

Développement de tests embryonnaires prédictifs d'effets toxiques précoces et tardifs pour des molécules hydrophobes

Prescilla Perrichon

► To cite this version:

Prescilla Perrichon. Développement de tests embryonnaires prédictifs d'effets toxiques précoces et tardifs pour des molécules hydrophobes. Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2014. Français. NNT: 2014LAROS040. tel-01349706

HAL Id: tel-01349706 https://theses.hal.science/tel-01349706

Submitted on 30 Jun 2017 $\,$

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 Gay LUSSAC

Sciences pour l'Environnement

IFREMER – LABORATOIRE D'ÉCOTOXICOLOGIE de L'HOUMEAU

UMR 7266 – LITTORAL, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉS (LIENSs)

Développement de tests embryonnaires prédictifs d'effets toxiques précoces et tardifs pour des molécules hydrophobes

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenance prévue le : ²¹ Février 2014

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

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

Par

Prescilla PERRICHON

JURY :

Alain GEFFARD Patrice GONZALEZ Farida AKCHA Stéphane LE FLOCH Catherine MOUNEYRAC Paco BUSTAMANTE Professeur, Université de Reims, Rapporteur Chargé de Recherche, HDR, Université de Bordeaux 1, Rapporteur Cadre de Recherche, Ifremer Nantes, Examinateur Cadre Scientifique, *Cedre*, Brest, Examinateur Professeur, Université Catholique de l'Ouest, Examinateur Professeur, Université de La Rochelle, Directeur de thèse



TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ABRÉVIATIONS	I
LISTE DES FIGURES	III
LISTE DES TABLEAUX	VII
AVANT DDODOS	1
	1
VALORISATION SCIENTIFIQUE	
INTRODUCTION GENERALE	9
1. REGLEMENTATION LIEE A L'EVALUATION DE LA TOXICITE D'UNE SUBSTANCE CHIMIC	QUE 12
1.1. Cadre réglementaire	
1.2. Principe éthique de l'expérimentation animale	
2. LES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES	
2.1. Caractéristiques physico-chimiques	20
2.2. Origines et sources dans l'environnement	23
2.3. Empreintes moléculaires	
2.4. Devenir et biodisponibilité des HAP dans l'environnement aquatique	
2.5. Bioaccumulation des HAP chez les poissons	
2.6. Biotransformation des HAP	
3. TOXICITE DES HAP	
4. MODELE BIOLOGIQUE : LE POISSON ZEBRE	
4.1. Présentation du modèle	
4.2. Choix et intérêts du modèle en écotoxicologie	
4.3. Cycle de développement du poisson zèbre	40
5. APPROCHE MULTIBIOMARQUEURS/MULTIECHELLES	
5.1. Biomarqueurs: des outils pour l'évaluation des risques toxicologiques	42
5.2. Choix des marqueurs d'évaluation toxique des HAP	44
6. OBJECTIFS DE LA THESE	49
CHAPITRE I - MATÉRIELS ET MÉTHODES	53
1. MAINTENANCE ET PRODUCTION D'ŒUFS DE POISSON ZEBRE	55
1.1. Maintenance de l'élevage	55
1.2. Production des œufs	55
2. EXPOSITION PAR SEDIMENT CONTACT	
2.1. Enrobage des sédiments avec des HAP individuels	
2.2. Caractérisation chimique des sédiments enrobés	57
2.3. Exposition embryo-larvaire par sédiment contact	57
3. EXPOSITION PAR WAF DE PETROLE	58
3.1. Préparation d'une WAF	58
3.2. Dosage des composés dissous par SPME	59
3.3. Exposition embryo-larvaire	62
4. EXPOSITION PAR VOIE TROPHIQUE / ETUDE DE LA DESCENDANCE	
4.1. Analyses chimiques	62

	4.2.	Extraction des fractions aromatiques	63
	4.3.	Purification et caractérisation des fractions aromatiques	63
	4.4.	Enrobage de l'aliment aux fractions aromatiques	64
	4.5.	Exposition de la génération parentale (F ₀)	65
	4.6.	Production et récolte de la descendance (Génération F ₁)	66
5.	ANA	LYSES DE PARAMETRES BIOLOGIQUES	67
	5.1.	Survie et éclosion	67
	5.2.	Malformations et analyses biométriques (96 hpf)	68
	5.3.	Réponse PhotoMotrice (120 hpf)	70
	5.4.	Rythme cardiaque (120 hpf)	71
	5.5.	Activité enzymatique EROD (96 hpf)	73
	5.6.	Dommages à l'ADN par le test Comète	74
	5.7.	Expressions de gènes cibles par q-PCR	78
	5.8.	Dosage des métabolites de HAP dans les larves	83

CHAPITRE II - STANDARDISATION D'UNE EXPOSITION PAR VOIE SÉDIMENTAIRE (FABRICATION D'UN SÉDIMENT ARTIFICIEL ET COMPARAISON DES RÉPONSES

