimation de la vitesse de nage critique, qui permet d'évaluer un effort de nage prolongé. Les performances de locomotion sont considérées comme un caractère déterminant pour la survie des poissons dans un environnement donné (e.g. Domenici & Blake, 1997; Domenici & Kapoor, 2010). Or, outre la nage prolongée qui serait un équivalent des performances d'endurance, le poisson peut présenter d'autres types de nage, eux mêmes sous l'influence des facteurs environnementaux. En plus d'être déterminantes pour la recherche de nourriture ou les migrations par exemple, les performances de nage sont aussi déterminantes dans les relations proies-prédateurs et l'évitement d'un danger, et correspondent alors plutôt à une locomotion de type sprint ou départ rapide. C'est ce type de nage qui est notamment observé au cours d'une réponse de fuite face à un danger tel que l'approche d'un prédateur. Ce réflexe locomoteur se caractérise par de fortes et brèves accélérations (Domenici & Blake, 1997), et dépend d'une série de facteurs extérieurs comme l'intensité et le type de la stimulation (i.e. visuelle, mécano acoustique; Domenici & Kapoor, 2010), la température (Preuss & Faber, 2003), ou l'oxygène (Lefrançois & Domenici, 2006) par exemple.

L'objectif de ce chapitre est de tester l'impact de trois concentrations de HAP d'origine pyrolytique (i.e. 0,3X, 1X, 3X), au niveau individuel, sur la réponse de fuite du poisson zèbre après 6 mois de contamination. La réponse de fuite est une fonction physiologique faisant appel à des performances à la fois neurobiologiques et locomotrices qui peuvent influencer la survie des organismes au cours des interactions proie-prédateur (Walker et al., 2005).

Les résultats obtenus suggèrent qu'après 6 mois d'exposition par voie trophique aux HAP pyrolytiques, il n'existe pas d'effet, que ce soit pour les variables neurosensorielles indicatrices de la réactivité du poisson (i.e. taux de réponse, latence, direction), les performances de manœuvrabilité (i.e. angle de déplacement et vitesse angulaire) ou locomotrices (i.e. durée de la réponse, distance cumulée, vitesse maximale). Ainsi, il ne semble pas y avoir de dysfonctionnement de la ligne latérale et des cellules de Mauthner, impliquées dans la détection des stimuli mécano-acoustiques (Eaton, Lee, & Foreman, 2001). L'absence d'étude sur les HAP ne permet pas de comparaison avec nos observations. Ces résultats sont cependant cohérents avec l'absence d'effets observés au niveau du métabolisme aérobie (chap. I et II) au même âge, suggérant que la contamination par voie trophique et l'utilisation de

HAP de type pyrolytique n'affectent pas ces fonctions biologiques. L'étude de l'impact de HAP de type pétrogénique sur les mêmes variables viendra compléter cette étude. Aucune étude ne s'étant intéressée à l'impact des HAP sur la réponse de fuite, ces données permettront d'approfondir notre connaissance sur la modulation de ces performances de nage face au polluant.

**Impact d'une contamination par voie trophique à des HAP de type pyrolytique sur les performances de fuite du poisson zèbre *Danio rerio***

Lucas J. <sup>(1,2)</sup>, Rosset L.-C. <sup>(1)</sup>, Bonnieux A. <sup>(1)</sup>, Lefrancois C. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 7266 Littoral Environnement Sociétés (LIENSs), Institut du Littoral et de l'Environnement - 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France ;

<sup>(2)</sup> Ifremer, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France ;

*Mots clés:* performances de fuite, HAP de type pyrolytique, exposition trophique, concentrations sublétales, poisson zèbre



## IV.1. Introduction

Sollicitées pour la recherche de nourriture, les migrations, les relations proies-prédateurs, l'évitement d'un danger, ou encore les performances natatoires sont déterminantes pour la survie du poisson dans son environnement (Videler, 1993; Reidy et al., 1995; Drucker & Jensen, 1996; Watkins, 1996; Walker et al., 2005). Parmi ces performances, la réponse de fuite, ou *fast-start*, a été étudiée chez plusieurs espèces de poissons telles que le bar ou le mullet doré *Liza aurata* (Domenici & Blake, 1997; Lefrancois et al. 2005). C'est un mécanisme réflexe caractérisé par une accélération soudaine déclenchée par une stimulation externe telle que l'attaque d'un prédateur. C'est la stimulation de deux neurones géants, appelés cellules de Mauthner, qui induit la contraction controlatérale des muscles, généralement du côté opposé à la stimulation (e.g. Domenici & Blake, 1997; Eaton et al., 2001). Le corps du poisson prend alors la forme d'un C, d'où le nom aussi de *C-start* pour la réponse de fuite. Cette phase s'appelle l'étape 1 ou *stage 1*. Puis le poisson change de direction suite à une contraction ipsilatérale qui correspond au *stage 2* (Weihs, 1973; Domenici & Blake, 1997). Le succès de la réponse de fuite dépend des performances locomotrices et sensorielles de l'animal. La réponse peut être influencée par les caractéristiques individuelles telles que le stade de développement (Wakeling et al., 2000; Fuiman et al., 1997), la taille de l'animal (Webb, 1978; Domenici, 2001), mais aussi par les facteurs environnementaux tels que la température (Johnson and Bennett, 1995; Preuss and Faber, 2003), l'hypoxie (Lefrancois et al., 2005) ou la présence de polluants (McKenzie et al. 2003, Faucher et al. 2006 ; Weber, 2006). Les études concernant l'effet des polluants sur les capacités de fuite sont concentrées sur les effets de l'ammoniac et de quelques métaux lourds (e.g. cadmium, mercure), établissant par exemple un effet négatif sur la réactivité et la locomotion de téléostéens (Mc Kenzie et al., 2008). Bien que très présents dans l'environnement, aucune étude ne s'est intéressée à l'impact des polluants organiques persistants (POP). Pourtant, l'augmentation croissante des activités anthropiques (e.g. urbanisation, industrialisation) induit le rejet dans l'environnement de nombreux POP tels les hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP (Mc Elroy, 1989 ; Hylland, 2006). Présents sous la forme de mélanges complexes, les HAP sont émis lors de la combustion partielle de la matière organique (e.g. HAP d'origine pyrolytique, Walker et al., 2005) ou encore par les rejets de produits pétroliers (e.g. HAP d'origine pétrogénique). Hydrophobes et peu solubles, ils sont adsorbés par les matières en suspension et s'accumulent dans les sédiments ou les organismes aquatiques, notamment chez les invertébrés. L'accumulation est moindre chez les vertébrés tels que les poissons, qui ont de fortes

capacités de biotransformation. Les HAP sont connus pour être carcinogènes (Hawkins et al., 2003; Meyer et al., 2002; Larcher et al, *submitted*), génotoxiques (Collier et al., 1992 ; Akcha et al., 2003) et reprotoxiques (Hall & Oris, 1991; Meador et al. 2006; Kim et al., 2008; Horng et al., 2010). Plusieurs études ont également montré une diminution des performances de nage aérobie des poissons contaminés (Wicks et al., 2002; Hicken et al., 2011; Marit & Weber, 2011). Dans ce contexte, l'objectif de cette étude est de tester l'impact d'une contamination par voie trophique aux HAP pyrolytiques via une approche intégrée évaluant les capacités de fuite du poisson zèbre *Danio rerio*. Bien que leurs effets n'aient jamais été étudiés, les HAP sont supposés altérer la réactivité et la locomotion du poisson face à une stimulation. On peut en effet supposer que les HAP (i) impactent certaines composantes du système nerveux impliquées dans la détection du stimulus (e.g. cerveau, cellules de Mauthner) et/ou (ii) qu'ils réduisent les performances locomotrices et la manœuvrabilité des poissons via des malformations ou dysfonctionnements musculaires par exemple.

## IV.2. Matériel & méthodes

### IV.3.1 Production et maintien des poissons expérimentaux

Les poissons zèbres utilisés lors de la présente étude sont issus de parents sains de la lignée wild-type Tuebingen strain (*TU*) comme décrit par Lucas et al. (2013, *submitted*). Brièvement, plusieurs couples de poissons ont été isolés en pondoir de 1 l (AquaSchwarz, Germany) toutes les semaines. Les pontes sont déclenchées par le passage de la phase nocturne à la phase diurne. Elles sont ensuite récupérées, nettoyées, triées et mélangées en prenant soin de ne sélectionner que les œufs fécondés et correctement développés. Les embryons et larves sont élevés en boîte de Pétri (6-7ml), puis à partir de 5 jours, en pondoir de 1 l. Au-delà de 2 semaines, les poissons sont élevés par groupes de 30 individus en aquarium de 10 l., à une température constante de  $28 \pm 0.5$  °C, et soumis à un rythme nyctéméral de 14 h en phase diurne et 10 h en phase nocturne. Les aquariums sont alimentés en circuit ouvert par un mélange de deux tiers d'eau osmosée et un tiers d'eau de conduite en respectant un pH de  $7.5 \pm 0.5$ , une conductivité de  $300 \pm 50$  µS/cm, et une saturation en oxygène de plus de 80 %. Deux fois par jour, les poissons ont été nourris par de l'aliment sous forme de granulés (INICIO Plus, BioMar, France) dont la taille est adaptée à chaque âge, et contaminés selon la méthode décrite ci-après. Cette alimentation a été complétée une fois par jour par des artémias de 24 h (Ocean Nutrition, Belgium).

### IV.3.2 Protocole de contamination de l'aliment

La présente étude s'est focalisée sur la contamination aux HAP de type pyrolytique. La fraction pyrolytique *PY* a été extraite à partir de sédiment prélevé en Baie de Seine, sur le site de Oissel (France). Les 16 HAP individuels toxiques décrits par la liste de l'US-EPA ont ensuite été dosés selon le protocole décrit par Budzinski et al. (1997) et Cachot et al. (2007). Les granulés servant à l'alimentation (Inicio plus, Biomar France) ont été enrobés avec la fraction *PY* suivant un protocole adapté de Vicquelin et al. (2011) et décrit par Lucas et al. (*submitted*, chap. I). Comme indiqué dans les chapitres précédents, des études préliminaires ont estimé à  $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  la concentration moyenne en HAP dans les mollusques de l'estuaire de Seine. Cette concentration a été considérée comme représentative d'une concentration environnementale. A partir de cette valeur appelée *X*, trois concentrations ont été visées pour la contamination des aliments:  $0.3X$ ,  $1X$  et  $3X$ . Par ailleurs, l'enrobage par les HAP a nécessité l'ajout d'un solvant, le dichlorométhane. Un quatrième traitement contenant uniquement ce solvant a donc été testé, et sera identifié comme *contrôle* dans la suite de ce chapitre. Enfin, un dosage de l'aliment a permis de contrôler les concentrations de HAP pour chaque traitement (Annexe 3).

### IV.3.3 Contamination des poissons

Les larves saines ont été contaminées par voie trophique à partir du premier repas à 5 jours post-fertilisation jusqu'à l'âge adulte de six mois avant d'être testées. Les caractéristiques des lots expérimentaux sont décrites dans le tableau 2 en fonction des traitements auxquels ils ont été exposés. Les poissons ont été nourris deux fois par jour par les granulés contaminés aux différentes concentrations décrites précédemment, et une fois aux artémias de 24 h en guise de complément alimentaire. La taille des granulés était adaptée aux stades de développement des poissons. La ration quotidienne était distribuée *ad libitum* jusqu'à l'âge d'un mois, puis équivalente à 2% de la biomasse. Cette biomasse était réévaluée tous les mois au cours d'une biométrie où la taille et le poids des poissons étaient mesurés individuellement.



**Tableau IV.1.** Caractéristiques biométriques des poissons zèbre adultes testés pour les performances de fuite. Les valeurs de poids moyen et de longueurs moyennes sont présentées de la façon suivante : moyenne  $\pm$  écart-type.

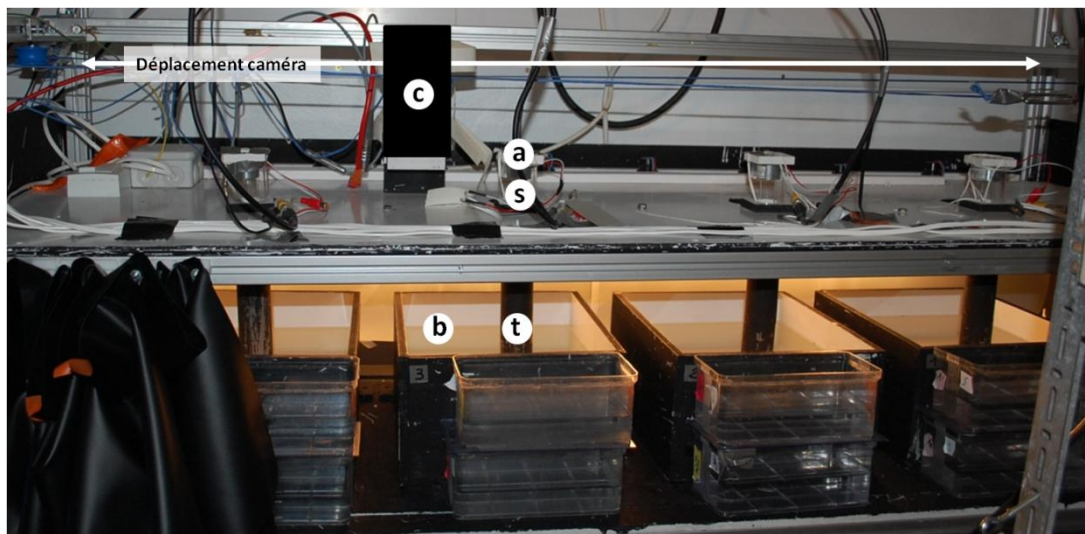
	Stade de développement	Solvant	0,3X	1X	3X
Nombre d'individus	Adulte F <sub>0</sub>	15	12	15	12
Poids moyen (mg)	Adulte F <sub>0</sub>	267,7 $\pm$ 58,6	248,3 $\pm$ 55,5	226,9 $\pm$ 105,9	263,9 $\pm$ 38,1
Longueur standard moyenne (cm)	Adulte F <sub>0</sub>	2,5 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,2	2,3 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,3
Longueur totale moyenne (cm)	Adulte F <sub>0</sub>	3,1 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,2	2,8 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,3

#### IV.3.4 Réponse de fuite

##### IV.2.4.1. Bassins expérimentaux

Au cours d'un test expérimental, l'arrivée brutale d'un prédateur est stimulée et la réponse de la proie potentielle est observée face à ce stimulus. Pour mettre en place ce test, un bassin d'expérimentation (*b* Fig. IV.1 ; longueur x largeur x hauteur en cm: 30 x 27 x 10) contenant de l'eau osmosée maintenue à 28°C est utilisé. Le bassin expérimental est blanc pour pouvoir optimiser le contraste lumineux. Au dessus du bassin est placée une caméra haute vitesse (AOS S-SERIES camera, *c* Fig. IV.1) filmant à 500Hz, soit 500 images s<sup>-1</sup>. La réponse de fuite du poisson est déclenchée grâce à une stimulation mécano-acoustique. La méthode employée a déjà été décrite par de nombreux auteurs (Domenici and Blake, 1997; McKenzie et al. 2003, Faucher et al. 2006 ; Weber, 2006; Lefrancois et al., 2005; Domenici et al., 2007) : la stimulation est provoquée par la chute d'un tube cylindro-conique (*s* Fig. IV.1 , 4 cm de long, 1 cm de diamètre, volume 2 ml) dans le bassin expérimental, simulant ainsi l'attaque d'un prédateur aérien. Ce stimulus est maintenu à 20 cm au dessus de la surface de l'eau par un électro-aimant (*a* Fig. IV.1). Ce dernier est relié à un interrupteur permettant de contrôler, et donc de déclencher à distance, la stimulation afin que la présence de l'expérimentateur ne perturbe pas le comportement du poisson testé. Un tube PVC opaque (*t* Fig. IV.1), dont l'extrémité inférieure se situe à 1 cm de la surface de l'eau, est placé verticalement sous l'électro aimant (*a* Fig. IV.1). Il permet de dissimuler la chute du stimulus afin d'éviter toute stimulation visuelle du téléostéen et de n'avoir qu'une stimulation mécano-acoustique. On détermine ainsi très précisément le moment de la stimulation comme correspondant à l'impact

du stimulus à la surface de l'eau (qui sera appelé plus tard  $t_0$ , Fig. 12 p.47), et permettra de déterminer plusieurs variables, comme par exemple la latence, §4.2.2 p.47 ). Dans un souci d'efficacité, quatre bassins expérimentaux parfaitement identiques ont été utilisés en parallèle, permettant l'acclimatation de quatre poissons en même temps avant d'évaluer leur réponse de fuite. Un système de poulie a été mis en place au dessus des bassins afin de pouvoir déplacer la caméra. Enfin, les bassins expérimentaux sont isolés à l'aide d'une bâche noire afin de limiter les perturbations extérieures.



**Figure IV.1.** Dispositif expérimental de réponse de fuite. (a) électroaimant, (b) bassin expérimental, (c) caméra haute vitesse, (s) stimulus, (t) tube PCV opaque

#### IV.2.4.2. Protocole

Chaque jour de test, 4 poissons (i.e. un par condition) sont transférés individuellement dans les bassins de réponse de fuite pour une période d'acclimatation de 2 h sans aucune perturbation extérieure. Suite à cette période, un premier poisson est stimulé et sa réponse enregistrée (e.g. Fig IV.2.). La stimulation et l'enregistrement vidéo sont déclenchés manuellement lorsque le poisson est idéalement placé au centre du bassin, afin de limiter l'influence des parois sur certaines des variables qui seront mesurées ensuite, comme la trajectoire de fuite. La caméra est ensuite déplacée au dessus du bac suivant. Considérant que cette manipulation puisse perturber le comportement du poisson, une précaution supplémentaire est prise en respectant une période de récupération d'au moins vingt minutes. Ce dernier présente alors un comportement dit de 'routine': il se déplace avec une nage lente

et stable, en explorant l'ensemble du bac expérimental. Une fois la première série de 4 poissons terminée, une deuxième série est testée en suivant le même protocole. Cela permet de tester 8 poissons (i.e. 2 par condition) par jour. Le nombre de réplicats dont les performances de fuite ont été évaluées est indiqué dans le tableau IV.1.

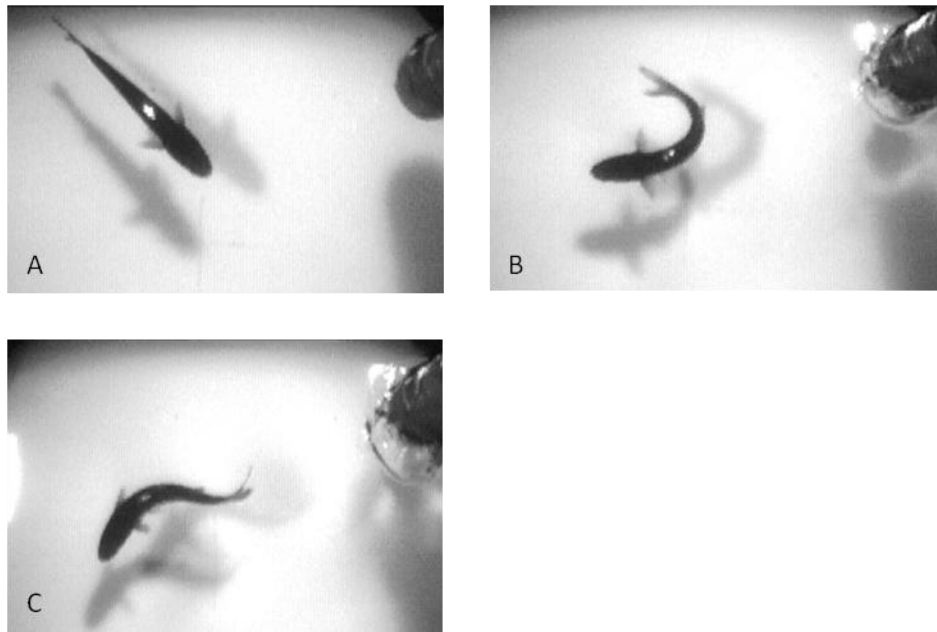


Figure IV.2. Exemple de réponse de fuite chez un mullet doré, *Liza aurata*. Suite à la stimulation déclenchée qui apparaît en haut à droite sur cette vue aérienne, le poisson, à partir de sa position de repos initiale (A), présente une courbure en C liée à la contraction contralatérale par rapport à la stimulation typique de l'étape 1 (B). Suit un changement de direction représentatif de l'étape 2 (C).

#### IV.2.4.3. Analyse vidéo

Les séquences vidéos au format AVI sont exportées dans le logiciel WINanalyze afin d'effectuer un suivi ou *tracking* des mouvements du poisson. Les variables locomotrices et de manœuvrabilités sont calculées à partir des coordonnées X et Y de l'extrémité de la tête du poisson, et de son centre de masse (situé à 1/3 de la longueur totale  $L_T$  de cette extrémité, Lefrancois et al., 2005). Plusieurs variables représentatives des performances de locomotion pendant la fuite sont alors déterminées, ainsi que trois variables (i.e. la latence, le taux de réponse, la direction) qui dépendent de l'intégrité fonctionnelle (i) du système neuro-sensoriel

de l'individu, et notamment de la ligne latérale et/ou de l'oreille interne dont les cellules ciliées vont être stimulées par le signal mécano-acoustique déclenché par le stimulus (ii) des nerfs qui vont participer à la conduction du signal vers les cellules de Mauthner et (iii) de ces dernières qui déclencheront la contraction musculaire via un moto-neurone (Eaton et al., 2001). Comme dans la majorité des études concernant la réponse de fuite chez les poissons (e.g. Kasapi et al. 1993, Domenici & Blake 1997, Lefrançois et al. 2005, Lefrançois & Domenici 2006), ces variables sont définies comme suit:

- le **taux de réponse** correspond à la proportion de poissons ayant répondu à la stimulation et est exprimée en % du nombre total de poissons testés pour chaque traitement,
- la **latence** (en ms) est estimée comme l'intervalle de temps entre la stimulation ( $t_0$ , i.e. lorsque le stimulus percute la surface de l'eau) et le premier mouvement du poisson généralement observé au niveau de la tête ( $t_1$ , Fig. 11 p. 47),
- la **direction** prise par la tête de l'animal à cet instant  $t_1$ , qui peut être *vers* ou *à l'opposé* du stimulus. Chaque type de réponse '*vers*' ou '*à l'opposé*' est exprimée en % du nombre d'individus ayant répondu pour chaque traitement,
- la **durée de la réponse de fuite** (en ms),
- la **distance cumulée  $D$**  (en cm) et la **vitesse maximale  $V_{max}$**  (en  $m.ms^{-1}$ ) atteintes pendant la fuite ont été mesurées en se basant sur le déplacement du centre de masse du poisson. Ces variables sont calculées pour chaque individu, mais sur la durée moyenne de la réponse de fuite, estimée, elle, sur l'ensemble des individus, tout traitement confondu (i.e. 26 ms dans cette étude, cf § 2.2.2 p. 47) comme suggéré par plusieurs auteurs (Webb, 1976; Domenici & Blake, 1991, 1993b).
- l'**angle parcouru ( $A_1$  en  $^\circ$ )** et la **vitesse angulaire ( $V_{ang}$  ou *turning rate* en  $^\circ.ms^{-1}$ )** durant l'étape 1 de la réponse sont représentatifs des capacités de manœuvrabilité de l'individu. Pour les estimer, il est d'abord nécessaire de déterminer la période sur laquelle se déroule l'étape 1. Cette dernière est définie comme débutant à  $t_1$  (i.e. moment auquel le 1<sup>er</sup> mouvement de tête du poisson est observé) et terminant au moment où le prochain changement de direction de la tête est observé (i.e.  $t_2$ , correspondant au début de l'étape 2).  $A_1$  correspond à l'angle formé par (i) l'axe passant par l'extrémité de la tête et le centre de masse à  $t_1$  et (ii) l'axe défini de la même façon, mais cette fois ci à  $t_2$  (Fig. 11 p.47).  $V_{ang}$  est ensuite estimée par le ratio entre l'angle parcouru  $A_1$  et la durée de cette étape.

## IV.3.5 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel Graphpad Prism. Un test du Chi<sup>2</sup> a été utilisé pour déterminer l'effet significatif de la contamination sur le taux de réponse et sur la direction. La normalité (test de Kolmogorov-Smirnov) et l'homoscédaticité (test de Bartlett) des données ont été vérifiées mais ne sont pas respectées. Le test non-paramétrique de Kruskal-Wallis a donc été utilisé pour le reste des variables. Les résultats sont considérés significatifs lorsque  $p < 0.05$ .

## IV.3. Résultats

## IV.3.1 Performances neurosensorielles

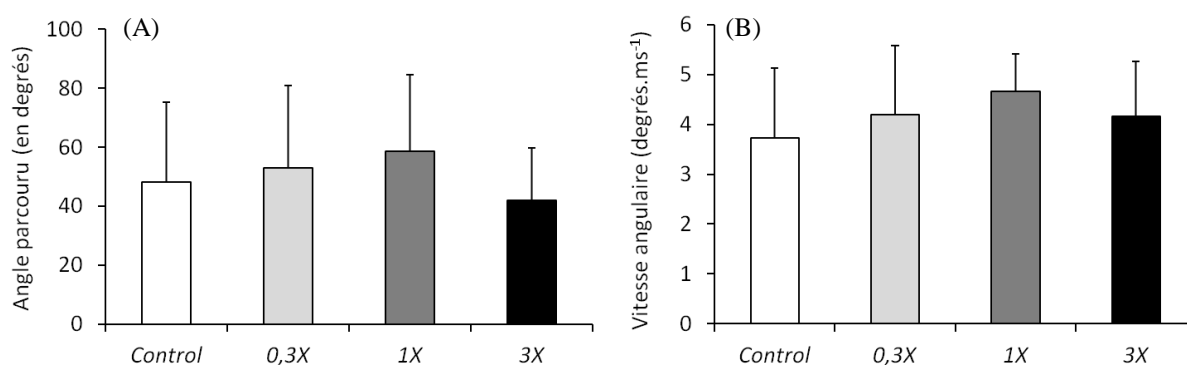
Les variables suivantes : le taux de réponse, la direction et la latence de la réponse de fuite sont résumées dans la table IV.2. De 70% à 100% des poissons ont répondu à la stimulation et aucun effet significatif du traitement auquel a été soumis *D rerio* (contrôle, 0.3X, 1X et 3X) n'a été mis en évidence (Chi<sup>2</sup>,  $p=0.08$ ). Malgré une direction majoritairement à l'opposé du stimulus et une latence plus élevée pour la concentration la plus élevée 3X, aucune différence significative n'a été observée (Chi<sup>2</sup>:  $p=0.37$ , KW:  $p=0.65$  respectivement).

**Tableau IV.2.** Taux de réponse, (en nombre d'individus  $n$  ayant présenté une réponse de fuite et en % du nombre total d'individus stimulés par traitement), direction (en % de nombre de réponses à l'opposé du stimulus par rapport au nombre total de réponse par traitement), temps de réaction du poisson à la stimulation (ou latence, en ms)

Traitement	Taux de réponse (%)	Direction opposée au stimulus (%)	Latence (ms)
<i>Control</i>	82	56	34,5 ± 2,4
<i>0,3X</i>	77	44	35,1 ± 2,5
<i>1X</i>	100	70	34,2 ± 1,3
<i>3X</i>	95	67	40,6 ± 3,9

### IV.3.2 Performances de manœuvrabilité

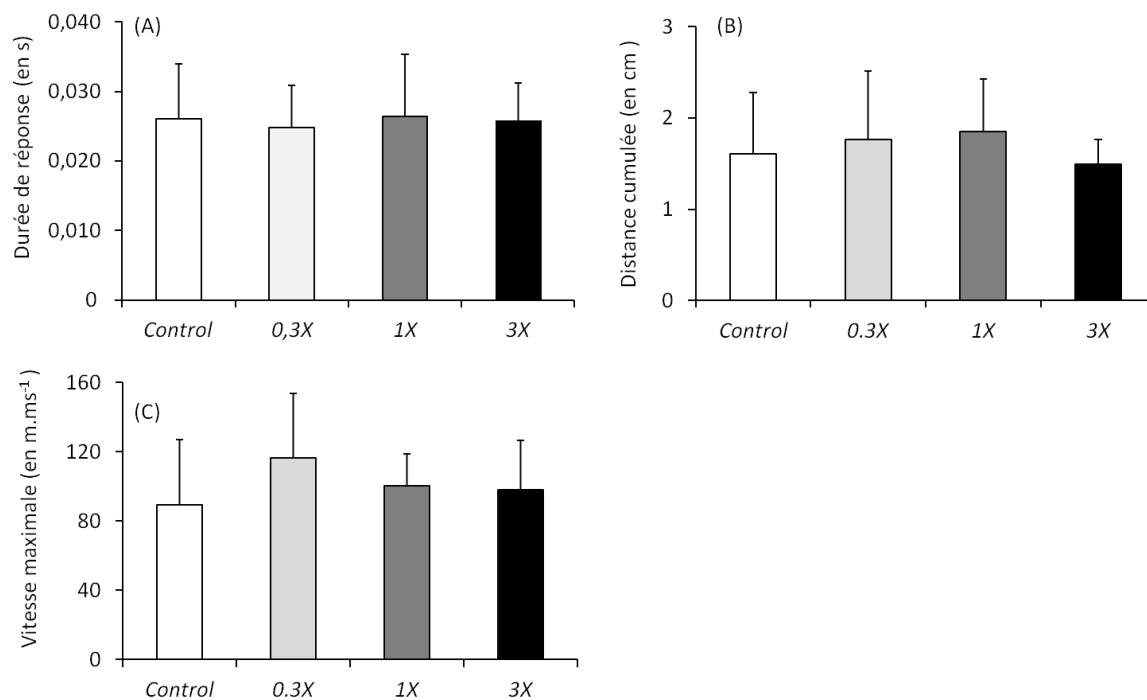
Durant la réponse de fuite, l'étape 1 est caractérisée par une forte contraction musculaire du poisson déclenchée par le stimulus, qui lui donne une forme de C typique du *C-start*.  $A_1$ , l'angle parcouru par le poisson durant cette étape 1 (Fig.IV.3) n'est pas significativement influencé par les traitements auxquels les poissons ont été exposés (KW,  $p=0.39$ ). Il en est de même pour la vitesse angulaire (KW,  $p=0.31$ ).



**Figure IV.3..** (A)  $A_1$ , l'angle parcouru (en degrés) pendant l'étape 1 et (B)  $V_{ang}$ , la vitesse angulaire (en degrés.ms<sup>-1</sup>) lors de cette même étape de la réponse de fuite en fonction des différents types de traitement auxquels les *D. rerio* ont été exposés (0.3X, 1X et 3X) avec la concentration environnementale en HAP de référence  $X = 5.5 \mu\text{g.g}^{-1}$  de nourriture poids sec et au traitement *contrôle*. Les valeurs sont exprimées en moyenne  $\pm$  écart type.

### IV.3.3 Performances locomotrices

La durée moyenne de réponse de fuite n'est pas significativement différente entre les différents traitements (0.3X, 1X, 3X, contrôle; KW,  $p=0.74$ ; Fig2A). La moyenne générale sur l'ensemble des individus a été estimée à 26ms. Aucun effet significatif des traitements n'a été observé ni pour la distance cumulée  $D_c$  (Fig. IV.4B), ni pour la vitesse maximale du poisson toutes deux estimées sur cette durée moyenne de réponse de fuite (Fig. IV.4C, KW,  $p=0.52$ ,  $p=0.19$ , respectivement).



**Figure IV.4..** (A) Durée de réponse, (B) Distance parcourue, (C) Vitesse maximale parcourue au cours d'une réponse de fuite d'une durée moyenne de 26ms chez le poisson zèbre *D. rerio* exposé aux HAP de types pyrolytiques à différentes concentrations 0.3X, 1X et 3X avec concentration environnementale en HAP de référence  $X = 5.5 \mu\text{g.g}^{-1}$  de nourriture poids sec et au traitement *contrôle*. Les résultats sont exprimés en moyenne $\pm$ écart type.

#### IV.4. Discussion

##### *Comparaison des performances de fuite avec d'autres espèces*

Parmi les études sur les performances de fuite des poissons (e.g. Webb, 1978; Domenici et Blake, 1997 ; Lefrançois et al. 2005 ; Lefrançois et Domenici, 2006 ; Danos et Lauder, 2012), seule l'étude de Danos et Lauder (2012) concerne le poisson zèbre. Dans la présente étude, le taux de réponse est compris entre 77 et 100% ce qui est cohérent avec le taux de réponse généralement observé expérimentalement et qui se situe entre 80 et 100% (Domenici & Batty, 1997). Cependant, il est pertinent de souligner que les comparaisons entre ces études sont difficiles puisque la réponse dépend du type et de l'intensité de la stimulation, qui varient d'une étude à l'autre. La latence moyenne mesurée chez le poisson zèbre est de  $36,1 \pm 3,0$  ce qui est plus élevé que la latence comprise entre 10 et 20ms décrite par Eaton et Hackett (1984) chez le poisson rouge *Carassius auratus* et de 9 ms pour le poisson zèbre (Danos et Lauder, 2012). A partir de l'article de Domenici & Blake (1997), dans lequel ils ont dressé une revue

des performances de fuite chez plus de 15 espèces de poissons, on peut remarquer que la latence s'étale sur une large gamme de valeurs allant de 30ms chez le poisson ange *Pterophyllum. Sp.* à 183ms chez le chabot à épines courtes *Myoxocephalus scorpio* (Annexe 6). Il est également admis que 80 à 90 % des réponses sont dirigées à l'opposé du stimulus contre seulement 44 à 70 % dans notre étude (Eaton & Hackett, 1984; Domenici & Blake, 1993a; Lefrancois et al. 2005). Au cours de leur étude sur le poisson zèbre, Danos et Lauder (2012) n'ont pas évalué cette variable de direction, il n'existe donc pas de comparaison possible avec nos résultats. La forte proportion de réponse se dirigeant vers le stimulus chez le poisson zèbre pourrait s'expliquer par une perte de l'intégrité fonctionnelle des cellules de Mauthner, dont la stimulation provoque la contraction musculaire controlatérale ou ipsilatérale, déterminant ainsi la direction prise par la proie. Cette perte d'intégrité fonctionnelle pourrait être liée au phénomène de domestication très marqué depuis de nombreuses générations chez le poisson zèbre. Toutefois, l'absence d'approche électrophysiologique dans notre étude, ainsi que l'inexistence d'étude portant sur les effets de la domestication sur les performances de fuite chez les poissons d'élevage ne permettent pas d'affirmer cela.

Les performances de manœuvrabilité dépendent de la capacité de contraction musculaire et de la flexibilité du corps de l'organisme considéré. L'angle parcouru durant l'étape 1  $A_1$  et la vitesse angulaire  $V_{ang}$  (Fig. IV.3) donnent une indication sur le changement de direction que peut accomplir le poisson dans un temps assez court ce qui participe à son succès de fuite (Walker et al. 2005). Dans la présente étude,  $A_1$  est en moyenne de  $48^\circ$  soit seulement 50% de ce qu'observent Danos et Lauder (2012). De même, la  $V_{ang}$  mesurée est de  $3727^\circ.s^{-1}$  contre  $10000^\circ.s^{-1}$  dans leur étude (Danos & Lauder, 2012). La durée moyenne de la réponse de fuite chez le poisson zèbre a été estimée à 26ms ce qui concorde avec les 19ms en moyenne observées par Danos & Lauder (2012). La vitesse maximale moyenne de  $101,7m.ms^{-1}$  est également inférieure à ce qui est trouvé dans la littérature pour d'autres espèces (Domenici et Blake, 1997) Dans l'ensemble, les performances de fuite semblent ainsi réduites chez le poisson zèbre, indépendamment du traitement auquel ils ont été exposés, comparé aux autres espèces de poissons (Domenici et Blake, 1997, Annexe 6).

#### *Impact des polluants*

Peu d'études se sont intéressées à l'impact de polluants sur les performances de fuite des organismes de manière générale. De surcroit, ces études concernent les polluants inorganiques tels que l'ammoniac ou les métaux lourds, connus pour leur neurotoxicité, notamment au



niveau musculaire (Randall & Tsui, 2002 ; McKenzie et al. 2003 ; Faucher et al. 2006 ; Weber, 2006). Le mercure ou encore le cadmium par exemple engendrent des dysfonctionnements au niveau de la ligne latérale chez le bar commun *Dicentrarchus labrax* (Faucher et al. 2006) et le poisson zèbre *D. rerio* (Weber, 2006). Ainsi, il a été observé une altération des performances sensorielles à travers une réduction du taux de réponse, une augmentation de la latence et de la vitesse de réaction chez ces 2 espèces. L'ammoniac réduit quant à lui la réactivité via l'augmentation de la latence, et altère les performances de locomotion telles que la vitesse maximale ou l'accélération du poisson (e.g. *Liza aurata*, McKenzie et al., 2008). Aucune étude ne s'est intéressée aux effets des HAP sur les performances de fuite. Seules quelques données sur l'impact de pétrole brut et de l'utilisation de dispersant sur la réponse de fuite du mulot doré *Liza aurata* suggèrent l'absence d'effet de la contamination sur les variables sensorielles (Milinkovitch, *Communication personnelle*).

Comme il a déjà été discuté dans les chapitres précédents, les dosages de métabolites n'ont pas été effectués chez les poissons exposés aux HAP pendant 2 et 6 mois, c'est à dire jusqu'aux stades juvéniles et adultes, mais seulement chez les larves de 15 jours (Annexe 4). Ces dosages ont permis de confirmer l'accumulation des composés dérivés des HAP avec une prédominance des métabolites du pyrène et du benzo[a]pyrène et ce, avec des concentrations proportionnelles aux concentrations en HAP pyrolytiques auxquels ils ont été exposés par voie trophique. On suppose alors que ces concentrations ont augmenté avec la durée d'exposition chez les adultes, et que la proportionnalité a été conservée entre les individus exposés aux différents traitements. Toutefois, aucune modification significative des performances de nage n'a été observée chez les adultes issus de ces différents traitements. Au cours de la fuite, les performances de locomotion dépendent entre autres du bon fonctionnement musculaire et de la morphologie du poisson. L'analyse histologique n'a permis de détecter aucune lésion musculaire ni déformations de l'axe vertébral des poissons contaminés (Larcher, *communication personnelle*). De plus, l'absence d'effet mise en évidence dans cette étude est cohérente avec ce qui a été observé au niveau des performances métaboliques aérobies et natatoires du poisson zèbre adulte également contaminé par une fraction pyrolytique (Lucas et al., *submitted*, Chap. I et II). Cependant, il a été observé une réduction du taux métabolique actif et de la capacité métabolique aérobie chez la descendance de ces poissons. Il serait donc intéressant de compléter ces résultats par l'étude des performances de fuite chez la descendance.

#### **IV.5. Conclusion**

Aucun effet n'a été observé sur les performances sensorielles, locomotrices et de manœuvrabilité du poisson zèbre. Ceci suggère que la survie des individus n'est pas impactée par la contamination, dans cette étude. Cependant, cette absence d'effet peut être due à la voie de contamination trophique qui expose les poissons aux HAP à partir de l'âge de 5 jours post fertilisations, c'est-à-dire après l'essentiel de la morphogénèse. L'étude du transfert parental de la contamination via l'estimation des performances de fuite chez la descendance permettrait d'évaluer de manière plus complète l'effet de ce type de contamination.

#### **Acknowledgements:**

We thank Didier Leguay and Michel Prineau, for their help during the experiment. All experiments were carried out at Ifremer (Plateforme d'Ecophysiologie des Poissons), La Rochelle station, France. This study was financially supported by the ANR project ConPhyPoP (CES 09\_002) and JL received a doctoral grant of the Regional Council of Poitou-Charentes. This study was conducted under the approval of Animal Care Committee of France under the official licence of Marie-Laure Bégout (17-010).



---

## **Discussion générale**

---



---

L'anthropisation croissante des zones côtières ou estuariennes induit le rejet dans l'environnement de nombreux xénobiotiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Dans un souci de préservation des écosystèmes aquatiques, des organismes qui y vivent et des populations consommatrices de ces ressources, il est nécessaire de comprendre et d'évaluer les réponses biologiques ainsi que la tolérance des individus aux polluants.

Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse était d'évaluer les effets d'une contamination par **voie trophique** à des concentrations **sublétales** de HAP sur certaines performances physiologiques d'une espèce modèle, le poisson zèbre *Danio rerio*. Deux types de **mélanges de HAP, pyrolytiques et pétrogéniques**, représentatifs de ce qui est rencontré dans les zones contaminées, ont été testés via des expositions **chroniques**. Les réponses biologiques ont été évaluées (i) au niveau individuel via la **capacité métabolique aérobie**, les **performances de nage** et la **réponse de fuite** et (ii) à l'échelle de l'organe sur le cœur via la mesure du **rythme cardiaque** notamment. Elles ont été mesurées (i) à différents stades **de vie du poisson** qui correspondent à **différents temps d'exposition** (i.e. 2 et 6 mois), ainsi que (ii) sur leur **descendance** dans le but d'évaluer les effets d'une exposition parentale sur la génération suivante. Ces fonctions sont connues pour être intégratrices des variations environnementales et tout dysfonctionnement peut être déterminant pour la croissance, la survie et la fitness des organismes (Priede, 1985 ; Domenici & Blake, 1997 ; Walker et al., 2005 ; Claireaux et Lefrançois, 2007).

## 1. Synthèse des principaux résultats obtenus

### *Caractéristiques et effets des mélanges des HAP testés*

Concernant tout d'abord les **HAP de type pyrolytique PY**, les approches de respirométrie statique n'ont mis en évidence aucune altération du métabolisme aérobie des poissons zèbre, quelque soit le traitement (i.e. 0.3X, 1X, 3X), la durée de contamination (i.e. 2 ou 6 mois, chap. I) et la génération considérée (i.e. F<sub>0</sub> directement contaminée ou la descendance F<sub>1</sub> ; chap. I et III). L'analyse histologique du cœur qui a été menée chez les adultes n'a permis de déceler aucune anomalie cardiaque (T. Larcher, *communication personnelle*), ce qui est cohérent avec les résultats obtenus sur le métabolisme aérobie. Seule l'évaluation complémentaire des performances métaboliques aérobies au cours de challenges de nage a permis de mettre en avant une réduction du taux métabolique actif et de la capacité métabolique. Ces effets ont cependant été observés uniquement chez les juvéniles F<sub>1</sub> issus de couples ayant été exposés au

---

traitement 3X, et non chez les individus ayant été nourris avec l'aliment contaminé (chap. II). De plus, l'étude du rythme cardiaque (chap. III) révèle une tachycardie chez les larves F<sub>1</sub> 1X, associée à une surexpression du gène *calcium transporting ATPase atp2a2a*, impliqué, notamment, dans la régulation de la contraction du myocarde (I. Leguen, *communication personnelle*). L'étude des gènes *cardiac myosin light chain 1 (cmlc1)* et *cardiac troponin type T2A (tnnt2a)*, impliqués dans le développement cardiaque embryonnaire ne révèle cependant aucun effet de la contamination sur le développement (I. Leguen, *communication personnelle*). Aussi, les performances de nage estimées via la vitesse de nage critique (chap. II), ainsi que les performances de fuite (chap. IV) ne semblent pas altérées par ce mélange de HAP. Ainsi, aucun effet direct de l'exposition PY n'a été observé. Il semblerait que ces HAP ainsi que leurs métabolites s'accumulent en partie dans les gonades et les œufs, impactant de cette manière préférentiellement la descendance. Ceci serait cohérent avec l'altération des ovaires, ainsi qu'une diminution du nombre d'œufs produits avec un effet-dose observés dans le cadre du projet *CONPHYPOP*.

Pour les **HAP pétrogéniques lourds HO**, il a été observé une réduction de la capacité métabolique aérobie et du taux métabolique actif chez les poissons nourris pendant 6 mois avec la plus forte dose de HAP (i.e. adultes du traitement 3X), mais pas chez les juvéniles nourris pendant seulement 2 mois (chap. I et II). La vitesse de nage critique a quant à elle été réduite chez les adultes de 6 mois (chap. II). De plus, des anomalies cardiaques (i.e. cœur de petite taille et arrondi, cavité péricardique béante, œdèmes des tissus conjonctifs ; T. Larcher, *communication personnelle*) ont été observées en histologie chez ces adultes, laissant présager des dysfonctionnements cardiaques (chap. II). Ainsi, la réduction des performances métaboliques et natatoires pourrait s'expliquer, au moins en partie, par l'altération du transport de l'oxygène occasionnée par ces dysfonctionnements cardiaques. De plus, la présence de malformations anatomiques telles que des déformations de l'axe vertébral peuvent avoir impacté les performances de nage du poisson. L'évaluation des effets des HAP sur ces dernières sera complétée par l'analyse approfondie des performances de fuite, comme il l'a été fait chez les individus exposés aux HAP PY (chap. IV). Les effets reprotoxiques des HAP, particulièrement marqués chez les HO, n'ont pas permis de mesurer les performances métaboliques et natatoires sur la descendance.

La **comparaison des effets des HAP de type pyrolitique et pétrogénique** observés chez les poissons zèbre met en évidence plusieurs différences pouvant en partie s'expliquer par les

---

compositions différentes entre les fractions *PY* et *HO*. En effet, le mélange *PY* est caractérisé par une forte abondance de HAP parents en particulier de haut poids moléculaire (i.e. 4-6 cycles, chap. I). *A contrario*, le mélange *HO* est plus pauvre en HAP parents et riches en HAP alkylés (Annexe X). En plus de cette variabilité, les HAP individuels présents dans les deux types de mélange peuvent être agonistes ou antagonistes des récepteurs AhR (i.e., cf Fig. 5 p.20) ce qui peut induire ou inhiber l'activité des cytochrome P450 (e.g. CYP1A) impliqués dans les processus de biotransformation des HAP (Basu et al., 2001 ; Willett et al., 2001 ; Oliveira *et al.*, 2004; Billiard et al. 2006 ; Hylland et al., 2006, Fleming et al., 2011). Ainsi le mélange combiné de ces différents HAP peut modifier leur toxicité. Par exemple, Wassenberg & Di Giulio (2004) ont montré chez le poisson zèbre qu'une co-exposition à des HAP agoniste du récepteur AhR et à un inhibiteur du CYP1A augmente la toxicité observée lors d'exposition à seulement l'un des composés. Combinés en mélange, les HAP peuvent donc avoir des effets synergiques, liés par exemple à l'interaction entre le benzo[a]pyrene et le fluoranthène (Basu et al., 2001). Face aux nombreuses combinaisons d'effets possibles, une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la toxicité des HAP en mélange paraît indispensable pour évaluer plus précisément l'effet de ce type de contamination.

Afin de confirmer l'incorporation des contaminants par les poissons, des dosages de métabolites ont été effectués pour chacun des mélanges mais uniquement chez des larves contaminées de 15 jours. Même si ces dosages attestent de la contamination, nous n'avons aucune idée de la biotransformation et accumulation à plus long terme, notamment aux différents temps d'exposition testé (i.e. 2 et 6 mois). La métabolisation des HAP étant connue pour être rapide, (Aas *et al.*, 1998; Ariese, 1993; Hellou and Payne, 1987; Lin *et al.*, 1996, Budzinski *et al.* 2004, Kerambrun et al. 2012) il aurait été pertinent d'effectuer ces dosages également chez les poissons zèbres après 2 et 6 mois de contamination, temps d'exposition auxquels sont testés les poissons. Cela aurait permis d'estimer l'effet d'une exposition chronique aux HAP et le devenir des HAP sur plus long terme et ainsi d'appuyer les différents effets ou absence d'effets observés sur nos fonctions biologiques.

#### *Altérations des performances physiologiques, quel impact sur l'individu ?*

Au sein de notre étude, l'impact de mélanges de HAP a été évalué à travers la **capacité métabolique aérobie**, mesurée par la différence entre le taux métabolique actif et le taux métabolique standard (cf p. 25-26). Cette mesure intégratrice donne une estimation de la puissance énergétique dont un organisme dispose pour l'ensemble de ses activités (Fry, 1947,



---

1971). La réduction de la capacité métabolique aérobie observée chez les adultes *HO* 3X et chez les juvéniles de la descendance *PY* 3X, suggère une modification de l'allocation énergétique du poisson. La quantité d'énergie disponible étant plus faible, une réduction des activités demandeuses en énergie telles que la locomotion, la digestion ou la croissance pourrait en découler, et ainsi réduire la probabilité de survie de l'animal face au stress environnemental (Priede, 1985, Evans 1990). De nombreux auteurs ont démontré que les organismes présentant une croissance diminuée et des réserves énergétiques limitées ont moins de chance de survivre et donc de contribuer aux renouvellements des populations de poissons (Gundersen et al. 1996, Biro *et al.*, 2004 ; Meador et al. 2006, Davoodi et Claireaux, 2007, Schuler et al. 2007, Kim et al. 2008 ; Vinagre *et al.*, 2008 ; Gilliers et al. 2012 ; Palanikumar et al. 2013). Dans le cadre du projet CONPHYPOP, il a été observé une réduction significative de la croissance pour les deux mélanges *PY* et *HO* avec un effet-dose après 3 et 6 mois d'exposition (thèse de C. Vignet, Vignet et al., *submitted*). Associés à cela, il a été observé une altération de la mise en place de la fonction digestive et une diminution de l'activité des enzymes digestives pancréatiques et intestinales impliquées dans la régulation de la fonction digestive chez les *PY* (Vignet et al., *submitted*). Aussi, l'exposition trophique aux HAP testée par Meador et al. (2006) sur le saumon Chinook (*Onchorynchus tshawytscha*), a permis de mettre en évidence une réduction de la croissance chez les individus les plus contaminés, associée à une réduction de l'activité enzymatique de la lipase impliquée dans la dégradation des triglycérides par exemple. Les études de Vignet et al. (*submitted*) et Meador et al. (2006) laissent supposer que la limitation du métabolisme actif pourrait être liée à une altération de la mobilisation et/ou de l'utilisation des réserves énergétiques lors d'activités soutenues notamment.

La capacité du poisson à effectuer ses activités est étroitement liée à sa capacité à produire et à fournir de l'énergie, principalement au travers de processus aérobie (Nakanishi and Itazawa, 1974). Ainsi, des altérations des branchies ou du système cardiovasculaire peuvent induire des conséquences néfastes sur le métabolisme énergétique, vu leur implication dans le transport de l'oxygène. La tachycardie observée chez les larves F1 issues d'adultes exposés aux HAP de type *PY* à la concentration 1X, induit une hausse du transport en oxygène liée à l'augmentation de la circulation sanguine. Le sang, circulant plus rapidement au niveau des branchies, a moins le temps de se charger en oxygène, limitant ainsi la quantité d'oxygène disponible pour le métabolisme aérobie. Aussi, les malformations observées chez les adultes exposés aux HAP de type *HO* à la concentration 3X, peuvent être à l'origine de

dysfonctionnements cardiaques (e.g. volume d'éjection systolique et débit cardiaque réduit, Davoodi et Claireaux, 2007) pouvant avoir un impact sur le métabolisme aérobie (cf p.25-26, Fig. 7 et 8). La taille réduite du cœur observée chez ces derniers (Larcher, *communication personnelle*, Fig. A) pourrait être compensée par une hausse du rythme cardiaque par exemple, ce qui permettrait de maintenir le taux métabolique standard. Cependant, lors d'un effort soutenu tel que la nage forcée, ce cœur sera fortement sollicité et n'arrivera pas à fournir la quantité d'oxygène nécessaire. Ceci pourrait participer à la réduction du taux métabolique actif et de la vitesse de nage critique chez les individus exposés aux HAP de type *HO* et à la concentration *3X*. Cependant, nous ne disposons pas d'informations sur l'anatomie et le bon fonctionnement du cœur des juvéniles provenant de parents *PY*, qui permettrait d'établir un lien entre réduction du taux métabolique actif et impact de l'exposition aux HAP sur le développement du cœur à cet âge. Des mécanismes sous-jacents impliqués dans la régulation cardiaque et non observés dans le cadre de notre étude peuvent être altérés. Par exemple, l'étude de Milinkovitch et al. (2013) a démontré une diminution de la sensibilité adrénergique du cœur chez le mulot doré (*Liza aurata*) exposé à du pétrole brut, ce qui induit une incapacité des poissons contaminés à augmenter leur force de contraction cardiaque lors d'un stress ou d'une activité intense. Aussi, le rythme cardiaque n'est pas le seul paramètre à prendre en compte dans l'étude des performances cardiaques. Le volume d'éjection systolique, par exemple, peut compenser l'altération du rythme cardiaque (Barrionuevo & Burggren, 1999; Gore & Burggren, 2012)

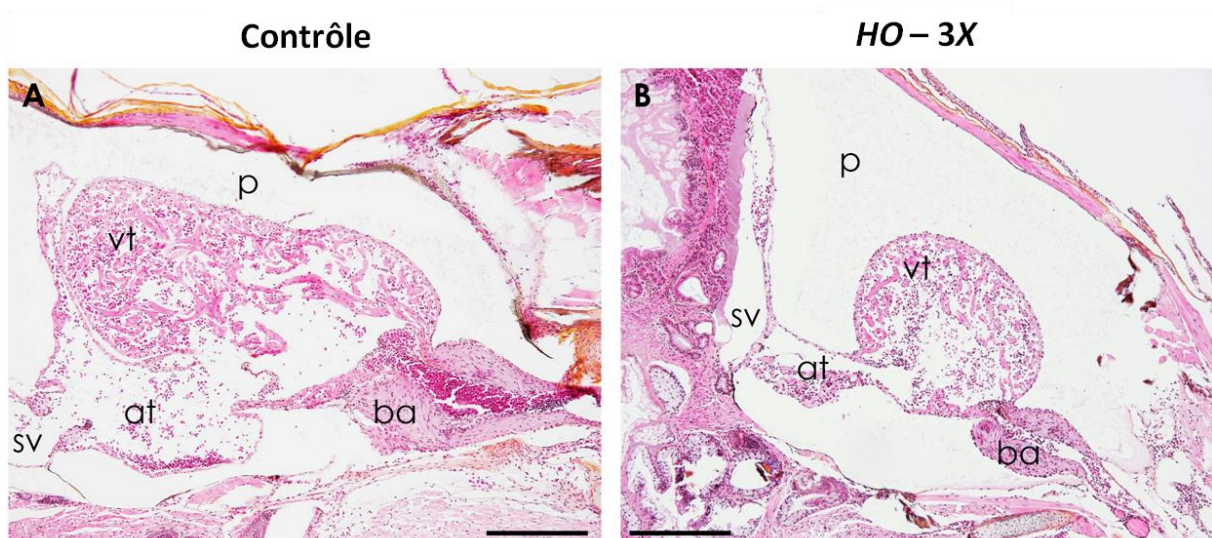


Figure A. Cœur de poisson zebra exposé au traitement contrôle (A) ou au mélange de HAP pétrogénique 3X (B). En comparaison avec le contrôle, certains poissons exposés aux HAP

---

présentaient une large cavité péricardique ainsi qu'un cœur de petite taille et arrondi. at : atrium, ba : bulbe artériel, p : péricarde, sv : sinus veineux, vt : ventricule. Hemalun-Eosin-Saffron. Les barres d'échelle représentent 200  $\mu\text{m}$ . d'après T Larcher (*communication personnelle*).

Concernant le métabolisme standard, nous n'avons observé **aucun effet**, quel que soit le type de mélange, la concentration ou la durée d'exposition (chap. I à III). Le coût supplémentaire induit par la détoxification ou le stress engendré par la contamination est peut-être trop faible pour pouvoir être quantifié. Aussi, la méthode de mesure du SMR n'est peut-être pas assez sensible pour détecter l'augmentation de ces coûts métaboliques. De plus, il est connu que la présence de polluant induit des mécanismes de défense et de détoxification au sein de l'organisme (Amiard-Tttriquet, 2008). L'exposition au phénanthrène d'Oliveira et al. (2008), par exemple, est accompagnée d'une augmentation des activités enzymatiques de défense (e.g. catalase, glutathione peroxidase Gpx). A cela peuvent s'ajouter des dommages au niveau des organes de détoxification comme il a été observé dans le cadre du projet sur le foie, qui présente des lésions tumorales pouvant affecter son fonctionnement et réduire les mécanismes de détoxification et de défense (Larcher et al. *Submitted*). Ainsi, l'induction et l'altération synchrone des mécanismes de défense et de détoxification pourraient limiter les coûts énergétiques supplémentaires et expliquer l'absence d'effet au niveau du SMR. L'induction et, à la fois, la limitation des mécanismes de défense et de détoxification sont alors synchrones, ce qui pourrait limiter les coûts supplémentaires. Enfin, l'absence d'effet sur le taux métabolique standard observé dans notre étude est contraire à ce qui est observé par Lannig et al.(2006) concernant l'impact du cadmium sur l'huître creuse, qui démontrent dans leurs études que la réparation des dommages cellulaires, les processus de détoxification et la production de protéines de stress entraînent des coût énergétiques supplémentaires liés à la contamination. Cependant, nos résultats sont cohérents avec d'autres études sur les HAP. Les études de Davoodi & Claireaux (2007) et Milinkovitch et al. (2012), sur la sole commune et le mullet doré respectivement, n'ont montré aucune modification du SMR suite à l'exposition au pétrole brut. Une exposition à plus long terme aurait peut-être permis d'accroître les coûts énergétiques.

La réduction des performances métaboliques et la modification des performances cardiaques sont en mesure d'engendrer des conséquences sur les niveaux d'activités du poisson, comme la locomotion. Au sein de notre étude, la vitesse de nage critique a été utilisée en tant

---

qu'indicateur des **performances de nage** d'un poisson (Brett, 1964, chap. II). Elle correspond, en effet, à la vitesse maximale qu'un poisson peut atteindre lorsqu'il pratique la nage de type prolongé (i.e. entre 15s et quelques heures, p. 36). Les résultats obtenus dans le chapitre II montrent une réduction de la vitesse de nage critique mais uniquement chez les poissons adultes exposés au HAP de type *HO* pour une concentration de 3X. Ceci peut être relié à la diminution du métabolisme actif et les malformations cardiaques observées au même âge dans les mêmes conditions. Ces résultats sont cohérents avec ce qui est observé par Hicken et al. (2011) par exemple, qui ont démontré qu'une exposition au pétrole brut altère la morphologie cardiaque à partir du stade embryonnaire. A plus long terme, cela se traduit par une réduction des performances de nage via une diminution de la vitesse de nage critique chez les poissons adultes contaminés. Les performances de nage jouent un rôle important dans le cycle de vie d'un poisson et notamment pour les processus d'acquisition d'énergie tels que la recherche de nourriture mais également pour la recherche de partenaires ou les migrations. Toute altération des performances locomotrices est donc susceptible d'affecter les interactions avec les individus, mais également la croissance et la survie des organismes concernés (p.36; Jones et al. 1974 ; Rome et al. 1992 ; Walker et al. 2005 ; Domenici et Blake, 1997).

Les performances locomotrices sont également importantes dans les relations proie-prédateur ou l'évitement d'un danger (Videler, 1993 ; Walker et al. 2005). Dans notre étude, elles ont été évaluées via le comportement anti-prédateur, et plus particulièrement en s'intéressant à la réponse de fuite (chap. IV). Ce mécanisme réflexe dépend des capacités de détections, de locomotions et de manœuvrabilité des poissons dans leur environnement. Seules les réponses des poissons adultes exposés aux HAP de type *PY* pendant 6 mois ont pu être analysées, ne suggérant aucun effet quelle que soit la concentration testée. De plus, l'analyse histologique n'a mis en évidence aucune lésion musculaire ou morphologique des poissons pouvant impacter la réponse de fuite (Larcher, communication personnelle). Ces résultats sont cohérents avec l'absence d'effet au même âge sur la capacité métabolique aérobie et la vitesse de nage critique. Ainsi, si on se base sur les performances physiologiques ciblées dans ce travail de thèse, l'exposition à des concentrations sublétales de HAP de type *PY* ne semblerait pas compromettre de manière directe la survie. A notre connaissance, l'étude de l'impact des HAP sur la réponse de fuite du poisson est la première sur les HAP, les futurs résultats sur la descendance *PY* ainsi que sur les poissons contaminés *HO* permettront une meilleure compréhension de ce type de réponse suite à l'exposition aux polluants. Malgré l'absence d'effet sur la réponse de fuite du poisson zèbre dans notre approche expérimentale, il ne faut

---

pas oublier de prendre en compte la variabilité individuelle qui existe, mais également le contexte écologique et la variabilité des réponses de fuite en milieu naturel. En effet, en fonction de son environnement le poisson peut présenter des adaptations physiologiques. Par exemple, des espèces habituées à un grand nombre de prédateurs dans leur habitat auront des performances cinétiques accrues, des capacités sensorielles bien développées, et une faible latence par exemple, permettant d'optimiser l'évitement du danger et d'assurer leur survie. À l'inverse, dans un milieu « pauvre » en prédateurs, l'optimisation des performances de fuite est inutile et coûteuse en énergie. Les performances de fuite du poisson zèbre étaient globalement réduites par rapport à d'autres espèces (Domenici & Blake, 1997, annexe 6). Ceci pourrait être dû à la domestication depuis de nombreuses générations et donc l'absence de prédateur dans leur habitat. Le poisson zèbre n'est donc peut-être pas un modèle adapté pour l'étude des performances de fuite.

## 2. Conclusion et perspectives

L'ensemble des résultats obtenus suggère que les deux mélanges de HAP diffèrent par leurs effets. Pour les HAP de type *PY*, notre approche expérimentale a mis en évidence chez la descendance  $F_1$  une réduction de la capacité métabolique aérobie des juvéniles (pour la concentration  $3X$ ), et également une augmentation du rythme cardiaque des larves (pour la concentration  $1X$ ). Quant aux poissons adultes, exposés pendant 6 mois aux HAP de type *HO* (concentration  $3X$ ), ils ont montré une capacité métabolique aérobie réduite associée à une diminution de la vitesse de nage critique.

Les performances physiologiques étudiées dans ce travail de thèse se situent à un niveau intermédiaire de sensibilité et de pertinence écologique (*Introduction, Fig. 1 p. X*). Dans le cadre du projet CONPHYPOP, des niveaux d'organisation inférieurs plus sensibles ont été considérés (e.g. aux niveaux moléculaires mesures d'EROD, de l'expression de gènes, d'activités enzymatiques). Il serait intéressant de compléter cette étude par des observations à l'échelle des populations afin d'apprécier leur vulnérabilité face aux stress environnementaux et ce, sur plusieurs générations.

Cette étude s'inscrit dans une problématique d'évaluation des effets de la pollution en milieu aquatique en utilisant le poisson zèbre en tant qu'espèce modèle. Son court cycle de vie nous a permis de réaliser des expositions de la larve à l'adulte, ainsi que d'explorer les effets sur la

---

descendance F<sub>1</sub>. Ceci nous a permis d'avoir une vision d'ensemble de l'impact des mélanges de HAP sur cette espèce. Cependant, dans ce type d'étude expérimentale, la capacité naturelle d'adaptation n'est pas prise en compte avec des espèces élevées en laboratoire. On peut alors se demander comment ce qui est observé sur cette espèce modèle peut-être transférable à d'autres ?

En se basant sur les résultats obtenus en laboratoire, et dans le but de prendre en compte les adaptations des espèces, il serait donc intéressant de cibler certaines fonctions biologiques sensibles et pertinentes (e.g. croissance, reproduction, performances cardiaques) et/ou stades de développement pour étudier l'impact des HAP en milieu naturel. Même si cette approche est complexe dans sa mise en œuvre, l'utilisation d'espèces sentinelles du milieu contaminé ou d'expériences utilisant le « caging » comme décrit par Kerambrun et al (2012) permettrait d'évaluer l'impact des différents types de polluants dans le milieu naturel. Ce type d'approches complémentaires serait d'autant plus pertinent qu'en milieu naturel, les organismes sont aussi soumis à des variations saisonnières ou ponctuelles des facteurs biotiques et abiotiques pouvant influencer les différentes fonctions biologiques.

Dans le milieu naturel, les organismes sont soumis à différents polluants et différentes variations abiotiques, telles que des variations de température ou d'oxygène. Il serait donc intéressant de mettre en œuvre des études multifactorielles. Cela serait d'autant plus pertinent que, dans notre étude, l'effet des HAP a été observé lors d'activités soutenues. Le stress supplémentaire induit par la variation d'un autre facteur tel que l'oxygène ou la température pourrait amplifier l'altération de certains mécanismes physiologiques. Davoodi & Claireaux (2007) ont, par exemple, étudié l'effet combiné d'une contamination au pétrole brut à des conditions hypoxiques chez la sole commune *Solea solea*. Dans un premier temps, leurs résultats mettent en évidence une réduction de 30% de la capacité métabolique aérobie chez les poissons contaminés aux HAP. Puis l'ajout de la contrainte hypoxique a induit une augmentation de 64% de la demande minimale en oxygène chez ces poissons contaminés, suggérant que ces derniers sont moins capables d'extraire ou de transporter l'oxygène.. De plus, en milieu naturel contaminé, plusieurs polluants peuvent être rencontrés en même temps (e.g. HAP, polychlorobiphényles PCB, métaux), induisant une activité synergique entre eux et, donc, des effets pouvant être différents de ceux observés dans les études se concentrant sur un seul type de polluant (McKenzie et al. 2007).

---

L'objectif du projet était de tester l'impact des HAP par voie trophique qui est une voie de contamination rencontrée dans l'environnement au travers des relations trophiques entre les organismes et les phénomènes de bioaccumulation. L'importance de cette voie de contamination est encore mal connue puisqu'elle est difficile à appréhender, aussi bien en condition naturelle, qu'en condition de laboratoire. En effet, même si la quantité distribuée par aquarium est contrôlée, il y a une importante variabilité dans la quantité de nourriture consommée par chaque individu. En condition naturelle, il est également difficile de déterminer avec précision les niveaux de contaminants présents dans les organismes dont se nourrissent les individus étudiés. Ainsi dans notre étude, les concentrations en HAP testées étaient basées sur la concentration en HAP mesurée dans les mollusques en Baie de Seine (i.e.  $5\mu\text{g.g}^{-1}$  de nourriture poids sec). Il existe dans l'environnement d'autres voies de contamination non exclusives telles que l'exposition via le sédiment ou encore, lors de marée noire, le contact direct avec la nappe de pétrole. De nombreuses études se sont déjà intéressées à l'impact de pétrole brut en solution aqueuse sur les organismes (Davoodi & Claireaux, 2007, Milinkovitch et al. 2012, 2013, Claireaux 2013 etc...). Comme initialement prévu dans le projet CONPHYPOP, il serait intéressant d'étudier aussi la contamination par contact avec le sédiment (Kerambrun et al., 2012; Nye, et al., 2007; Rice et al., 2000; Verrhiest et al., 2001). Ainsi, l'exposition précoce des œufs permettrait d'observer les effets, notamment sur le développement, qui pourraient altérer au niveau individuel les performances métaboliques et natatoires des poissons. De plus, certaines études suggèrent que la contamination par l'alimentation n'est pas la plus appropriée pour étudier l'impact des HAP puisqu'ils sont rapidement métabolisés chez les vertébrés (Lemaire et al. 1992 ; Neff & Burns, 1996 ; Hylland, 2011). Dans l'environnement, la biodisponibilité des polluants vis-à-vis des organismes va dépendre de facteurs biologiques propres aux modes de vie des espèces considérées (comportement, alimentation...) et de leurs processus biologiques (e.g. métabolisation, excrétion, régulation). L'apport de HAP via l'alimentation serait restreint aux brouteurs tels que le mulot *Liza sp* et aux espèces se nourrissant d'invertébrés filtreurs, notamment de bivalves, qui accumulent de haut niveau de contaminant (Hylland et al. 2011). L'ensemble de ces perspectives permettra d'approfondir la compréhension des relations énergétiques entre les poissons et leur environnement. Les résultats de ce travail de thèse, combinés aux observations faites dans le cadre du projet COPHYPOP, permettront d'avoir une meilleure connaissance de l'impact des HAP en mélange sur les poissons au cours de leur cycle de vie, ainsi que sur le renouvellement des générations et des populations à plus grande échelle.

---

## Références Bibliographiques

---





- Abarnou, A. , Burgeot, T. , Chevreuil, M., Leboulenger, F., Loizeau, V., Jaouen-Madoulet, A., Minier, C. (2000). Les contaminants organiques : Quels risques pour le monde vivant ? *Fascicule Seine-Aval*, pp. 35.
- Adler, V., Yin, Z., Tew, K. D. & Ronai, Z. (1999). Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene* 18, 6104-6111.
- Aguilar, A., Borrell, A., Reijnders, P. J. H. (2002). Geographical and temporal variation in levels of organochlorine contaminants in marine mammals. *Marine Environmental Research* 53, 425–452.
- Aizenshtat, Z. (1973). Perylene and its geochemical significance. *Geochimica Cosmochimica Acta* 37 (3), 559-567.
- Akcha, F., Burgeot, T., Narbonne, J. F. & Garrigues P. (2003). Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons: role of DNA adduct formation in induced carcinogenesis. *In PAHs: an ecological perspective* (Douben P ed), pp. 65-79. Wiley and Sons, London.
- Almroth, B. C., Sturve, J., Stephensen, E., Holth, T. F., & Förlin, L. (2008). Protein carbonyls and antioxidant defenses in corkwing wrasse (*Symphodus melops*) from a heavy metal polluted and a PAH polluted site. *Marine Environmental Research* 66, 271–277.
- Alsop D. H. , McGeer J. C., McDonald D. G. & Wood C. M. (1999). Costs of chronic waterborne zinc exposure and the consequences of zinc acclimation on the gill/zinc interactions of rainbow trout in hard and soft water. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 1014-1025.
- Armstrong, J. D. (1986). Heart rate as an indicator of activity, metabolic rate, food intake and digestion in pike, *Esox lucius*. *Journal of Fish Biology* 29, 207-221.
- Bado-Nilles, A., Quentel, C., Thomas-Guyon, H., & Le Floch, S. (2009). Effects of two oils and 16 pure polycyclic aromatic hydrocarbons on plasmatic immune parameters in the

- European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Linné) A. *Toxicology in Vitro* 23, 235–241.
- Bainbridge, R. (1963). Caudal fin and body movement in the propulsion of some fish. *Journal of Experimental Biology* 40, 23–56.
- Barrionuevo, W. R. & Burggren. W. W. (1999). O<sub>2</sub> consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O<sub>2</sub>. *American Journal of Physiology* 276, 505-513.
- Barrionuevo, W. R., Fernandes, M. N., Rocha, O. (2010). Aerobic and anaerobic metabolism for the zebrafish, *Danio rerio*, reared under normoxic and hypoxic conditions and exposed to acute hypoxia during development. *Brazilian Journal of Biology* 70, 425-34.
- Barron, M. G., Podrabsky, T., Ogle, S., & Ricker, R. W. (1999). Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology* 46, 253–268.
- Barton, B. A. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology* 42, 517–525.
- Beamish, F. W. H. (1978). Swimming capacity. In *Fish Physiology*, Vol. 7 (Hoar, W. S. & Randall, D. J., eds), pp. 101–187. New York, London: Academic Press.
- Beaumont, M. W., Butler, P. J., & Taylor, E. W. (1995a). Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to sub-lethal copper concentrations in soft acidic water and its effects upon sustained swimming performance. *Aquatic Toxicology* 33, 45-63.
- Beaumont, M. W., Butler, P. J. & Taylor E.W. 2003. Exposure of brown trout, *Salmo trutta*, to a sub-lethal concentration of copper in soft acidic water : effects upon exchange and ammonia accumulation. *Journal of Experimental Biology* 206,153-162.
- 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. (2001). The identification,

- conservation, and management of estuarine and marine nurseries for fish and invertebrates. *BioScience* 51, 633-641.
- Beiras, R., Bellas, J., Fernandez, N., Lorenzo, J. I., Cobelo-Garcia, A. (2003). Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryolarval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Marine Environmental Research* 56, 531–553.
- Bennett, A. F. (1980). The metabolic foundations of vertebrate behavior. *BioScience* 30, 452-456.
- Billerbeck, J. M., Lankford, T. E. & Conover, D. O. (2001). Evolution of growth and energy acquisition rates. I. Trade-offs with swimming performance in *Menidia menidia*. *Evolution* 55, 1863–1872
- Billiard, S. M., Meyer, J. N., Wassenberg, D. M., Hodson, P. V., & Giulio, R. T. Di. (2008). Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: Mechanisms and Implications for Risk Assessment. *Toxicological Sciences* 105(1), 5–23.
- Billiard, S. M., Timme-Laragy, A. R., Wassenberg, D. M., Cockman, C., & Di Giulio, R. T. (2006). The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 92(2), 526–36.
- Bjorseth, A. & Olufsen, S. (1983). Long transport of polycyclic aromatic hydrocarbons. In *Polycyclic aromatic hydrocarbons* (Bjorseth A, ed), 507-524. Marcel Dekker, New York.
- Blake, R. W. (2004). Fish functional design and swimming performance. *Journal of Fish Biology* 65, 1193-1222.
- Blahova, J., Leontovycova, D., Kodes, V. Svobodova, Z. (2013). Study of polycyclic aromatic hydrocarbon contamination of major rivers in the Czech Republic using biliary metabolite in Chub, *Leuciscus cephalus* L. *Bulletin of Environmental Contamination*

and *Toxicology* 90,521–524.

- Bradbury, R. B. & Kirby, W. B. (2006). Farmland birds and resource protection in the UK: crosscutting solutions for multi-functional farming. *Biological Conservation* 129, 530–542.
- Brauner, C. J., Shrimpton, J. M. & Randall, D.J. (1992). The effect of short duration seawater exposure on plasma ion concentrations and swimming performance in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2399–2405.
- Brauner, C. J., Iwama, G. K. & Randall, D. J. (1994). The effect of short-duration seawater exposure on the swimming performance of wild and hatchery-reared juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during smoltification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 2188–2194.
- Brett, J. R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Journal of Fisheries Research. Board of Canada* 21, 1183–1226.
- Brett, J. R. (1971). Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *American Zoologist* 11, 99–113.
- Brett, J. R. & Glass, N. R. (1973). Metabolic rates and critical swimming speeds of sockeye salmo (*Oncorhynchus nerka*) in relation to size and temperature. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 30, 379–387.
- Budzinski, H., Garrigues, P., Conan, J. & Bellocq, J. (1993a). Thermodynamic calculations on alkylated phenanthrenes: geochemical applications to maturity and origin of hydrocarbons. *Organic Geochemistry* 20(7), 917–926.
- Budzinski, H., Garrigues, P., Radke, M., Conan, J. & Oudin, J. L. (1993b). Identification of alkylated dibenzothiophenes : Application to organic geochemistry. *Polycyclic Aromatic Compounds* 3(suppl), 611–620.

Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Pierard, C. & Garrigues, P. (1997). Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58, 85-97.

Budzinski, H., Garrigues, P., Conan, J., Devillers, J., Donine, D., Radke, M. & Oudin, J. L (1995a). Alkylated phenanthrene distribution as maturity and origin indicators in crude oils and rock extracts. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59(10), 2043-2056.

Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Piérard, C. & Garrigues P. (1997). Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58, 85-97.

Budzinski, H., Lettelier, M., Thompson, S., LeMenach, K., Garrigues, P. (2000). Combined protocol for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorobiphenyls (PCBs) from sediments using focussed microwave assisted (FMW) extraction at atmospheric pressure. *Fresenius Journal of Analytic Chemistry* 3655, 165-171.

Burggren, W. W. (2005). Developing animals flout prominent assumptions of ecological physiology. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology* 141(4), 430–9.

Bushnell, P. G., Steffensen, J. F. & Johansen, K. (1984). Oxygen consumption and swimming performance in hypoxia-acclimated rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Biology* 113, 225-235.

Cabral, N. H., Vasconcelos, R. P., Vinagre, C., Franc, S., Fonseca, V., Maia, A., Reis-Santos, P., Lopes, M., Ruano, M., Campos, J., Freitas, V., Santos, P. & Costa, M. J. (2007). Relative importance of estuarine flatfish nurseries along the Portuguese coast. *Journal of Sea Research* 57, 209–217.

Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L. & Budzinski,

- H. (2006). Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic toxicology* 79, 257–267.
- Cachot, J., Law, M., Pottier, D., Peluhet, L., Norris, M., Budzinski, H. & Winn, R. (2007). Characterization of toxic effects of sediment-associated organic pollutants using the lambda transgenic medaka. *Environmental Science and Technology* 41, 7830-7836.
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. (2007). Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70(2), 270-280.
- Cairns, J. (1966). Don't be half-safe - The current revolution in bioassay techniques. *Engineering Bulletin of Perdue University Proceedings* 21, 559-567.
- Campbell, P. M., Pottinger, T. G. & Sumpter, J. R. (1994). Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout. *Aquaculture* 120, 151-169.
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G.& Sumpter, J.P., 1992. Stress reduces the quality of gametes produced by rainbow-trout. *Biology of Reproduction* 47, 1140-1150.
- Cannas, M., Atzori, F., Rupsard, F., Bustamante, P., Loizeau, V. & Lefrançois, C. (2012). PCB contamination does not alter aerobic metabolism and tolerance to hypoxia of juvenile sole (*Solea solea*). *Aquatic Toxicology* 127, 54-60.
- Cannon, W. B. (1929). Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. *Boston: Branford*.
- Chabot, D. & Dutil, J.-D. (1999). Reduced growth of atlantic cod in non-lethal hypoxic conditions. *Journal of Fish Biology* 55, 472-491.
- Chatelier, A., McKenzie, D. J., Prinet, A., Galois, R., Robin, J., Zambonino, J. & Claireaux, G. (2006). Associations between tissue fatty acid composition and physiological traits of

- performance and metabolism in the seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Biology* 209, 3429–3439.
- Chen, J. N., Haffter, P., Odenthal, J., Vogelsang, E., Brand, M., van Eeden, F. J. & Nüsslein Volhard, C. (1996). Mutations affecting the cardiovascular system and other internal organs in zebrafish. *Development (Cambridge, England)*, 123, 293–302.
- Cheng, W. W., & Farrell, A. P. (2007). Acute and Sublethal Toxicities of Rotenone in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*): Swimming Performance and Oxygen Consumption. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 52, 388–396.
- Collier, T. K., Stein, J. E., Sanborn, H. R., Hom, T., Myers, M. S., & Varanasi, U. (1992). Field studies of reproductive success in English sole (*Parophrys vetulus*): correlations with bioindicators of maternal contaminant exposure. *Science of the Total Environment* 116, 169–185.
- Claireaux, G. , & Lagardère, J. (1999). Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass. *Journal of Sea Research* 42, 157–168.
- Claireaux, G., McKenzie, D. J, Genge, A. G., Chatelier, A. Aubin, J. & Farrell, A.P. (2005). Linking swimming performance, cardiac pumping ability and cardiac anatomy in rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 208, 1775–1784.
- Claireaux, G., Couturier, C. & Groison, A.-L. (2006). Effect of temperature on maximum sustainable speed and cost of swimming in juvenile European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal of Experimental Biology* 209, 3420–3428.
- Claireaux, G., Handelsman, C., Standen, E. & Nelson, J. A. (2007). Thermal and temporal stability of swimming performance in the European sea bass. *Physiological and Biochemical Zoology* 80, 186–196.
- Claireaux, G., & Davoodi, F. (2010). Effect of exposure to petroleum hydrocarbons upon cardio-respiratory function in the common sole (*Solea solea*). *Aquatic Toxicology* 98,113–119.



- Claireaux G., Webber D.M., Lagardère, J.P. & Kerr, S.R. (2000). Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Journal of Sea Research* 44, 257-265.
- Claisse, D., Le Moigne, M., Durand, G. & Beliaeff, B. (2006). Les contaminants chimiques dans les huîtres et les moules du littoral français. Bulletin RNO : Surveillance du Milieu Marin, Ifremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, ISSN : 1620-1124. p27-52.
- Clark, T. D., Donaldson, M. R., Pieperhoff, S., Drenner, S. M., Lotto, A., Cooke, S. J., Hinch, S. G., Patterson, D. A. & Farrell, A. P. (2012). Physiological benefits of being small in a changing world: responses of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to an acute thermal challenge and a simulated capture event. *PLoS ONE* 7, e39079.
- Clason, B., Langston, W. J. & Zauke, G.P. (2003). Bioaccumulation of trace metals in the amphipod *Chaetogammarus marinus* (Leach, 1815) from the Avon and Tamar estuaries (UK): comparison of two-compartment and hyperbolic toxicokinetic models. *Marine Environmental Research* 57, 171–195.
- Collier, T. K., Singh, S. V., Awasthi, Y. C., Varanasi & U. (1992a). Hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in two species of benthic fish showing different prevalences of contaminant associated liver neoplasms. *Toxicology and Applied Pharmacology* 113, 319-24.
- Collier, T. K., Stein, J. E., Sanborn, H. R., Hom, T., Myers, M. S. & Varanasi, U. (1992b). Field studies of reproductive success and bioindicators of maternal contaminant exposure in English sole (*Parophrys vetulus*). *The Science of the Total Environment* 116, 169-185.
- Cooke, S. J., Hinch, S. G., Farrell, A. P., Lapointe, M. F., Jones, S. R. M., Macdonald, J. S., Patterson, D. A., Healey, M. C. & Van Der Kraak, G. (2004). Abnormal migration timing and high en route mortality of sockeye salmon in the Fraser River, British Columbia. *Fisheries* 29, 22–33.

- Cossa, D. (1995). A review of the use of *Mytilus spp.* as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceanologica Acta* 12, 417–432.
- Costanza, R., d'Arge, R., de Groot, R., Farber, S., Grasso, M., Hannon, B., Limburg, K., Naeem, S., O'Neill, R. V., Paruelo, J. (1997). The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387, 253-260.
- Courrat, A., Lepage, M., Girardin, M., Laffargue, P., Nicolas, D., Lobry, J. & Le Pape, O. (2009). Anthropogenic disturbance on nursery function of estuarine areas for marine species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 81 (2), 179–190.
- Dabestani, R. & Ivanov I. N. (1999). A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology* 70, 10-34.
- D'Adamo, R., Pelosi, S., Trotta, P. & Sansone, G. (1997). Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry* 56(1-2), 45–49.
- Danion, M., Deschamps, M. H., Thomas-Guyon, H., Bado-Nilles, A., Le Floch, S., Quentel, C. & Sire, J. Y. (2011). Effect of an experimental oil spill on vertebral bone tissue quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1888-95.
- Danos, N., Lauder, G. V. (2012). Challenging zebrafish escape responses by increasing water viscosity Nicole. *The Journal of Experimental Biology* 215, 1854–1862.
- Davis, G. E., Foster, C. E., Warren, C. E. & Doudoroff P. (1963). The influence of oxygen concentration on the swimming performance of juvenile Pacific salmon at various temperatures. *Transaction of the American Fisheries Society* 92, 111-124.
- Davoodi, F. & Claireaux, G. (2007). Effects of exposure to petroleum hydrocarbons upon the metabolism of the common sole *Solea solea*. *Marine Pollution Bulletin* 54, 928–934.

- Depledge, M. H., Aagaard, A. & Gyorkos, P. (1995). Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin* 31 (1-3), 19–27.
- Dévier, M. H., Le Du-Lacoste, M., Akcha, F., Morin, B., Peluhet, L., Le Menach, K., Burgeot, T. & Budzinski, H. (2013). Biliary PAHs metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). *Environmental Science and Pollution Research* 20, 708-722.
- Diaz, R. J. (2001). Overview of hypoxia around the world. *Journal of Environmental Quality* 30, 275-281.
- Diaz, R. J., Nestlerode, J. & Diaz, M.L. (2004). A global perspective on the effects of eutrophication and hypoxia on aquatic biota. In G. L. Rupp and M. D. White (eds.), Proceedings of the 7th International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Session One 02 Oct 2006 Rabalais et al. 32 Quality, Tallinn, Estonia, May 12-15, 2003. EPA 600/R-04/049, U.S. Environmental Protection Agency, Ecosystems Research Division, Athens, Georgia. , 1-33.
- Diaz, R. J. & Rosenberg, R. (1995). Marine benthic hypoxia: A review of its ecological effects and the behavioural responses of benthic macrofauna. *In Oceanography and Marine Biology an Annual Review* 33, 245-303.
- Dolman, S. J., Weir, C. R. & Jasny, M. (2009). Comparative review of marine mammal guidance implemented during naval exercises. *Marine Pollution Bulletin* 58, 465–477.
- Domenici P. & Blake R. W. (1991). The kinematics and performance of the escape response in the angelfish (*Pterophyllum eimekei*). *Journal of Experimental Biology* 156, 187-205.
- Domenici, P., & Blake, R. W. (1997). Review: the kinematics and performance of fish fast-start swimming. *Journal of Experimental Biology* 200, 1165–1178.

- Domenici, P. (2010). Escape responses in Fish: Kinematic, performance and behaviour. In: *Fish Locomotion: An eco-ethological perspective*, P. Domenici and B.G. Kapoor (Eds.). Science Publishers, Enfield(NH), USA 534p.
- Domenici, P., Steffensen, J.F. & Batty, R.S. (2000). The effect of the progressive hypoxia on swimming activity and schooling in Atlantic herring. *Journal of Fish Biology* 57, 1526-1538.
- Domenici, P. (2001). Scaling the locomotor performance in predator-prey interactions: from fish to killer whales. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 131, 169-182.
- Domenici, P., Ferrari, R. S., Steffensen, J. F. & Batty R.S.. (2002). The effects of progressive hypoxia on school structure and dynamics in Atlantic herring *Clupea harengus*. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269: 2103–2111.
- Domenici, P., Standen, E. M.; Levine, R. P. (2004). Escape manoeuvres in the spiny dogfish (*Squalus acanthilas*). *Journal of Experimental Biology* 207(13), 2339-2349.
- Domenici, P., Claireaux, G. & 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, 1929–1936.
- Donaldson, E. M. (1981). The pituitary-interrenal axis as an indicator of stress in fish. In A. D. Pickering (ed.), *Stress and fish*, pp. 11–47. Academic Press, New York.
- Dooley, K., & Zon, L. I. (2000). Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current opinion in genetics & development* 10(3), 252–6.
- Drucker, E. G. & Jensen, J. S. (1996). Pectoral fin locomotion in the striped surfperch. I. Kinematics effects of swimming speed and body size. *Journal of Experimental Biology* 199, 2235-2242.
- Eaton, R. C. & Hackett, J. T. (1984). The role of Mauthner cells in fast-starts involving escape in teleost fish. In *Neural Mechanisms of Startle Behavior* (ed. R. C. Eaton), pp. 213–

266. Plenum Press, New York. 1.
- Eaton, R. C., Lee, R. K. K., & Foreman, M. B. (2001). The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Progress in Neurobiology* 63, 467–485.
- Edgar, G.J., Barrett, N. S., Graddon, D. J. & Last, P. R. (2000). The conservation significance of estuaries: a classification of Tasmanian estuaries using ecological, physical and demographic attributes as a case study. *Biological Conservation* 92, 383–397.
- Eisler, R. (1987). Polycyclic aromatic hydrocarbons hazards to fish wildlife and invertebrates : a synoptic review. *Biological Report* 85, 1-11.
- Engeszer, R. E., Patterson, L. B., Rao, A. a, & Parichy, D. M. (2007). Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4(1), 21–40.
- Farrell A.P. (1997). Effects of temperature on cardiovascular performance. In: *Global warming implications for freshwater and marine fish. S.E.B. Seminar series 61 (C.M. WOOD & D.G. MCDONALD eds)*, pp135-153., Cambridge University press, Cambridge.
- Farrell, A. P. (2007). Cardiorespiratory performance during prolonged swimming tests with salmonids: a perspective on temperature effects and potential analytical pitfalls. *Philosophical transactions of the royal society B Biological sciences* 362, 2017–2030.
- Farrell, A. P., Gamperl, A. K., Hicks, J. M., Shiels, H. A. & Jain, K. E. 1996. Maximum cardiac performance of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at temperatures approaching their upper lethal limit. *ournal of Experimental Biology* 199, 663-672.
- Farrell, A. P., Gamperl, A. K. & Bitwell, I. K. (1998). Prolonged swimming, recovery and repeated swimming performance of mature sockeye salmon *Onchorynchus nerka* exposed to moderate hypoxia and pentachlorophenol. *Journal of Experimental Biology* 201, 2183-2193.

- Farrell A.P. & Jones D.R., 1992. The heart. *In: Fish physiology Vol.XIIB (W.S. HOAR, D.J. RANDALL & A.P. FARRELL eds)*, pp1-87. New York Academic Press, New York.
- Faucher, K., Fichet D., Miramand P. & Lagardère J.P. (2006). Impact of acute cadmium exposure on the trunk lateral line neuromasts and consequences on the “C-start” response behaviour of the sea bass (*Dicentrarchus labrax L.*; Teleostei, Moronidae). *Aquatic Toxicology* 76, 278–294.
- Fernandes, M. B., Sicre, M.-A., Boireau, A. & Tronczynski (1997). Polyaromatic hydrocarbon (PAH) distributions in the Seine River and its estuary. *Marine Pollution Bulletin* 34(11), 857-867.
- Fernandez, N. & Beiras, R. (2001). Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology* 10, 263–271.
- Fleming, J. R., Crockford, T., Altringham, J. D. & Johnston I. A. (1990). The effects of temperature acclimation on muscle relaxation in the carp: a mechanical, biochemical and ultrastructural study. *Journal of Experimental Biology* 255, 286–295.
- Fowler, S. W., Readman, J. W., Oregioni, B. Villeneuve, J. P. & McKay, K. (1993). Petroleum hydrocarbons and trace metals in nearshore gulf sediments and biota before and after the 1991 war. AN assessment of temporal and spatial trends. *Marine Pollution Bulletin* 27, 171-182.
- Freeman D. J. & Cattell, C. R. (1990). Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 24, 1581-1585.
- Fry, F. E. J. (1947). The effects of the environment on animal activity. University of Toronto studies. *Biology Series* 55, 1-62.
- Fry, F. E. J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. *In Fish Physiology Vol. VI (Hoar, W.S., Randall, D.J., eds.)*, pp. 1–98. CA: Academic Press, New York.

- Fuiman, L. A. & Batty, R. S. (1997). What a drag it is getting cold: portioning the physical and physiological effects of temperature on fish swimming. *Journal of Experimental Biology* 200, 1745-1755.
- Galloway, T. S., & Depledge, M. H. (2001). Immunotoxicity in Invertebrates: Measurement and Ecotoxicological Relevance TAMARA. *Ecotoxicology* 10, 5–23.
- Gamperl, A. K., & Farrell, A. P. (2004). Cardiac plasticity in fishes: environmental influences and intraspecific differences. *The Journal of Experimental Biology* 207, 2539–2550.
- Gattuso J-P & Hansson L. (2011a). *Ocean Acidification*. Oxford University Press, Oxford, UK, pp 122-153.
- Gazeau, F., Quiblier, C., Jansen, J. M. , Gattuso, J.-P., Middleburg, J. J. & Heip, C. H. R. (2007) Impact of elevated CO<sub>2</sub> on shellfish calcification. *Geophysical Research Letters* 34, L07603.
- GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection), 1993. Impact of oil and related chemicals and wastes on the marine environment.
- GESAMP Report 50. U.S. National Academy of Sciences, 2003).
- Gesto, M., Soengas, J. L., Mi'guez, J. M. (2008). Acute and prolonged stress responses of brain monoaminergic activity and plasma cortisol levels in rainbow trout are modified by PAHs (naphthalene, b-naphthoflavone and benzo(a)pyrene) treatment. *Aquatic Toxicology* 86, 341–351.
- Ghalambor, C. K., Walker, J. A., & Reznick, D. N. (2003). Multi-trait selection, adaptation, and constraints on the evolution of performance: an empirical example using Trinidadian guppies. *Integrative Comparative Biology* 42, 1234–1234
- Goncalves, R., Scholze, M., Ferreira, A. M., Martins, M., & Correia, A. D. (2008). The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research*

*journal* 108, 205–213.

Gonzales-Doncel, M., Gonzales, L., Fernandez-Torija, C., Navas, J.M. & Tarazona, J.V., (2008). Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 8, 280-288.

Graham, J. B., Dewar, H., Lai, N. C., Lowell, W. R. and Arce, S. M. (1990). Aspects of shark swimming performance determined using a large water tunnel. *Journal of Experimental Biology* 151, 175-192.

Hammer, C. (1995). Fatigue and exercise tests with fish. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112, 1–20.

Greiner, A. C., Spyckerelle, C., Albrecht, P. & Ourisson G. (1977). Hydrocarbures aromatiques d'origine géologique. V. Dérivés mono- et di- aromatiques du hopane. *Journal of Chemistry Research* 3829-3871.

Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M. C., Hammerschmidt, M., Kane, D. & Nüsslein-Volhard, C. (1996). The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development (Cambridge, England)* 123, 1-36.

Hall, A. T. & Oris, J. T. (1991). Anthracene reduces reproductive potential and is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. *Aquatic Toxicology* 19, 249-264.

Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. C. (1999). Free radicals in biology and medicine. pp. 192. Oxford University Press, Oxford.

Harper, N., Steinberg, M., & Safe, S. (1996). Immunotoxicity of a reconstituted polynuclear aromatic hydrocarbon mixture in BW3Fl mice. *Toxicology* 109, 31–38.



- Hase, A. & Hites R. A. (1978). On the origin of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aqueous environment. *In Identification and analysis of organic pollutants in water (Keith LH ed)*, pp.205-214. Ann Arbor Science, Ann Arbor, MI.
- Hawkins, W. E., Walker, W. W., Fournie, J. W., Manning, C. S., & Krol, R. M. (2003). Use of the Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) and Guppy (*Poecilia reticulata*) in Carcinogenesis Testing Under National Toxicology Program Protocols. *Toxicologic Pathology* 31, 88–91.
- Heisler, N. (1984). Acid-base regulation in fishes. *In: Fish Physiology, Hoar W.S. & Randall D.J. (Eds.), Vol. 10A: Acid-Base Balance*, pp315-401. Academic Press, New York.
- Heisler, N. (1993). Acid-base regulation. *In: The Physiology of Fishes, Evans D.H.(Eds)*, pp343-378. CRC Press, Boca Raton,
- Hengstler, J. G., Foth, H., Kahl, R., Kramer, P., Lilienblum, W., Schulz, T., & Schweinfurth, H. (2006). The REACH concept and its impact on toxicological sciences. *Toxicology* 220(2-3), 232–239.
- Hill, A. J., Teraoka, H., Heideman, W., & Peterson, R. E. (2005). Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 86(1), 6–19
- Hicken, C. E., Linbo, T. L., Baldwin, D. H., Willis, M. L., Myers, M. S., Holland, L. & Incardona, J. P. (2011). Sub-lethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceeding of the academy of sciences* 108, 7086–7090.
- Hiss, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L. (1999). The assessment of marine pollution-bioassays with bivalve embryos and larvae. *In: Southward, A.I., Tyler, P.A., Young, C.M. (Eds.), Advances in Marine Biology*, pp.1–178. Academic Press, London.
- Hoffman, D.J. (2003). Handbook of Ecotoxicology. CRC, Boca Raton, FL, USA.

- Holladay, S. D., Smith, S. A., Besteman, E. G., Deyab, A. S. M. I., Gogal, R. M., Hrubec, T. & Ahmed, S. A. (1998). Benzo[a]pyrene-induced hypocellularity of the pronephros in tilapia (*Oreochromis niloticus*) is accompanied by alterations in stromal and parenchymal cells and by enhanced immune cell apoptosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 64, 69–82.
- Holloway, G., Sibly, R. & Povey, S. (1990). Evolution in toxin-stressed environments. *Functional ecology* 4, 289-294.
- Holth, T. F., Nourizadeh-Lillabadi, R., Blaesbjerg, M., Grung, M., Holbech, H., Petersen, G. I., Aleström, P. & Hylland, K. (2008). Differential gene expression and biomarkers in zebrafish (*Danio rerio*) following exposure to produced water components. *Aquatic Toxicology* 90, 277-291.
- Hornig, C.-Y., Lin, H.-C., & Lee, W. (2010). A reproductive toxicology study of phenanthrene in medaka (*Oryzias latipes*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58(1), 131–9.
- Howard, T. E., (1975). Swimming performance of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) exposed to bleached kraft pulpmill effluent. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 32, 789-793.
- Hylland, K. (2006). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of toxicology and environmental health. Part A* 69(1-2), 109–23.
- Incardona, J. P., Collier, T. K., & Scholz, N. L. (2004). Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology and Applied Pharmacology* 196, 191–205.
- Incardona, J. P., Carls, M. G., Teraoka, H., Sloan, C. A., Collier, T. K. & Scholz, N. L. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. *Environmental Health Perspectives* 113, 1755–1762.
- Incardona, J. P., Carls, M. G., Day, H. L., Sloan, C. A., Bolton, J. L., Collier, T. K., & Scholz,

- N. L. (2009). Cardiac arrhythmia herring embryo.pdf. *Environmental Sciences and Technology* 43, 201–207.
- Incardona, J. P., Linbo, T. L., & Scholz, N. L. (2011). Cardiac toxicity of 5-ring polycyclic aromatic hydrocarbons is differentially dependent on the aryl hydrocarbon receptor 2 isoform during zebrafish development. *Toxicology and Applied Pharmacology* 257, 242–249.
- Iwama, G. K., Takemura, A & Takano, A. (1997). Oxygen consumption rates of tilapia in fresh water, sea water, and hypersaline sea water . *Journal of fish biology* 51(5), 886-894
- Jain, K. E., Birtwel, I. K., & Farrell, A. P. (1998). Repeat swimming performance of mature sockeye salmon following a brief recovery period: a proposed measure of fish health and water quality K.E. *Canadian Journal of Zoology* 76, 1488–1496.
- Jenssen, B. M. (1994). Review article: effects of oil pollution, chemically treated oil, and cleaning on the thermal balance of birds. *Environmental Pollution* 86, 207–215.
- Johansen, J. L., & Jones, G. P. (2011). Increasing ocean temperature reduces the metabolic performance and swimming ability of coral reef damselfishes. *Global Change Biology* 17, 2971–2979.
- Johnson, T. P. & Bennett A.F. (1995). The thermal acclimation of burst escape performance in fish: an integrated study of molecular and cellular physiology and organismal performance. *Journal of Experimental Biology* 198, 2165–2175.
- Johnston, I. A. & Temple. G. K. (2002). Thermal plasticity of skeletal muscle phenotype in ectothermic vertebrates and its significance for locomotory behaviour. *Journal of Experimental Biology* 205, 2305–2322.
- Jones, D. R., Kiceniuk, J. W. & Bamford, O. S. (1974). Evaluation of the swimming performance of several fish species from the Mackenzie River. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 31, 1641–1647.

- Jourdan-Pineau, H., Dupont-Prinet, A., Claireaux, G. & McKenzie, D. J. (2010). An investigation of metabolic prioritization in the European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Physiological and Biochemical Zoology* 83, 68-77.
- Kasapi M. A., Domenici P., Blake R. W. & Harper D. (1993). The kinematics and performance of escape responses of the knifefish *Xenomystus nigri*. *Canadian Journal of Zoology* 71, 189-195.
- Kennish, M. J. (1997). Estuarine and Marine Pollution, Practical Handbook. *CRC Press Marine Science Series*, Boca Raton.
- Kerambrun, E., Henry, F., Perrichon, P., Courcot, L., Meziane, T., Spilmont, N., & Amara, R. (2012). Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: effects of metallic and organic compounds. *Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 108, 130–40.
- Kerr, S. R. (1990). The Fry paradigm: its significance for contemporary ecology. *Transactions of the American Fisheries Society* 119(4), 779-785
- Kim, S. G., Chung, D. K. P., Suck, W. J., Lee, J. S., Kim, S. S., & Chung, M. H. (2008). Effects of Dietary Benzo[a]pyrene on Growth and Hematological Parameters in Juvenile Rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). *Environmental Toxicology and Chemistry* 81, 470–474. Il manque le nom du journal
- Kim, W.-K., Lee, S.-K., Choi, K., & Jung, J. (2013). Integrative assessment of biomarker responses in pale chub (*Zacco platypus*) exposed to copper and benzo[a]pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 92, 71–78.
- Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. S. & Gattuso, J.-P. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biology* 19, 1884–1896.

- Langerhans, McKenzie, D. J., Cataldi, E., Owen, S., Taylor, E. W. & Bronzi, P. (2001). Effects of acclimation to brackish water on the growth, respiratory metabolism and exercise performance of Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58, 1104-1112.
- Langerhans, R. B., Layman, C. A., Shokrollahi, M. & DeWitt, T. (2004). Predator-driven phenotypic diversification in *Gambusia affinis*. *Evolution* 58, 2305–2318.
- Langerhans, R.B. (2009). Trade-off between steady and unsteady swimming underlies predator-driven divergence in *Gambusia affinis*. *Journal of Evolutionary Biology* 22, 1057-1075.
- Lankford, T. E., Billerbeck, J. M. & Conover, D. O. (2001). Evolution of intrinsic growth and energy acquisition rates. II. Trade-offs with vulnerability to predation in *Menidia menidia*. *Evolution* 55, 1873-1881
- Lannig, G., Flores, J.F. and Sokolova, I.M. (2006). Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: Pollution reduces temperature tolerance in oysters. *Aquatic Toxicology* 79, 278-287.
- Larcher, T., Vignet, C., Perrichon, P., Ledevin, M., Landi, L., Clerandau, C., Lebihanic, F., Ménard, D., Lyphout, L., Burgeot, T., Joassard, L., Budzinski, H., Cachot, J., Akcha, F. & Cousin, X. Carcinogenic but no genotoxic effects detected following chronic trophic exposure of zebrafish to 3 fractions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). Soumis à *Environmental Science and Pollution Research*.
- Latimer, J. S. , Hoffman, E. J., Hoffman, G., Fasching, J. L. & Quinn, J. G. (1990). Sources of petroleum hydrocarbons in urban runoff. *Water Air Soil Pollution* 52, 1-21.
- Latimer, J. S. & Zheng, J. (2003). The sources, transport, and fate of *Fundulus heteroclitus* PAHs in the marine environment. In: PAHs: An Ecotoxicological Perspective (Douben PET, ed). West Sussex, UK: John Wiley & Sons, 9–33.

- Latif, M., Bodaly, R., Johnston, T., & Fudge, R. J. (2001). Effects of environmental and maternally derived methylmercury on the embryonic and larval stages of walleye (*Stizostedion vitreum*). *environmental Pollution* 111, 139–148.
- Law, R. J. & Biscaya, J. L. (1994). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)-Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. *Marine Pollution Bulletin* 29, 235-241.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* 269, 1–20.
- Lefrançois, C., & Claireaux, G. (2003). Influence of ambient oxygenation and temperature on metabolic scope and scope for heart rate in the common sole *Solea solea*. *Marine Ecology Progress Series* 259, 273–284.
- Lefrançois C, Lagardère J. P., Claireaux, G. (1998). Heart rate telemetry to study environmental influences on fish metabolic expenditure. *In: Developments in Hydrobiology-Advances in invertebrates and fish telemetry (J.P. LAGARDERE & M.L. and Claireaux G. BEGOUT ANRAS ed)*, pp. 215-224. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Lefrancois, C., Shingles & Domenici, P. (2005). The effect of hypoxia on locomotor performance and behaviour during escape in *Liza aurata*. *Journal of Fish Biology* 67(6), 1711–1729.
- Lefrancois, C & Domenici, P. (2006). Locomotor kinematics and behaviour in the escape response of European sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., exposed to hypoxia. *Marine Biology* 149(4), 969-977.
- Levesque, H. M., Moon, T. W., Campbell, P. G. C. & Hontela, A. (2002). Seasonal variation in carbohydrate and lipid metabolism of yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the field. *Aquatic Toxicology* 60, 257-267.
- Lotufo, G. R. (1998). Bioaccumulation of sediment-associated fluoranthene in benthic copepods: uptake, elimination and biotransformation. *Aquatic Toxicology* 44, 1-15

- Lucas M. C. & Johnstone, D. F. 1993. Use of physiological telemetry as a method of estimating metabolism of fish in the natural environment. *Transactions of the American Fisheries Society* 122, 822-833.
- Lucas M. C., Priede, I. G., Armstrong, J. D., Gindy, A. N. Z. L., De Vera (1991). Direct measurements of metabolism, activity and feeding behaviour of pike, *Esox lucius* L., in the wild, by the use of heart rate telemetry. *Journal of Fish Biology* 3, 325-345.
- Lucas, J., Schouman, A., Lyphout, L., Cousin, X., Lefrancois, C., 2013. Allometric relationship between body mass and aerobic metabolism in zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* *In press*
- Lucas, J.**; Bonnieux, A.; Lyphout, L.; Cousin, X.; Miramand, P. & Lefrancois, C. Does trophic contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons impair metabolic aerobic scope in zebrafish *Danio rerio*? Soumis dans *Aquatic Toxicology*.
- Lunde G and Bjorseth A, 1977. Polycyclic aromatic hydrocarbons in long-range transported aerosols. *Nature* 268, 518-519.
- Magnuson J. J., Brandt, S. B. & Stewart, D. J. (1980). Habitat preferences and fishery oceanography. In: Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes (J.E. BARDACH, J.J. MAGNUSON, R.C. MAY & J.M. REINHART ed), pp. 371-381.. ICLARM Conference Proceedings, Manila Philippines.
- Marentette, J. R., Tong, S. & Balshine, S. (2013). The cortisol stress response in male round goby (*Neogobius melanostomus*): effects of living in polluted environments? *Environmental Biology of Fishes* 96, 723–733.
- Marit, J. S., & Weber, L. P. (2011). Acute exposure to 2,4-dinitrophenol alters zebrafish swimming performance and whole body triglyceride levels. *Comparative Biochemistry and Physiology, part C* 154, 14–18.

- Marit, J. S., & Weber, L. P. (2012). Persistent effects on adult swim performance and energetics in zebrafish developmentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Aquatic Toxicology* 106-107, 131–139.
- Martinez -Porchas, M., Martinez Cordova, L.R. & Ramos-Enriquez, R. (2009). Cortisol and Glucose: Reliable indicators of fish stress? *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* 4, 158-178.
- McCormick, M. I. (1998). Behaviorally induced maternal stress in a fish influences progeny by a hormonal mechanism. *Ecology* 79, 1873-1883.
- McCormick, M.I. (1999). Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of a coral reef fish. *Oecologia* 118, 412-422.
- McCormick, M. I. (2006). Mothers matter: crowding leads to stressed mothers and smaller offspring in marine fish. *Ecology* 87, 1104-1109.
- McCormick, M. I. (2009). Indirect effects of heterospecific interactions on progeny size through maternal stress. *Oikos* 118, 744–752.
- McElroy, A. E. , Farrington, J. W. & Teal, J. M. (1989). Bioavailability of PAH in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment* (Varanasi U, ed), pp.1-40. CRC Press, Boca Raton, FL.
- McHugh, J. L. (1967). Estuarine nekton. *American Association for the Advancement of Science Publications* 83, 581–620.
- McKenzie, D. J., Cataldi, E., Owen, S., Taylor, E. W. and Bronzi, P. (2001). Effects of acclimation to brackish water on the growth, respiratory metabolism and exercise performance of Adriatic sturgeon (*Acipenser naccarii*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 58, 1104- 1112.
- McKenzie, D. J., Wong, S., Randall, D. J. Egginton, S., Taylor, E. W. & Farrell, A. P. (2004). The effects of sustained exercise and hypoxia upon oxygen tensions in the red muscle



- of rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* 207(21), 3629-3637.
- McKenzie, D. J., Garofalo, E., Winter, M. J., Ceradini, S., Verweij, F., Day, N. & Taylor, E. W. (2007). Complex physiological traits as biomarkers of the sub-lethal toxicological effects of pollutant exposure in fishes. *Philosophical transactions of the royal society B Biological sciences* 362, 2043–2059.
- McKenzie, D. J., Piccolella, M., Dalla Valle, A. Z., Taylor, E. W., Bolis, C. L. & Steffensen, J. F. (2003). Tolerance of chronic hypercapnia by the European eel *Anguilla anguilla*. *Journal of Experimental Biology* 206, 1717-1726.
- McKenzie, D ; Taylor, E; Wang, I; Skov, P; Steffensen, JF; Campbell, H; Leite, C & Abe, A (2008). Does autonomic regulation of heart rate optimise oxygen uptake in teleost fishes? *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular and Integrative Physiology* 150(3), 117-132.
- Meador, J. P., Sommers, F. C., Ylitalo, G. M., & Sloan, C. A. (2006). Altered growth and related physiological responses in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2364–2376.
- Menzie, C. A., Potocki, B. B. & Santodonato, J. (1992). Ambient concentrations and exposure to carcinogenic PAHs in the environment, *Environmental Science and Technology* 26, 1278-1283.
- Meyer, J.N., Nacci, D.E. & Di Giulio, R.T. (2002). Cytochrome P4501A (CYP1A) in killifish (*Fundulus heteroclitus*): heritability of altered expression and relationship to survival in contaminated sediments. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* 68, 69–81.
- Miklosi, A. & Andrew, R. J. (2006). The Zebrafish as a Model for Behavioral Studies. *Zebrafish* 3, 227-234.

- Milinkovitch, T., Lucas, J., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., & Lefrançois, C. (2012). Effect of dispersed crude oil exposure upon the aerobic metabolic scope in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Marine Pollution Bulletin* 64, 1–7.
- Miller, J. M., Burke, J. S. & Fitzhugh, G. R. (1991). Early life history patterns of Atlantic North American flatfish: Likely (and unlikely) factors controlling recruitment. *Netherlands Journal of Sea Research* 27, 261-275.
- Miller, M.A., 1993. Maternal transfer of organochlorine compounds in salmonines to their eggs. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 1405-1413.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. & Moon., T. W. (1999). Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211–268.
- Monteverdi, G. H. & Giulio, R. T. (2000). Oocytic accumulation and tissue distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and benzo[a]pyrene in gravid *Fundulus heteroclitus*. *Environmental and Toxicological Chemistry* 19, 2512-2518
- Myers, M. S., Landah, J. T., Krahn, M. M., & McCain, B. B. (n.d.). Related Lesions and Exposure to Relationships between Hepatic Neoplasms Toxic Chemicals in Marine Fish from the U.S. West Coast. *Environmental Health Perspectives* 90, 7–15.
- Nagel, R. (2002). The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* : a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19 Suppl 1, 38–48.
- Nahrgang, J., Camus, L., Gonzalez, P., Goksøyr, A., Christiansen, J. S., & Hop, H. (2009). PAH biomarker responses in polar cod (*Boreogadus saida*) exposed to benzo(a)pyrene. *Aquatic Toxicology* 94, 309–319.
- Nebert, D. W., Roe, L., Dieter, M. Z., Solis, W. a, Yang, Y., & Dalton, T. P. (2000). Role of the aromatic hydrocarbon receptor and [Ah] gene battery in the oxidative stress response, cell cycle control, and apoptosis. *Biochemical pharmacology* 59(1), 65–85.

- Neff, J. M. (1979). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. London, Applied Sciences Publishers.
- Neff, J. M. (1985). Polycyclic aromatic hydrocarbons. *In Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications (Rand GM and Petrocelli SR, eds)*, 416-454. Hemisphere Publishing Corporation, New York, USA.
- Nikinmaa, M. (1992). How does environmental pollution affect red cell function in fish? *Aquatic Toxicology* 22, 227-238.
- Nogueira, P., Lourenço, J., Rodriguez, E., Pacheco, M., Santos, C., Rotchell, J. M., & Mendo, S. (2009). Transcript profiling and DNA damage in the European eel (*Anguilla anguilla* L.) exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) 94(2), 123–30.
- Nye, J. A., Davis, D. D., & Miller, T. J. (2007). The effect of maternal exposure to contaminated sediment on the growth and condition of larval *Fundulus heteroclitus*. *Aquatic toxicology* 82, 242–250.
- Oliva, M., Gonzalez de Canales, M. L., Gravato, C., Guilhermino, L., & Perales, J. A. (2010). Biochemical effects and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in senegal sole (*Solea senegalensis*) from a Huelva estuary (SW Spain). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1842–1851.
- Oliveira, M., Pacheco, M., & Santos, M. A. (2008). Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene. *Science of the Total Environment* 396, 70–78.
- Palstra, A. P., Tudorache, C., Rovira, M., Brittijjn, S. A., Burgerhout, E., Thillart, G. E. E. J. M. van den, Planas, J. V. (2010). Establishing Zebrafish as a Novel Exercise Model: Swimming Economy, Swimming-Enhanced Growth and Muscle Growth Marker Gene Expression. *PLoS one*.
- Patel, M. R., Scheffler, B. E., Wang, L., & Willett, K. L. (2006). Effects of benzo(a)pyrene

- exposure on killifish (*Fundulus heteroclitus*) aromatase activities and mRNA. *Aquatic toxicology* 77(3), 267–78.
- Payne, J.R., Driskell, W. B, Short, J. W. , Larsen M. L. (2008). Long term monitoring for oil in the Exxon Valdez spill region. *Marine Pollution Bulletin* 56(12), 2067-81.
- Peake, S. J., & Farrell, A. P. (2004). Locomotory behavior and post-exercise physiology in relation to swimming speed, gait transition and metabolism in free-swimming smallmouth bass (*Micropterus dolomieu*). *Journal of Experimental Biology* 207, 1563–1575.
- Peake, S. J. & Farrell, A. P. (2006). Fatigue is a behavioural response in respirometer confined smallmouth bass. *Journal of Fish Biology* 68, 1742–1755.
- Peterson, R. H. (1974). Influence of fenitrothion on swimming velocities of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 31, 1757-1762.
- Petersen, L. H., & Gamperl, A. K. (2010). Effect of acute and chronic hypoxia on the swimming performance, metabolic capacity and cardiac function of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *The Journal of Experimental Biology* 213, 808–819.
- Phillips, D.J.H. (1980). Quantitative aquatic biological indicators. *Applied Science Publication* 488.
- Plaut, I., & Gordon, M. S. (1994). Swimming metabolism of wild-type and cloned zebrafish *Brachydanio rerio*. *Journal of Experimental Biology* 194, 209–223.
- Plaut, I. (2001). Critical swimming speed: its ecological relevance. *Comparative Biochemistry and Physiology* 131, 41–50.
- Poisson, E., Fisson, C., Amiard-Triquet, C., Burgeot, T., Couteau, J., Dur, G., Durand, F., Forget Leray, J., Letendre, J., Souissi, S. & Xuereb B. (2011). Effets de la contamination chimique. Des organismes en danger ? Fascicule Seine-Aval 2.7, 68p.

- Pörtner, H. O. (2010). Oxygen and capacity-limitation of thermal tolerance: a matrix for integrating climate-related stressor effects in marine ecosystems. *Journal of Experimental Biology* 213, 881-893.
- Pörtner, H. O. & Farrell, A. P. (2008). Physiology and climate change. *Science* 322, 690-692
- Pörtner, H. O., Schulte, P. M., Wood, C. M. and Schiemer, F. (2010). Niche Dimensions in Fishes: An Integrative View. *Physiological and Biochemical Zoology* 83, 808-826.
- Pottinger, T. G. & Mosuwe, E. (1994). The corticosteroidogenic response of brown and rainbow-trout alevins and fry to environmental-stress during critical period. *General and Comparative Endocrinology* 95, 350-362.
- Preuss, T., & Faber, D. S. (2003). Central cellular mechanisms underlying temperature-dependent changes in the goldfish startle-escape behavior. *The Journal of neuroscience* □: *the official journal of the Society for Neuroscience* 23(13), 5617–26.
- Priede I. G. & P. Tytler, (1977). Heart rate measure of metabolic rate in teleost fishes, *Salmo gairdneri*, *Salmo trutta* and *Gadus morhua*. *Journal of Fish Biology* 10, 231-242.
- Priede I. G. & Young, A. H. (1977). The ultra sonic telemetry of cardiac rythms of wild brown trout (*Salmo trutta* L.) as an indicator of bio-energetics and behaviour. *Journal of Fish Biology* 10, 299-318.
- Priede, I. G., 1977. Natural selection for energetic efficiency and the relationship between activity level and mortality. *Nature* 267, 610-611.
- Priede, I.G. (1983). Heart rate telemetry from fish in the natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 76, 515-524.
- Raabe, W. & Lin, S. (1985). Pathophysiology of ammonia intoxication. *Experimental Neurology* 87,519–532.

- Rainbow, P. S. & White, S. L. (1989). Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia* 174, 245–262.
- Randall, D.J. (1968). Functional morphology of the heart in fishes. *American Zoologist* 8, 179-189.
- Randall, D. J. (1982). The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. *Journal of Experimental Biology* 100, 275-288.
- Randall, D.J. & Brauner, C. (1991). Effects of environmental factors on exercise in fish. *Journal of Experimental Biology* 160, 113-126.
- Randall, D.J. & Tsui, T.K.N. (2002). Ammonia toxicity in fish. *Marine Pollution Bulletin* 45, 17-23.
- Reed, W. E. & Kaplan, I. R. (1977). The chemistry of marine petroleum seeps. *Journal of Geochemistry Exploration* 7, 255- 293.
- Reid, S. G., Bernier, N. J. & Perry, S. F. (1998). The adrenergic stress response in fish : control of catecholamine storage and release. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 120, 1-27.
- Reidy, S. P., Nelson, J. A., Tang, Y. and Kerr, S. R. (1995). Postexercise metabolic rate in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and its dependence upon the method of exhaustion. *Journal of Fish Biology* 47, 377–386.
- Reidy, S., Kerr, S. R. & Nelson, J. A. (2000). Aerobic and anaerobic swimming performance of individual Atlantic cod. *Journal of Experimental Biology* 203, 347–357.
- Reynaud, S., & Deschaux, P. (2006). The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquatic Toxicology* 77, 229–238.
- Rocha, A. J. S., Gomes, V., Passos, M. J. A. C. R., Hasue, F. M., Santos, T. C. A., Bicego, M.

- C., Taniguchi, S. & Ngan, P. V. (2012). EROD activity and genotoxicity in the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* exposed to benzo[a]pyrene (BaP) concentrations. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34, 995–1003.
- Rome, L. C., Choi, I., Lutz, G., & Sosnicki, A. A. (1992). The influence of temperature on muscle function in the fast swimming scup. I. Shortening velocity and muscle recruitment during swimming. *Journal of Experimental Biology* 163, 259–279
- Rome, L. C., Loughna, P. T., & Goldspink, G. (1984). Muscle fiber activity in carp as a function of swimming speed and muscle temperature. *American Journal of Physiology* 247, 272–279.
- Rome, L.C. 2007. The effect of temperature and thermal acclimation on the sustainable performance of swimming scup. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 362, 1995-2016.
- Santer, R.M. (1985). Morphology and Innervation of the Fish Heart. Berlin: Springer- Verlag.
- Satchell, G. H. (1991). Physiology and form of fish circulation., p. 1–235. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J. W. & Macdonald, R. W. (2007). Interactions between climate change and contaminants. *Marine Pollution Bulletin* 54, 1845-1856.
- Schreck & P. B. Moyle (eds.), Methods for fish biology, pp. 451–489. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Schurmann, H., & Steffensen, J. F. (1997). Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. *Journal of fish biology* 50, 1166–1180.
- Selye, H. (1973). The evolution of the stress concept. *American Scientist* 61, 692–699.
- Seruto, C., Sapozhnikova, Y., & Schlenk, D. (2005). Evaluation of the relationships between biochemical endpoints of PAH exposure and physiological endpoints of reproduction in

- male California Halibut (*Paralichthys californicus*) exposed to sediments from a natural oil seep Cherlynn. *Marine Environmental Research* 60,454-465.
- Sevastyanova, O., Binkova, B., Topinka, J., Sram, R. J., Kalina, I., Popov, T. & Farmer, P. B. (2007). In vitro genotoxicity of PAH mixtures and organic extract from urban air particles Part II: Human cell lines. *Science direct* 620, 123–134.
- Shingles, A., McKenzie, D. J., Taylor, E. W., Moretti, A., Butler, P. J. & Ceradini, S. (2001). Effects of sublethal ammonia exposure on swimming performance in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Experimental Biology* 204, 2691-2698.
- Singh, V.K., Patel, D.K., Jyoti, Ram, J., Mathur, N., Siddiqui, M.K.J. (2008). Blood levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in children and their association with oxidative stress indices: An Indian perspective. *Clinical Biochemistry* 41, 152–161.
- Sokolova, I.M & Lannig G. (2008). Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Climate Research* 37, 181–201
- Spence, R., Gerlach, G., Lawrence, C., & Smith, C. (2008). The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio*. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 83(1), 13–34.
- Sprague, J.B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish III. Sub-lethal effects and "safe" concentrations. *Water Research* 5, 245-266.
- Steffensen, J. F., Bushnell, P. G., & Schurmann, H. (1994). Oxygen consumption in four species of teleosts from Greenland: no evidence of metabolic cold adaptation. *Polar Biology* 14(1), 49–54.
- Stobutzki, I. C. and Bellwood, D. R. (1994). An analysis of the sustained swimming abilities of pre- and post-settlement coral reef fishes. *Journal of Experimental Biology Ecology* 175, 275-286.



- Sundt, R. C., Pampanin, D. M., Larsen, B. K., Brede, C., Herzke, D., Bjørnstad, A. & Andersen, O. K. (2006). The BEEP stavanger workshop: mesocosm exposures. *Aquatic Toxicology* 78, S5-S12.
- Swanson, C., Young, P. S. and Cech, J. J., Jr (1998). Swimming performance of Delta smelt: Maximum performance, and behavioral and kinematic limitations on swimming at submaximal velocities. *Journal of Experimental Biology* 201, 333-345.
- Talmage S. C. & Gobler C. J. (2010). Effects of past, present, and future ocean carbon dioxide concentrations on the growth and survival of larval shellfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 17246–17251.
- Taylor, J. C. & Miller, J. M. (2001). Physiological performance of juvenile southern flounder, *Paralichthys lethostigma* (Jordan and Gilbert, 1884), in chronic and episodic hypoxia. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 258, 195–214.
- Taylor, E. B., & McPhail, J. D. (1986). Prolonged and burst swimming in anadromous and freshwater threespine stickleback, *Gasterosteus aculeatus*. *Canadian Journal of Zoology* 64, 416–420.
- Taylor, P., Blier, P. U., Pelletier, D., & Dutil, J. D. (1997). Reviews in Fisheries Science Does aerobic capacity set a limit on fish growth rate? Does Aerobic Capacity Set a Limit on Fish Growth Rate? *Fisheries Science* 5(4), 323–340.
- Thomas, J. K., & Janz, D. M. (2011). Dietary selenomethionine exposure in adult zebrafish alters swimming performance, energetics and the physiological stress response. *Aquatic Toxicology*, 102, 79–86.
- Thomas, J. K., Wiseman, S., Giesy, J. P., & Janz, D. M. (2013). Effects of chronic dietary selenomethionine exposure on repeat swimming performance, aerobic metabolism and methionine catabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*) Jith. *Aquatic Toxicology* 130-131, 112–122.

- Thorarensen H., Gallagher P.E & Farrell A.P. (1996). The limitations of heart rate as a predictor of metabolic rate in fish. *Journal of Fish Biology* 49, 226-236.
- Tintos, A., Gesto, M., Miguez, J. M. & Soengas, J. L. (2007). Naphthalene treatment alters liver intermediary metabolism and levels of steroid hormones in plasma of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66,139–147.
- Tintos, A., Gesto, M., Miguez, J. M., Soengas, J. L. (2008). b-Naphthoflavone and benzo(a)pyrene treatment affect liver intermediary metabolism and plasma cortisol levels in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 69, 180–186.
- Tuvikene, A. (1995). Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Annales zoologici fennici* 32, 295–309.
- Vagner, M., Lefrançois, C., Ferrari, R. S., Satta, A., & Domenici, P. (2008). The effect of acute hypoxia on swimming stamina at optimal swimming speed in flathead grey mullet *Mugil cephalus*. *Marine Biology*, 155, 183–190.
- Van denThillart, G., via, J. D., Vitali, G. & Cortesi, P. (1994). Influence of long term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical oxygen levels for aerobic and anaerobic metabolism. *Marine Ecology* 104, 109-117.
- Van Der Oost, R., Vindimianb, E., Brink, P. J. Van Den, Satumalay, K., Heida, H., & Vermeulend, N. P. E. (1997). Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers. *Aquatic toxicology* 39, 45–75.
- Vicquelin L., Leray-Forget J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H., Cachot J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* 105, 235-245.
- Videler, J. J. (1993). *Fish Swimming*. Chapman and Hall, London.

- Vignet, C., LeMenach, K., Mazurais, D., Lucas, J., Perrichon, P., Le Bihanic, F., Lyphout, L., Frère, L., Bégout, M.-L., Zambonio-Infante, J.-L., Budzinski, H. & Cousin, X. Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I: Survival and growth. Soumis à *Environmental Science and Pollution Research*.
- Von Westernhagen, H., Rosenthal, H., Dethlefsen, V., Ernst, W., Harms, U., & Hansen, P. D. (1981). Bioaccumulating substances and reproductive success in baltic flounder *Platichthys flesus*. *Aquatic Toxicology*, 1, 85–99.
- Waiwood, K.G. & Beamish F.W.H. (1978). Effects of copper, pH and hardness on the critical swimming performance of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Water Research* 12, 611-619.
- Wakeham, S. G., Schaffner, C. & Giger, W. (1980a). Polycyclic aromatic hydrocarbons in recent lake sediments. I- Compounds derived from biogenic precursors during early diagenesis. *Geochimical Cosmochimical Acta* 44, 415-429.
- Wakeling, J.M., N.J. Cole, K.M. Kemp and I.A. Johnston. 2000. The biomechanics and evolutionary significance of thermal acclimation in the common carp, *Cyprinus carpio*. *American Journal Physiology—Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 279: R657–R665.
- Waldbusser G. G. , Voigt E. P. , Bergschneider H. , Green M. A. & Newell R. I. E. (2011) Biocalcification in the Eastern oyster (*Crassostrea virginica*) in relation to long-term trends in Chesapeake Bay pH. *Estuaries and Coasts* 34, 221–231.
- Walker, J. a., Ghalambor, C. K., Griset, O. L., McKenny, D., & Reznick, D. N. (2005). Do faster starts increase the probability of evading predators? *Functional Ecology* 19(5), 808–815.
- Ware, D.M. (1982). Power and evolutionary fitness of teleosts. *Canadian Journal of Fish Aquatic Science* 39, 3–13.

- Wassenberg, D. M., & Di Giulio, R. T. (2004). Synergistic Embryotoxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists with Cytochrome P4501A Inhibitors in *Fundulus heteroclitus*. *Environmental Health Perspectives* 112(17), 1658–1664.
- Watkins, T.B. (1996). Predator-mediated selection on burst swimming performance in tadpoles of the Pacific tree frog, *Pseudacris regilla*. *Physiological Zoology* 69, 154–167.
- Webb, P. W. (1978). Fast-start performance and body form in seven species of teleost fish. *Journal of Experimental Biology* 74, 211–226.
- Webb, P. W. (1986). Effect of body form and response threshold on the vulnerability of four species of teleost prey attacked by largemouth bass (*Micropterus salmoides*). *Canadian Journal of Fisheries Aquatic Science* 43, 763–771.
- Webb, P. W. (1993). Swimming. In *The physiology of fishes*. (Evans, D.H. ed.) CRC Press.
- Webb, P. W. (1994). The biology of fish swimming. In *Mechanics and physiology of animal swimming*.
- Webb, P. W. (1998). Swimming. In *The Physiology of Fishes* (Evans, D. H., ed.), pp. 3–24. CRC Marine Science Series, New York.
- Webber D.M., Boutilier, R.G., Kerr S.R. (1998). Cardiac output as a predictor of metabolic rate in cod (*Gadus morhua*). *Journal of Experimental Biology* 201, 2779-2789..
- Wedemeyer, G.A., Barton, B.A. & McLeay., D.J., 1990. Stress and acclimation. In: *Methods for Fish Biology*, American Fisheries Society, Bethesda (C.B. Schreck & P.B. Moyle ed.) , pp.451-490.
- Wedemeyer, G. A. & McLeay, D. J. (1981). Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In *Stress and fish* (A. D. Pickering ed.), , pp. 247–275. Academic Press, New York.

- Wedemeyer, G.A., McLeay, D.J. and Goodyear, C.P., 1984. Assessing the tolerance of fish and fish populations to environmental stress: the problems and methods of monitoring. *In Contaminant Effects on Fisheries (V.W. Cairns, P.V. Hodson, and J.O. Nriagu editors)*.
- Weihs, D. (1973). The mechanism of rapid starting of slender fish. *Biorheology* 10, 343–350
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews* 77, 591–625.
- Wessel, N., Ollivier, H., Goff, J. Le, & Burgeot, T. (2010). The Toxicity of Benzo [a] pyrene on Sole ( *Solea Solea* ). *Hepatocytes: Assessment of Genotoxic and Enzymatic Effects* 346–354.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., & 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 Suppl, 71–73.
- Whittaker, R.H. (1975). *Communities and ecosystems*. Macmillan, New York. 385 pp.
- Willett, K., Steinberg, M., Thomsen, J., Narasimhan, T. R., Safe, S., McDonald, S. & Kennicutt, M. C. (1995). Exposure of killifish to benzo [a] pyrene: comparative metabolism , DNA adduct formation and aryl hydrocarbon ( Ah ) receptor agonist activities. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112B(1), 93–103.
- Wilson, R. W., Bergman, H. L. & Wood, C. M. (1994). Metabolic costs and physiological consequences of acclimation to aluminum in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). 1: Acclimation specificity, resting physiology, feeding, and growth. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 51, 527-535.
- Wu, R. S. S., Zhou, B. S., Randall, D. J., Woo, N. Y. S. & Lam, P. K. S. (2003). Aquatic hypoxia is an endocrine disruptor and impairs fish reproduction. *Environmental Science and Technology* 37, 1137-1141.

- Windsor, J. G. & Hites, R. A. (1979). Polycyclic aromatic hydrocarbons in Gulf of Maine sediments and Nova Scotia soils. *Geochimical Cosmochimical Acta* 43, 27-33.
- Yamaguchi, K., Near, R., Shneider, A., Cui, H., Ju, S.-T., & Sherr, D. H. (1996). Fluoranthene-Induced Apoptosis in Murine T Cell Hybridomas Is Independent of the Aromatic Hydrocarbon Receptor1. *Toxicology and Applied Pharmacology* 139, 144–152.
- Young, P. S. & Cech, J. J. (1993). Improved growth, swimming performance, and muscular development in exercise-conditioned young-of-the- year striped bass (*Morone saxatilis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50, 703-707.
- Youngblood, W. W. & Blummer, M. (1975). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment : homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochimical Cosmochimical Acta* 39, 1303-1314.
- Yunker, M. B., MacDonald, R. W. , Cretney, W. J., Fowler, B. R. & McLaughlin, F. A. (1993). Alkane, terpene, an polycyclic aromatic hydrocarbon geochemistry of the Mackenzie River and Mackenzie shelf : riverine contributions to Beanfort Sea coastal sediment. *Geochimical Cosmochimical Acta* 57(13), 3041-3061.
- Yunker, M. B., MacDonald, R. W., Vingarzas, R., Mitchell, R. H., Goyette, D. & Sylvestre, S., (2002). PAHs in the Fraser River basin : a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Organic Geochemistry* 33(4), 489-515.
- Yunker M. B., McDonald R.W., Goyotte D., Paton D. W. , Fowler B. R., Sullivan D, Boyd J. (1999). Natural and anthropogenic inputs of hydrocarbons to the Strait of Georgia. *Science of the Total Environment* 225,181-209.
- Zanardi, E., Bicego, M.C., De Miranda, L.B., Weber, R.R., 1999. Distribution and origin of hydrocarbons in water and sediment in Sao Sebastiao, SP, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 38, 261-267.



---

# **Annexes**

---





**Annexe 1 : Exemples de propriétés physico-chimiques de HAP - Extrait de la thèse de Vicquelin (2011)**

<b>Composé</b>	<b>Solubilité (<math>\mu\text{g/L}</math>)</b>	<b>Log <math>K_{ow}</math></b>	<b>Log <math>K_{oc}</math></b>	<b><math>K_d</math></b>
Naphtalène	31 700	3,32	3,11	21
Acénaphthylène	3 930	4,07	3,83	108
Acénaphthène	16 100	3,94	3,79	99
Fluorène	1 980	4,23	4,15	226
Anthracène	73	4,50	4,41	542
Phénanthrène	1 290	4,60	4,22	266
Pyrène	135	5,20	4,82	1060
Fluoranthène	260	5,20	4,74	879
Benzo[a]anthracène	14	5,66	5,252	2840
Chrysène	2,0	5,80	5,372	3750
Benzo[b]fluoranthène	1,5	6,40	5,89	12300
Benzo[k]fluoranthène	0,8	6,40	5,89	12300
Pérylène	0,4	6,40	5,89	12300
Benzo[a]pyrène	3,8	6,20	5,71	8280
Indéno[1,2,3-c,d]pyrène	0,19	6,70	6,14	22300
Dibenzo[a,h]anthracène	0,6	6,50	5,97	15000



**Annexe 2 : Short communication acceptée dans *Journal of Fish Biology***

**Allometric relationship between body mass and aerobic metabolism in zebrafish *Danio rerio***

Lucas J. <sup>(1,2)</sup>, Schouman A. <sup>(1)</sup>, Lyphout L. <sup>(2)</sup>, Cousin X. <sup>(2,3)</sup>, Lefrancois C. <sup>(1)</sup>

<sup>(1)</sup> UMR 7266 Littoral Environnement Sociétés (LIENSs), Institut du Littoral et de l'Environnement - 2 rue Olympe de Gouges, 17000 La rochelle, France ;

<sup>(2)</sup> Ifremer, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France ;

<sup>(3)</sup> Inra LPGP, Campus de Beaulieu - Bâtiment 16A - 35042 RENNES Cedex, France.

**Abstract**

The relationship between body mass and metabolic rate was investigated through the assessment of active and standard metabolic rate at different life stages in zebrafish *Danio rerio* (5 day-old larvae, 2 month-old juveniles and 6 month-old adults). Scaling exponents and constants were assessed for standard ( $R_S=0.273M^{0.965}$  in  $\text{mgO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) and active metabolic rate ( $R_A=0.799M^{0.926}$  in  $\text{mgO}_2\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). These data provide the basis for further experiments regarding the effects of environmental factors on aerobic metabolism throughout the life cycle of this species.

*Key words:* allometric scaling exponent, aerobic metabolism, zebrafish

Author to whom correspondence should be addressed. Tel.: +33 5 46 50 72 17; e-mail: [julie.lucas@univ-lr.fr](mailto:julie.lucas@univ-lr.fr)

Active metabolic rate ( $R_A$ ) is the maximal aerobic metabolic rate of an organism in a highly active state and standard metabolic rate ( $R_S$ ) is the minimal metabolic rate necessary for supporting maintenance activities (e.g. ventilation) measured in resting, starved and non-maturing individual (Fry, 1947; Brett, 1964). Aerobic metabolic scope ( $R_{AS}$ ) is the difference between  $R_A$  and  $R_S$  and represents the capacity of an organism to provide oxygen to sustain energy demanding activities (Fry, 1947).  $R_{AS}$  can be influenced by a set of environmental parameters such as temperature, oxygen and salinity (Shurmann & Steffensen, 1997; Lefrançois & Claireaux, 2003; Johansen & Jones, 2011). It has therefore been used in many studies to assess the influence of environmental factors on metabolic performance and energy-demanding activities in various fish species (Fry, 1971; Priede, 1985; Claireaux & Lefrançois, 2007). It has been demonstrated, in many species however, that intrinsic parameters such as ontogeny and body size can also influence metabolism independently of any effects of environmental conditions (Clark & Johnston, 1999; Bokma, 2004; Killen, 2007, 2010; Moran & Wells, 2007)

Zebrafish *Danio rerio* (Hamilton 1822) is a small teleost species whose biological characteristics make it suitable for experimental studies (e.g. small size, easy breeding, high fecundity; Miklosi & Andrew, 2006; Lawrence, 2007). Its short life cycle and rapid development also facilitate investigations regarding the effects of environmental factors on different life stages. In the last two decades, some studies have been published regarding the metabolic performance of the *D. rerio* exposed to various environmental constraints (Plaut & Gordon, 1994; Plaut, 2000; Marit & Weber, 2011, 2012). Despite the increasing interest in *D. rerio*, only the studies of Barrionuevo & Burggren (1999) and Burggren (2005) investigated how body mass influenced metabolism, although they did not establish the regression describing this relationship. The aim of the present study was therefore to investigate the allometric relationship between body mass and metabolic rate in *D. rerio*, and derive the species-specific scaling exponent. This was achieved by measuring  $R_A$  and  $R_S$  at three different life stages.

Ten broodstock couples (wild-type Tuebingen strain, *TU*) were reared together in a 10 l tank. Spawnings were obtained from these couples each week over two month. In order to avoid any bias due to familial characteristics, at least 5 spawns were mixed. Then, 100 larvae were randomly selected and reared to be tested at three different life stages: (i) larvae, 5 days post fertilization, (ii) 60 dpf juveniles and (iii) 5 months old adults. From 2 weeks onwards, fish

were kept in groups of 10 individuals in 3l aquaria with system water prepared as a mix of reverse-osmosis treated and tap water (both being filtered through sediment and activated charcoal filters) to obtain a water with constant conductivity of 300 $\mu$ S. Fish were reared at a constant temperature of 28 °C under artificial light with a constant photoperiod of 14h:10h (L:D) and were fed with dry food (Inicio plus, Biomar, France, <http://www.biomar.com>) and brine shrimp (Océan Nutrition Europe BVBA, Belgium, <http://www.oceannutrition.eu>) in the morning and afternoon, respectively. Fish were fasted 24 h prior to the experiments.

To assess their metabolic rate, fish were placed into circular size-adapted respirometers. For larvae, the set-up consisted of 4 independent glass micro respirometer chambers (diameter  $d=1.12$  cm, volume  $V=0.985.10^{-3}$  l; Loligo systems, Denmark). For the two other life stages, 8 larger respirometers were run simultaneously ( $d=3.75$ cm,  $V=0.0611$  and  $7.50$  cm,  $0.179$  l for juveniles and adults respectively). Respirometers were submerged into buffer tanks (depth x length x height: 10x20x31cm for larvae, 10x75x75xcm for juveniles and adults) and filled with temperature-controlled, oxygenated system water as above. Flush pumps controlled the water supply in each respirometer. Each flush pump was controlled by a timer, allowing intermittent flow respirometry (Steffensen, 1989) where phases of oxygen renewal alternated with phases of oxygen consumption measurements with a period of 15:15min for larvae and 30:30 min for both juveniles and adults. In addition, the set-up was completed by a multi-channel peristaltic pump was used to mix the water within each respirometer. Each respirometer was equipped with a fiber optic sensor (PreSens) connected to a multichannel oxygen measuring system (OXY 4 mini, PreSens) to record dissolved oxygen levels. Optic fibers were calibrated at 0% and 100% of air saturation at a temperature of 28°C. A factor of conversion based on oxygen solubility into water was used to convert oxygen data from percentage saturation to mgO<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> (i.e. 100% was equivalent to 7.94 mgO<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup> for a 28°C temperature and a 0 salinity). Oxygen saturation was recorded every five seconds with the program Oxyview (PreSens).

Larvae were tested in groups of 10 individuals per chamber. Juveniles and adults were tested individually; each fish was only tested once. Each experimental trial comprised two consecutive steps. First, to assess  $R_A$ , fish metabolism was increased through chasing (Schurmann & Steffensen, 1997; Lefrançois & Claireaux, 2003; Jourdan-Pineau *et al.*, 2010; Cannas *et al.*, 2013, Clark *et al.*, 2012). Each group of larvae or individual fish was transferred from the rearing aquaria to a 6-7 ml Petri dish or one liter tank respectively, where

they were chased with a stick. When exhausted (i.e. did not respond to stimulation), they were transferred in respirometers to measure oxygen consumption over 20 min. After this first measurement of oxygen consumption, a second one was performed to confirm the accuracy of the  $R_A$  assessment. To do that fish were chased again inside the respirometer and their oxygen consumption measured for a new period of 20 min. To estimate  $R_S$ , fish were left undisturbed in the respirometer for 48h, during which oxygen consumption was regularly and automatically measured. After the 48h period of measurements, the fish were removed from the respirometers and anesthetized with benzocaïne at a concentration of  $50\text{mg.l}^{-1}$ . The wet body mass of each individual was determined, as well as the standard length  $L_S$  of juveniles and adults: (a) larvae, 5 dpf ( $n=11$  groups of 10 larvae; mean  $\pm$  S.E., mass,  $M=0.245.10^{-3} \pm 0.036.10^{-3}$  g), (b) 60 dpf juveniles ( $n=14$ ,  $M=0.097 \pm 0.035\text{g}$ ,  $L_S=18.5 \pm 2.2$  mm) and (c) 5 months adults ( $n=22$ ,  $M=0.326 \pm 0.103\text{g}$ ,  $L_S=26.9 \pm 1.9$  mm).

A blank measurement without fish was performed before and after each trial, to quantify background respiration. Linear change is assumed in background oxygen consumption over the 48h-experimental trial and subtracted the calculated background from the corresponding total oxygen consumption measured.

The non specific aerobic metabolic rate (or oxygen consumption  $\text{MO}_2$  in  $\text{mgO}_2.\text{h}^{-1}$ ) was calculated according to the following formula:

$$\text{MO}_2 = \Delta[\text{O}_2].V. \Delta t^{-1} \quad \text{equation (1)}$$

where  $\Delta[\text{O}_2]$  (in  $\text{mgO}_2.\text{l}^{-1}$ ) is the variation in oxygen concentration during the measurement period  $\Delta t$  (in h) and  $V$  (in l) is the volume of the respirometer.  $\text{MO}_2$  correspond to the  $R_A$ , the maximal  $\text{MO}_2$  obtained after the fish being chased, or to the  $R_S$ , which is the  $\text{MO}_2$  assessed according to the method described by Steffensen et al. (1994). Briefly, to assess  $R_S$ , the frequency distribution of the  $\text{MO}_2$  values was plotted recorded during the last 24 hours of each trial. This generally produced a bimodal distribution where the higher and the lower mode were considered to reflect routine metabolic rate, i.e. energy required by the animal for normal activity, and  $R_S$ , respectively.  $R_A$  and  $R_S$  were assessed for each individual.

The non specific aerobic metabolic rate of organisms typically increases with body mass according to the allometric equation:

$$R=aM^b \quad \text{equation (2)}$$

where  $R$  is the metabolic rate ( $R_S$  or  $R_A$  in  $\text{mgO}_2\cdot\text{h}^{-1}$ ),  $a$  is the species-specific scaling constant (or proportionality constant),  $M$  is the body mass (in g), and  $b$  is the scaling exponent. This equation is a power function, where the value of  $b$  provides information on how the variable of interest changes with body size.

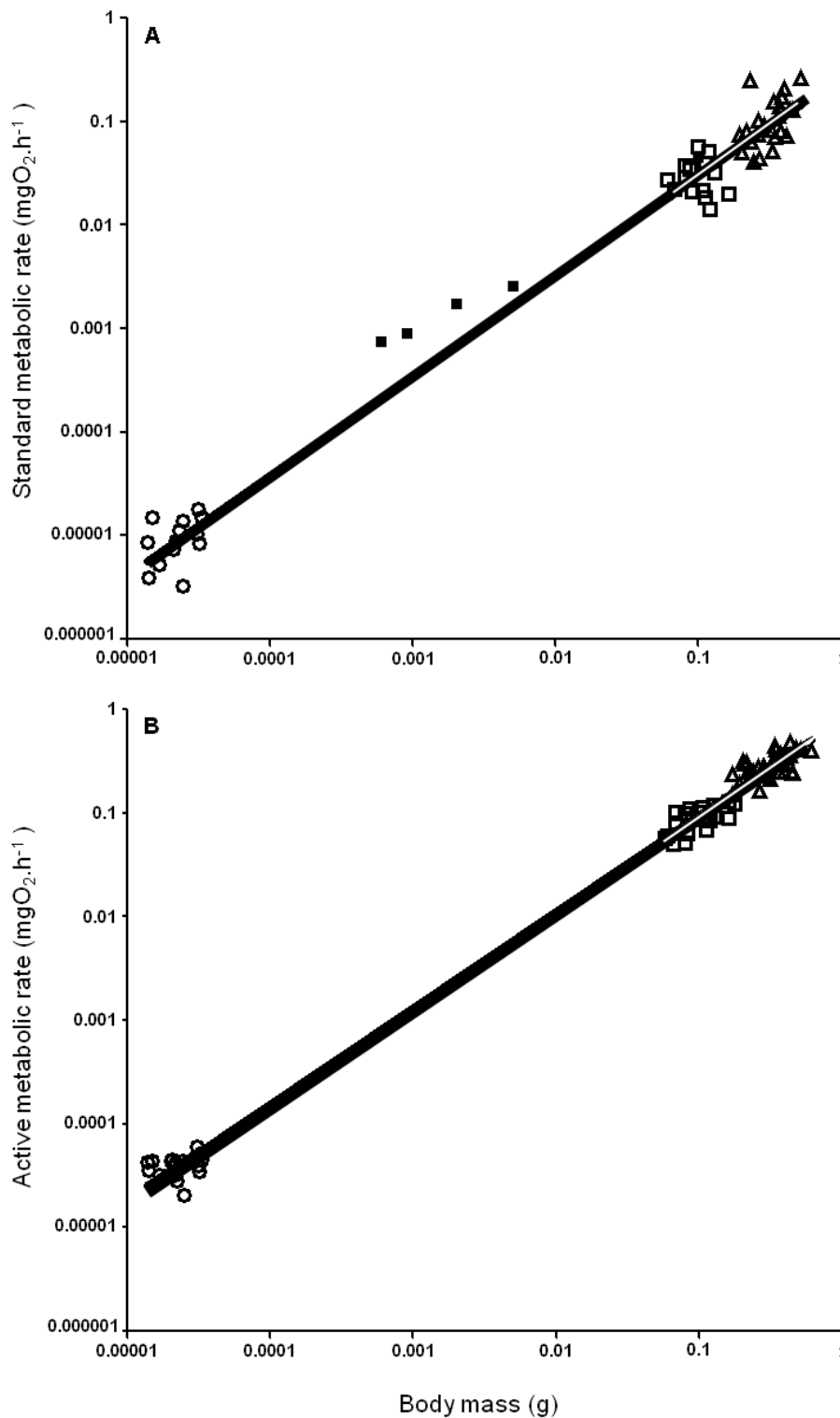
Equation (2) can be linearized with a log transformation:

$$\log Y = \log a + b \log M \quad \text{equation (3)}$$

The logarithm base 10 of each metabolic variable ( $R_S$  or  $R_A$ ) was therefore plotted against the logarithm base 10 of body mass. Fitting a linear regression allowed provided the scaling exponent  $b$  and the log of the scaling coefficient ( $\log a$ ), i.e. the slope and the intercept, respectively. Previous studies in fishes (Post & Lee, 1996; Killen, 2007; Moran & Wells, 2007) have argued the metabolic rate of larvae is likely to scale differently from juveniles and adults because of their incomplete development. These groups were, therefore, analyzed separately. A first linear regression was therefore derived for the three stages and a second considering only juveniles and adults. The two scaling exponents  $b$  and scaling factors  $a$  were then compared as described by Zar (1984) with a modification of the t-test. Results were considered significant at  $P < 0.05$ .

For  $R_S$ , scaling factor  $a_{RS}$  and scaling exponent  $b_{RS}$  was  $0.273 \pm 0.038$  ( $\pm$  S.E.) and  $0.965 \pm 0.015$ , respectively when the three life stages were considered. These constants were  $0.276 \pm 0.084$  and  $0.969 \pm 0.110$ , respectively, when only juveniles and adults were taken into consideration. These values did not differ significantly for either constant (Student's t-test,  $t_{1.82} = -0.00127$ ,  $P > 0.05$ ; Student's t-test,  $t_{1.81} = 0.00068$ ,  $P > 0.05$ , respectively). The same pattern was observed for  $R_A$ . Scaling factors ( $a_{RA(L+J+A)} = 0.799 \pm 0.024$  and  $a_{RA(J+A)} = 0.809 \pm 0.051$ ) as well as scaling exponents ( $b_{RA(L+J+A)} = 0.926 \pm 0.009$  and  $b_{RA(J+A)} = 0.931 \pm 0.068$ ) did not differ significantly whether larvae were considered or not (Student's t-test, for  $a_{RA}$ :  $t_{1.81} = 0.01270$ ,  $P > 0.05$ ; for  $b_{RA}$ :  $t_{1.81} = 0.00596$ ,  $P > 0.05$ ). Data for "resting metabolic rate" of *D. rerio* at 28°C, reported by Barrionuevo & Burggren (1999) and Burggren (2005) and converted to  $\text{mgO}_2\cdot\text{h}^{-1}$ , were consistent with  $R_S$  values measured in the current study (Fig. 1A). It appears that their data fit with standard metabolic rate regression.





**Figure 3.** Relationships between aerobic metabolic rate and body mass for *D. rerio*. On each graph, the black line represents the scaling relationship across the three life stages: 5 day-old larvae ( $\circ$ , L), 2 month-old juveniles ( $\square$ , J) and 6 month-old adults ( $\Delta$ , A). The white line shows the scaling only for juveniles and adults (J+A). The scaling factor  $a$  and scaling

exponent  $b$  were estimated through the allometric equation  $R=aM^b$  (equation 2). For each of these constants, the value is expressed as the average ( $\pm$  standard error). For standard metabolic rate (graph A), considering all stages  $R_{S(L+J+A)}$  is equal to  $0.799 (\pm 0.038) M^{0.965 (\pm 0.085)}$  for  $n=50$  ( $P<0.0001$ ), considering juveniles and adults,  $R_{A(J+A)}$  is equal to  $0.809 (\pm 0.084) M^{0.969 (\pm 0.110)}$  for  $n=37$  ( $P<0.0001$ ). Regarding active metabolic rate (graph B):  $R_{A(L+J+A)}$   $0.273(\pm 0.024)M^{0.926(\pm 0.010)}$  for  $n=78$  ( $P<0.0001$ ),  $R_{A(J+A)}$   $0.276(\pm 0.051)M^{0.931(\pm 0.068)}$  for  $n=60$  ( $P<0.0001$ ). In addition, the studies of Barrionuevo & Burggren (1999) and Burggren (2005) measured oxygen consumption in fish presenting a resting state at the temperature of 28 °C which permitted to complete our data set regarding the standard metabolic rate at the same temperature. After conversion into  $\text{mgO}_2\cdot\text{h}^{-1}$ , these values were added on the graph (A, ■).

This is the first study examining the scaling of metabolic rate with body mass over the lifecycle of *D. rerio*. The results indicate that a single scaling exponent can be employed irrespective of life stages in this species. This is in agreement with the observations made by Killen *et al.* (2007) on three species of marine teleost (e.g. ocean pout *Macrozoarces americanus* Bloch & Schneider 1801; lumpfish *Cyclopterus lumpus* L. 1758; and shorthorn sculpin *Myoxocephalus scorpius*, L. 1758), while the contrary was shown by Post & Lee (1996) for other species (e.g. the common carp *Cyprinus carpi*, L. 1758; rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792; sea bream *Pagrus major*, Temmink & Schlegel 1843). White & Seymour (2011) studied mass-specific  $R_S$  of 31 fish species and reported that several species have higher allometric exponents in early larval stages compared to their later stages. Also, in their study of yellowtail kingfish *Seriola lalandi* (Valenciennes 1833), Moran & Wells (2007) considered that the allometric exponent changed continually during development. In fact, metabolism in larvae may be affected by processes specific to this early ontogenic stage such as higher rates of protein turnover, development of energy consuming tissue or organs, or the progressive transition from cutaneous gas exchange to branchial respiration or changes in swimming ability (Post & Lee, 1996; Killen *et al.*, 2007; White & Seymour, 2011; Gore & Burggren, 2012). Nonetheless, understanding of ontogenic changes in aerobic scope in fishes throughout remains limited. In *D. rerio*, the general pattern observed may be related to its short lifecycle, 5dpf larvae having already completed most of their organogenesis (Kimmel *et al.*, 1995). It could be interesting to obtain data for 21dpf, when larval metamorphosis occurs with maturation of several physiological functions and the completion of the transfer of respiratory gas exchange from predominantly cutaneous to

predominantly branchial. As expected, the scaling exponents  $b_{RA}$  and  $b_{RS}$  differed significantly from 1, confirming that metabolic rate scaled allometrically with body mass in this species (Student's t-test,  $t_{1.47}=55.88$ ,  $P<0.0001$  for  $b_{RA}$ ;  $t_{1.47}=5.224$ ,  $P<0.05$  for  $b_{RS}$ ).

Although studies by Kleiber (1932) on mammals and Hemmingsen (1960) on unicells, multicellular ectotherms and endotherms suggested that 0.75 was a universal scaling exponent, recent investigations on fishes have revealed significant heterogeneity in scaling exponents among species (Glazier, 2005, 2006, 2009c; White *et al.*, 2006; Downs *et al.*, 2008; White, 2011). Among the teleosts, several studies have found that the scaling exponent of metabolic rate differed from 0.75 (Post & Lee 1996; Clark & Johnston, 1999; Bokma, 2004; Peck, 2004), which is in agreement with the present results. It is worth noticing that a lot of scaling studies in teleosts are based on routine or "resting" metabolic rate, rather than  $R_S$  or  $R_A$ . This is not directly comparable with the present results, but illustrates the interspecific variation in allometric scaling exponents among fishes. For instance, Moran & Wells (2007) found a scaling exponent of 0.90 for *S. lalandi*. Bokma (2004) examined intraspecific allometry for the sea trout *Salmo trutta trutta* in various life stages and found  $b_{RMR}$  to be 0.86. Indeed, lifestyle, swimming mode and environmental characteristics of the habitat are all known to modify metabolic rate, as well as the scaling exponent in fishes (Killen *et al.*, 2007, 2010). Previous studies have also found that  $b_{RA}$  was significantly different from  $b_{RS}$  (Brett & Glass, 1973; Weiser, 1985; Weibel *et al.*, 2004; Killen *et al.*, 2007), and this was true in *D. rerio* (Student's t-test  $t_{1.94}=4.475$ ,  $P<0.05$ ), which is also suggested by several studies. However,  $b_{RA}$  generally tends to be higher than  $b_{RS}$  (Weibel *et al.*, 2004; Killen *et al.*, 2007) while the opposite was observed in *D. rerio*, where  $b_{RA}<b_{RS}$ . This may, at least in part, reflect the fact that *D. rerio* is a domesticated species that has been reared in laboratory for many generations, whereas the study by Killen *et al.* (2007) was on individuals captured in wild. In conclusion, this study estimated the scaling exponent  $b$  across three life stages of *D. rerio* (5 dpf to 6 month old fish). This provides a basis for further experiments regarding the effects of environmental factors on aerobic metabolism in this species.

### **Acknowledgment**

The authors thank Didier Leguay and Michel Prineau, for their help during the experiment. All experiments were carried out at Ifremer (Plateforme d'Ecophysiologie des Poissons), La Rochelle station, France. This study was financially supported by the ANR project

ConPhyPoP (CES 09\_002) and JL received a doctoral grant of the Regional Council of Poitou-Charentes. This study was conducted under the approval of Animal Care Committee of France under the official licence of Marie-Laure Bégout (17-010).

## References

Barrionuevo, W. R. & Burggren, W. W. (1999). O<sub>2</sub> consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O<sub>2</sub>. *American Journal of Physiology* **276**, 505-513.

Bokma, F. (2004). Evidence against universal metabolic allometry. *Functional Ecology* **18**, 184–187.

Brett, J. R. (1964). The respiratory metabolism and swimming performance of young sockeye salmon. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **5**, 1183-1226.

Brett, J. R. & Glass, N. R. (1973). Metabolic rates and critical swim speeds of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Canadian Journal of Fisheries Research* **30**, 379–387.

Burggren, W. W. (2005). Developing animals flout prominent assumptions of ecological physiology. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* **141**, 430 – 439.

Cannas, M., Atzori, F., Rupsard, F., Bustamante, P., Loizeau, V., Lefrançois, C. (2012). PCB contamination does not alter aerobic metabolism and tolerance to hypoxia of juvenile sole (*Solea solea*). *Aquatic toxicology* **127**, 54-60.

Claireaux, G. & Lefrançois, C. (2007). Linking environmental variability and fish performance: integration through the concept of metabolic scope for activity. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B: Biological Sciences*. **362**, 2031–2041.

Clark, T. D., Donaldson, M. R., Pieperhoff, S., Drenner, S. M., Lotto, A., Cooke, S. J., Hinch, S. G., Patterson, D. A. & Farrell, A. P. (2012). Physiological benefits of being small in a changing world: responses of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) to an acute thermal

challenge and a simulated capture event. *PLOS ONE* **7**, e39079

Clarke, A. & Johnston, N. M. (1999). Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *Journal of Animal Ecology* **68**, 893–905.

Downs, C. J., Hayes, J. P. & Tracy, C. R. (2008). Scaling metabolic rate with body mass and inverse body temperature: a test of the Arrhenius fractal supply model. *Functional Ecology* **22**, 239–244.

Fry, F. E. J. (1947). The effects of the environment on animal activity. *University of Toronto studies. Biological series* **55**, 1-62.

Fry, F.E.J. (1971). The effect of environmental factors on the physiology of fish. In *Fish Physiology* Vol. VI (Hoar, W.S., Randall, D.J., eds.), pp. 1–98. New York, CA: Academic Press.

Glazier, D. S. (2005). Beyond the ‘3/4-power law’: variation in the intra- and interspecific scaling of metabolic rate in animals. *Biology Reviews* **80**, 611–662.

Glazier, D. S. (2006). The 3/4-power law is not universal: evolution of isometric, ontogenetic metabolic scaling in pelagic animals. *BioScience* **56**, 325–332.

Glazier, D. S. (2009c). Ontogenetic body-mass scaling of resting metabolic rate covaries with species-specific metabolic level and body size in spiders and snakes. *Comparative Biochemistry And Physiology - Part A* **153**, 403–407.

Gore, M. & Burggren, W. W. (2012). Cardiac and metabolic physiology of early larval zebrafish (*Danio rerio*) reflects parental swimming stamina. *Frontiers in Aquatic Physiology*, 3-35.

Hemmingsen, A. M. (1960). Energy metabolism as related to body size and respiratory surfaces, and its evolution. *Report of the Steno Memorial Hospital Nordisk Insulinlaboratorium* **9**, 1–110.

- Johansen, J. L. & Jones, G. P. (2011). Increasing ocean temperature reduces the metabolic performance and swimming ability of coral reef damselfishes. *Global Change Biology* **17**, 2971-2979.
- Jourdan-Pineau, H., Dupont-Prinet, A., Claireaux, G. & McKenzie, D. J. (2010). An investigation of metabolic prioritization in the European Sea Bass, *Dicentrarchus labrax*. *Physiological and Biochemical Zoology* **83**(1), 68-77.
- Killen, S. S., Costa, I., Brown, J. A. & Gamperl, A. K. (2007). Little left in the tank: metabolic scaling in marine teleosts and its implications for aerobic scope. *Proceeding of the Royal Society B* **274**, 431-438.
- Killen, S. S., Atkinson, D. & Glazier, D. S. (2010). The intraspecific scaling of metabolic rate with body mass in fishes depends on lifestyle and temperature. *Ecology Letters* **13**, 184-193.
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B. & Schilling, T. F. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental dynamics* **203**, 253-310.
- Kleiber, M. (1932). Body size and metabolism. *Hilgardia* **6**, 315-353.
- Lefrançois, C. & Claireaux, G. (2003). Influence of ambient oxygenation and temperature on metabolic scope and scope for heart rate in the common sole *Solea solea*. *Journal of Experimental Biology* **259**, 273-284.
- Lawrence, C. (2007). The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. *Aquaculture* **269**, 1-20.
- Marit, J. S. & Weber, L. P. (2011). Acute exposure to 2,4-dinitrophenol alters zebrafish swimming performance and whole body triglyceride levels. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C* **154**, 14-18.
- Marit, J. S. & Weber, L. P. (2012). Persistent effects on adult swim performance and energetics in zebrafish developmentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Aquatic Toxicology* **106**, 131-139.

Miklosi, A. & Andrew, R. J. (2006). The Zebrafish as a Model for Behavioral Studies. *Zebrafish* **3**, 227-234.

Moran, D. & Wells, R. M. G. (2007). Ontogenetic scaling of fish metabolism in the mouse-to-elephant mass magnitude range. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* **148**, 611–620.

Peck, A., Clemmensen, C. & Herrmann, J. P. (2005). Ontogenic changes in the allometric scaling of the mass and length relationship in *Sprattus sprattus*. *Journal of Fish Biology* **66**, 882–887.

Plaut, I. & Gordon, M. S. (1994). Swimming metabolism of wild-type and cloned zebrafish *Brachydanio rerio*. *Journal of Experimental Biology* **194**, 209-223.

Plaut, I. (2000). Effects of fins size on swimming performance, swimming behaviour and routine activity of zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Experimental Biology* **203**, 813-820.

Post, J. R. & Lee, J. A. (1996). Metabolic ontogeny of teleost fishes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **53**, 910–923.

Priede, I. G. (1985). Metabolic scope in fish. In: *Fish energetics: new Perspectives* ( Tyler P. & Calow P., eds), pp. 33-64. London, UK: Croom Helm.

Schurmann, H. & Steffensen, J. F. (1997). Effects of temperature, hypoxia and activity on the metabolism of juvenile Atlantic cod. *Journal of Fish Biology* **50**, 1166–1180.

Steffensen, J.F. (1989). Some errors in respirometry of aquatic breathers: how to avoid and correct for them. *Fish Physiology and Biochemistry* **6**, 49–59

Steffensen, J. F., Bushnell, P. G. & Schurmann, H. (1994). Oxygen consumption in four species of teleosts from Greenland: no evidence of metabolic cold adaptation. *Polar Biology* **14**, 49-54.

Weibel, E. R., Bacigalupe, L. D., Schmidt, B. & Hoppeler, H. (2004). Allometric scaling of maximal metabolic rate in mammals: muscle aerobic capacity as determinant factor. *Respiratory Physiology & Neurobiology* **140**, 115–132.

Weiser, W. (1985). Developmental and metabolic constraints of the scope for activity in young rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of Experimental Biology* **118**, 133–142.

White, C. R., Phillips, N. F. & Seymour, R. S. (2006). The scaling and temperature dependence of vertebrate metabolism. *Biology Letters*, **2**, 125–127.

White, C. R. (2011). Allometric estimation of metabolic rates in animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A* **158**, 346–357.

White, C. R. & Seymour, R. S. (2011). Physiological functions that scale to body mass in fish. In *Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment*, vol. 3 (A. P. Farrell, eds), pp. 1573-1582. San Diego, Academic Press

Zar, J. H. (1984) *Biostatistical analysis*, 2nd edn. Prentice Hall, New Jersey





### Annexe 3 : Dosages des HAP pyrolytiques et pétrogéniques lourd dans l'aliment pour chaque traitement testé. D'après Vignet et al. (submitted)

	Molecular weight (g.mol <sup>-1</sup> )	Pyrolytic PY			Petrogenic HO				
		Solvent	0.3X	1X	3X	Solvent	0.3X	1X	3X
naphthalene	128	6 ± 6	15 ± 7	56 ± 14	157 ± 74	4 ± 1	37 ± 6	120 ± 16	405 ± 73
acenaphthylene	152	1 ± 0	11 ± 2	35 ± 6	114 ± 23	1 ± 0	3 ± 1	3 ± 1	13 ± 13
acenaphthene	154	2 ± 1	14 ± 12	29 ± 7	89 ± 24	27 ± 26	46 ± 23	74 ± 19	190 ± 17
fluorene	166	2 ± 1	14 ± 3	42 ± 8	137 ± 28	2 ± 1	34 ± 2	99 ± 8	312 ± 25
dibenzo[b,c]thiophene	184	2 ± 3	11 ± 1	34 ± 5	102 ± 26	0 ± 0	54 ± 3	166 ± 11	546 ± 54
phenanthrene	178	8 ± 4	95 ± 21	291 ± 60	895 ± 213	6 ± 3	152 ± 7	418 ± 32	1279 ± 51
anthracene	178	1 ± 0	49 ± 13	159 ± 41	482 ± 165	0 ± 0	22 ± 1	70 ± 2	220 ± 10
fluoranthene	202	3 ± 3	130 ± 28	523 ± 182	1782 ± 353	2 ± 1	17 ± 1	44 ± 2	145 ± 18
pyrene	202	3 ± 3	112 ± 24	447 ± 160	1496 ± 311	1 ± 0	80 ± 3	227 ± 19	709 ± 64
benzo[a]anthracene	228	1 ± 0	171 ± 75	581 ± 221	1671 ± 763	0	57 ± 4	172 ± 11	543 ± 29
triphenylene + chrysenes	228	1 ± 0	215 ± 91	744 ± 290	2144 ± 1032	ND	108 ± 8	336 ± 21	1073 ± 79
benzo[b]naphtho[2,1-c]thiophene	234	5 ± 3	52 ± 26	156 ± 70	472 ± 230	0	56 ± 4	186 ± 8	573 ± 36
benzo[b]fluoranthene+benzo[k]fluoranthene+benzo[j]fluoranthene	252	2 ± 1	273 ± 72	868 ± 220	2740 ± 674	2,4	32 ± 2	110 ± 8	363 ± 18
benzo[e]pyrene	252	1 ± 0	109 ± 29	346 ± 86	1084 ± 286	ND	56 ± 3	173 ± 11	536 ± 26
benzo[a]pyrene	252	1 ± 0	118 ± 33	373 ± 95	1168 ± 346	0 ± 0	ND	108 ± 6	342 ± 10
benzo[ghi]perylene	252	1 ± 0	37 ± 9	121 ± 27	390 ± 83	0 ± 0	ND	56 ± 4	172 ± 14
indeno[1,2,3-cd]pyrene	276	0 ± 0	123 ± 41	349 ± 89	1188 ± 265	ND	ND	ND	ND
dibenz[ah]anthracene + dibenz[ac]anthracene	276	2 ± 2	32 ± 11	108 ± 43	301 ± 106	0,3	ND	34 ± 2	113 ± 6
benzo[ghi]perylene	276	0 ± 0	87 ± 27	268 ± 67	893 ± 191	0 ± 0	ND	146 ± 10	481 ± 12
<b>Sum PAHs</b>		<b>34 ± 6</b>	<b>1670 ± 448</b>	<b>5532 ± 1383</b>	<b>17305 ± 4798</b>	<b>39 ± 30</b>	<b>880 ± 28</b>	<b>2558 ± 169</b>	<b>8082 ± 305</b>
2-methylnaphthalene		8 ± 9	15 ± 3	43 ± 8	116 ± 39	4 ± 1	137 ± 13	396 ± 32	1259 ± 118
1-methylnaphthalene		4 ± 6	8 ± 2	22 ± 5	62 ± 21	2 ± 0	86 ± 8	261 ± 20	854 ± 84
<b>Sum methylnaphthalenes</b>		<b>12 ± 15</b>	<b>23 ± 5</b>	<b>65 ± 13</b>	<b>178 ± 60</b>	<b>6 ± 2</b>	<b>223 ± 20</b>	<b>657 ± 52</b>	<b>2113 ± 201</b>
3-methylphenanthrene		2 ± 1	17 ± 3	47 ± 11	149 ± 31	1 ± 0	126 ± 24	326 ± 47	934 ± 160
2-methylphenanthrene		2 ± 0	19 ± 5	60 ± 13	175 ± 41	1 ± 0	149 ± 11	400 ± 28	1172 ± 166
2-methylantracene		0 ± 0	8 ± 2	25 ± 6	78 ± 18	ND	ND	ND	409 ± 32
9-methylphenanthrene + 2-methylantracene		1 ± 0	14 ± 4	49 ± 12	165 ± 56	1 ± 0	137 ± 20	360 ± 85	990 ± 206
1-methylphenanthrene		1 ± 0	12 ± 3	37 ± 11	100 ± 28	0 ± 0	73 ± 8	227 ± 15	617 ± 71
<b>Sum methylphenanthrenes</b>		<b>7 ± 3</b>	<b>70 ± 15</b>	<b>218 ± 41</b>	<b>668 ± 157</b>	<b>2 ± 2</b>	<b>530 ± 34</b>	<b>1448 ± 144</b>	<b>4122 ± 581</b>
<b>Total PAHs</b>		<b>55 ± 12</b>	<b>1763 ± 468</b>	<b>5816 ± 1433</b>	<b>18151 ± 4983</b>	<b>47 ± 33</b>	<b>1633 ± 71</b>	<b>4663 ± 360</b>	<b>14317 ± 813</b>



### Annexe 4 : Tableau des dosages de métabolites pour les mélanges de HAP pyrolytique et pétrogénique.

(Concentration des métabolites en ng.g<sup>-1</sup> de larves)

	exposition	SUMOHNaph	2 OHBi	SUMOHPhé	3OHFluo	1 OHPyr	1 OHChrys	SUMOHBaP	SUMOH-HAP
Pyrolytic (PY) - Larvae 15 days F <sub>0</sub>	Control	nd	<blank	<blank	nd	2,4	nd	nd	2
		nd	<blank	<blank	nd	1,9	nd	nd	2
		nd	<blank	<blank	nd	1,8	nd	nd	2
	0,3X	nd	<blank	<blank	nd	7,8	nd	nd	8
		nd	<blank	0,1	nd	6,3	nd	nd	6
		nd	<blank	0,5	nd	6,7	nd	nd	7
	1X	1,4	<blank	0,5	nd	16,4	1,1	14,7	34
		<blank	13,9	1,0	nd	14,5	1,9	6,8	38
		nd	10,1	1,0	nd	15,0	nd	5,8	32
	3X	<blank	11,4	0,7	nd	70,8	nd	33,9	117
		nd	31,8	1,5	nd	91,5	nd	35,3	160
		nd	5,0	0,7	nd	90,7	nd	34,7	131
Petrogenic (HO) - Larvae 15 days F <sub>0</sub>	Control	nd	<blank	<blank	nd	2,5	nd	nd	3
		nd	3,7	<blank	nd	1,8	nd	nd	5
		nd	0,9	<blank	nd	2,2	nd	nd	3
	0.3X	0,9	4,4	0,4	nd	4,9	nd	nd	11
		nd	2,9	<blank	nd	5,2	nd	nd	8
		nd	2,0	<blank	nd	2,7	nd	nd	5
	1X	<blank	20,2	0,3	nd	5,5	1,1	2,3	29
		nd	14,6	0,4	nd	3,8	nd	2,6	21
		nd	83,1	<blank	nd	7,7	nd	nd	91
	3X	0,8	26,0	0,1	nd	18,0	nd	9,1	54
		1,2	<blank	2,1	nd	26,5	nd	21,8	52
		0,9	<blank	0,2	nd	10,1	nd	10,1	21
Pyrolytic (PY) - Larvae 5dpp from the progeny F <sub>1</sub>	Control	NC	NC	<blanc	NC	NC	NC	NC	NC
		15,1	11,9	<blanc	nd	2,1	nd	nd	29
		30,7	33,5	1,0	nd	2,4	nd	nd	68
	0.3X	20,9	5,9	<blanc	nd	1,9	nd	nd	29
		26,0	10,5	0,9	nd	6,8	nd	nd	44
		16,3	8,4	0,2	nd	2,2	nd	nd	27
	1X	5,6	5,8	<blanc	nd	2,0	nd	nd	13
		10,1	7,5	<blanc	nd	3,7	nd	nd	21
		9,7	14,4	<blanc	nd	0,2	nd	nd	24
	3X	13,8	24,4	<blanc	nd	1,9	nd	nd	40
		50,8	38,7	<blanc	nd	1,4	nd	nd	91
		28,9	16,1	<blanc	nd	1,6	nd	nd	47

n.d non détecté, <blanc : quantification non significative par rapport au blanc protocole, NC non communiqué.

Sum OHNaph : sum Hydroxynaphtalène (1+2 OHNaph)
2OHBi : 2 Hydroxybiphényle
Somme OHPhe : somme Hydroxyphénanthrène (1+2+3+4+9 OHPhe)
3OHFluo : 3 Hydroxyfluoranthène
1OHPyr : 1Hydroxypyrene
1OHChrys : 1 hydroxychrysène
Somme OHBaP : somme Hydroxybenzo(a)pyrène (3+9 OHBaP)

**Annexe 5 : Tableau récapitulatif de variables de réponse de fuite mesurée  
chez 17 espèces de poisson. D'après Domenici & Blake 1997**

Author	Species	Common name	Fast-start type	Temperature (°C)	Method†	Maximum acceleration (m s <sup>-2</sup> )	Maximum velocity (L s <sup>-1</sup> )	Duration (ms)	Body length, L (cm)
Weihls (1973)	<i>Oncorhynchus</i>	Rainbow trout	ER	?	40	40	–	–	33
Webb (1975)	<i>mykiss</i>	"	ER	15	64	42.1	8.5	78	14.3
Webb (1976)	"	"	ER	15	64	33.2	15.9	71	9.6
"	"	"	ER	15	64	32.1	8.1	74	15.0
"	"	"	ER	15	64	32.3	8.2	78	20.4
"	"	"	ER	15	64	31.7	7.1	84	24.5
"	"	"	ER	15	64	36.2	6.1	96	29.6
"	"	"	ER	15	64	34.6	5.3	100	34.6
"	"	"	ER	15	64	40.6	7.4	100	38.7
Webb (1977)	"	"	ER	15	250	26.6	8.3	109	17.4
Webb (1978b)	"	"	ER	5	250	16	7.4	116	13.6
"	"	"	ER	10	250	31	11.0	98	13.6
"	"	"	ER	15	250	41	12.5	79	13.6
"	"	"	ER	20	250	40	12.5	68	13.6
"	"	"	ER	25	250	41	12.5	65	13.6
Webb (1978a)	"	"	ER	15	250	32.6	8.1	114	19.5
Harper and Blake (1990)	"	"	ER	15–20	ACC	59.7	8.7	125	31.8
Gamperl <i>et al.</i> (1991)	"	"	ER	10	200	19.8*	13.7*	74*	9.5
"	"	"	ER	10	200	18.2§	14.1§	77§	9.5
Weihls (1973)	<i>Esox</i> sp.	Pike	ER	?	40	50	–	–	?
Webb (1978a)	"	"	ER	15	250	39.5	7.2	115	21.7
Harper and Blake (1991)	"	"	ER	15–20	ACC	120.2	10.5	108	37.8
Harper and Blake (1991)	"	"	FS	15–20	ACC	95.9	8.2	133	37.8
Frith and Blake (1991)	"	"	ER	10–14	250	151.3‡	8.7‡	129‡	40
Rand and Lauder (1981)	"	"	FS	21	200	–	9.0	92	27.3
Webb (1986b)	"	"	ER	15	60	–	21.0	–	6.5
Domenici and Blake (1991)	<i>Pterophyllum</i> sp.	Angelfish	ER	24–26	400	79.0	17.8	36	7.3
Domenici and Blake (1993b)	"	"	ER	24–26	400	93.2	27.3	30	4.9
"	"	"	ER	24–26	400	78.9	18.9	34	7.3
"	"	"	ER	24–26	400	114.7	13.6	36	10.9
"	"	"	ER	24–26	400	109.4	9.3	46	13.5
Kasapi <i>et al.</i> (1993)	<i>Xenomystus nigri</i>	Knifefish	ER	24–25	400	127.9	12.9	32	11.3
Beddow <i>et al.</i> (1995)	<i>Myoxocephalus</i>	Short-horned sculpin	FS	5 (5)	200	16.2	3.3	183	24
"	<i>scorpio</i>	"	FS	10 (5)	200	17.0	3.5	173	24
"	"	"	FS	15 (5)	200	18.4	4.1	152	24
"	"	"	FS	15 (15)	200	22.0	5.4	96	24
Webb (1975)	<i>Lepomis cyanellus</i>	Green sunfish	ER	15	64	15.7	8.4	79	8
Webb (1978a)	<i>Perca flavescens</i>	Yellow perch	ER	15	250	23.9	7.4	103	15.5
"	<i>Notropis cornutus</i>	Common shiner	ER	15	250	28.7	10.7	78	10.7
"	<i>Cottus cognatus</i>	Slimy sculpin	ER	15	250	22.7	9.4	81	8.2
"	<i>Etheostoma caeruleum</i>	Rainbow darter	ER	15	250	32.3	14.4	56	6.2
Webb (1986b)	<i>Micropterus salmoides</i>	Largemouth bass	ER	15	60	–	18.8	–	5.1
Webb (1986b)	<i>Pimepales promelas</i>	Fathead minnow	ER	15	60	–	14.0	–	5.8
Webb (1986b)	<i>Lepomis macrochirus</i>	Bluegill sunfish	ER	15	60	–	15.8	–	6.4
Webb (1978a)	"	"	ER	15	250	28.8	8.5	88	15.3
Dubois <i>et al.</i> (1976)	<i>Pomotamus saltatrix</i>	Bluefish	ER	?	ACC	20.6‡	4.0‡	210	63

Duration corresponds to the sum of stages 1 and 2, over which maximum velocity and maximum acceleration were calculated.

ER, escape response; FS, feeding strike; ?, data not reported; temperatures in parentheses denote acclimation temperature; †filming rate (Hz) or accelerometry (ACC); ‡calculated mean value; §fish were subject to a training protocol; \*fish were not subject to a training protocol.







## **Intégrité fonctionnelle du poisson zèbre *Danio rerio* exposé à des concentrations sublétales d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP)**

### **Résumé**

L'anthropisation croissante des zones côtières induit le rejet dans les écosystèmes aquatiques d'Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP). En plus de la concentration et de la voie de contamination considérée, leurs effets dépendent du stade de développement de l'organisme. Dans ce contexte, l'objectif de cette étude était d'évaluer les effets d'une contamination par voie trophique à des concentrations sublétales de HAP sur une espèce modèle, le poisson zèbre *Danio rerio*. Deux types de mélanges de HAP, pyrolytique et pétrogénique, représentatifs de ce qui est rencontré en milieu contaminé ont été testés via des expositions chroniques. Au niveau individuel, les réponses biologiques ont été évaluées au travers de performances physiologiques considérées comme des mesures indirectes de la fitness : la capacité métabolique aérobie, les performances de nage et la réponse de fuite. A l'échelle sub-individuelle, l'exposition aux HAP a été évaluée sur le cœur via la mesure du rythme cardiaque. Ces paramètres biologiques ont été mesurés (i) à différents temps d'exposition des poissons ainsi que (ii) sur leur descendance dans le but d'évaluer l'effet parental de la contamination. Les résultats mettent en évidence une diminution de la capacité métabolique aérobie chez la descendance de poisson contaminés aux HAP d'origine pyrolytique. Chez les poissons adultes directement exposés aux HAP de type pétrogénique, une réduction de la capacité métabolique a également été observée associée à une réduction de la vitesse de nage critique. Cette étude contribuera à établir une vision globale des effets de l'exposition aux HAP et à mieux comprendre les mécanismes régulant des fonctions biologiques clés dans la survie d'un organisme tout au long de son cycle de vie.

*Mots clés* : capacité métabolique aérobie, rythme cardiaque, performances de nage, réponse de fuite, hydrocarbures aromatiques polycycliques, voie trophique, *Danio rerio*,

---

## **Functional integrity in zebrafish *Danio rerio* exposed to sub-lethal concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)**

### **Abstract**

The increase of anthropogenic activities on coastal areas induces discharges of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic ecosystem. PAHs effects depend on their concentration and the way of contamination, but also on the different developmental stages of the organism. In this context, the aim of our study was to observe the effects of an exposure to two PAHs mixes, pyrolytic and petrogenic, on the model species zebrafish *Danio rerio*. These chronicle exposures at sub-lethal concentrations were representative of contaminated areas. Biological responses of fish were estimated at individual levels through the assessment of aerobic metabolic scope, swimming and escape performance, which are considered to be relevant indirect measures of the fitness. Furthermore, measurements of cardiac frequency allowed observing PAHs impairments at sub-individual levels. These physiological performances were estimated (i) a several times of exposure (i.e. from 2-months juveniles to 6-months adults) and (ii) on their progeny, in order to observe parental effect of the PAHs exposure. An increase of aerobic metabolic scope was observed on the progeny of fish contaminated by pyrolytic mix. Regarding petrogenic PAHs exposure, the increase of aerobic metabolic scope was associated to increase of critical swimming speed in adults. This study will contribute to establishing a global vision of PAHs exposure impairments and to a better understanding of the regulating mechanisms of the main biological functions on which organism survival depends.

*Key words* : aerobic metabolic scope, cardiac frequency, swimming performance , escape response, polycyclic aromatic hydrocarbons, trophic exposure, *Danio rerio*,