INTERI	ESPÈCES)	
ARTI	CLE 1 : DEVELOPMENT OF A REFERENCE ARTIFICIAL SEDIMENT FOR	CHEMICAL TESTING
ADAP	TED TO THE MELA SEDIMENT CONTACT ASSAY	
ABST	RACT	
1. I	INTRODUCTION	
2. I	MATERIALS AND METHODS	
2.1.	. Chemicals	
2.2.	. Artificial reference sediment preparation and spiking	
2.3.	PAH chemical analysis of artificial sediment	
2.4.	. Exposure	
2.5.	. Oxygen monitoring	
2.6.	. Biological parameters	
2.7.	. Statistical analyses	
3. I	RESULTS	
3.1.	. Selection of suitable sand particle size	100
3.2.	. Selection of suitable clay concentration	102
3.3.	. Selection of suitable peat concentration	105
3.4.	. Validation of the artificial sediment using BaA and BaP	
4. I	DISCUSSION	
5. (Conclusion	
Ackn	IOWLEDGMENTS	

ARTICLE 2 : COMPARATIVE SENSITIVITY OF EMBRYO-LARVAL TOXICITY ASSAY WITH ZEBRAFISH (DANIO RERIO) AND JAPANESE MEDAKA (ORYZIAS LATIPES) FOLLOWING SEDIMENT CONTACT ASSAY 113 ABSTRACT 114 1. INTRODUCTION 115 2. MATERIALS AND METHODS 117 2.1. Chemicals 117 2.2. Preparation of spiked artificial sediment

2.3.	PAH chemical analysis of artificial sediment	118
2.4.	Zebrafish embryo-larval assays	
2.5.	Medaka embryo-larval assay	122
2.6.	Statistical analysis	123
3. Rest	Л.T.S	
3.1.	Chemical analysis of spiked sediments	123
3.2.	Zebrafish embryo-larval assay	
3.3.	ELS PhotoMotor Response	129
4. Disc	USSION	
5. Con	CLUSION	
ACKNOW	LEDGMENTS	

ABSTRAC	Γ	
1. INTR	I. INTRODUCTION	
2. MAT	MATERIALS AND METHODS	
2.1.	Maintenance and egg production of zebrafish	
2.2.	Experimental procedure	149
2.3.	WAF compounds analysis	150
2.4.	Biological analysis	153
3. Rest	JLTS	
3.1.	Chemical analysis	159
3.2.	Teratogenic analysis	
3.3.	Behavioral and physiological analyses	165
3.4.	Molecular analysis	167
3.5.	Gene expressions	169
3.6.	PAH-metabolites analysis	170
4. Disc	CUSSION	
4.1.	Chemical assessment of Water-Accommodated Fractions	
4.2.	Teratogenic assessment	
4.3.	Behavioral toxicity assessment	175
4.4.	Cardiotoxicity assessment	177
4.5.	Genotoxicity assessment	
4.6.	Detoxification and antioxidant defenses assessment	
ACKNOW	LEDGEMENTS	

ABSTRAC	Τ	
1. INTE	ODUCTION	
2. MAT	erials and Methods	
2.1.	Chemicals	
2.2.	Preparation of PAHs-contaminated food	
2.3.	Experimental procedure	

2.4.	Biological analysis	
3. Resu	JLTS AND DISCUSSION	
3.1.	Morphological impairments in offspring larvae (F1 generation)	
3.2.	Behavioral disruptions in offspring larvae (F1 generation)	
3.3.	Physiological disruptions in offspring larvae (F1 generation)	
3.4.	Genotoxic effects in offspring larvae (F ₁ generation)	
4. Con	CLUSION	
ACKNOWI	LEDGMENTS	

CONCLUSION GÉNÉRALE / PERSPECTIVES 219		
1. Co	DNCLUSION GENERALE	
1.1.	Voies d'exposition : synthèse et pertinence	222
1.2.	Outils d'évaluation de la toxicité : pertinence et limites	
2. PE	RSPECTIVES	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DéoxyriboNucléique
AChE	AcétylCholine Estérase
AhR	Récepteur Aryl Hydrocarbone
ANOVA	Analyse de Variance
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messager
ARNT	ARN transférase
BAL	Brut Arabian Light
CAT	Catalase
CEDRE	Centre de Documentation, de Recherche et d'Expérimentations sur les
	pollutions accidentelles des eaux
ConPhyPoP	Contamination et Physiologie de Poissons exposés aux Polluants
CROSSERF	« Chemical Response to Oil SpillS : Ecological Research Forum »
Cyp1a	Cytochrome P450 1A
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DCM	Dichlorométhane
ECETOC	« European Centre for Ecotoxicology and Toxicolgy Of Chemicals »
ELS	« Early Life-Stage »
EPOC	Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux
EROD	7-éthoxyrésorufine-o-dééthylase
FET	« Fish Embryo-Test »
FEET	« Fish EleutheroEmbryo-Test »
GC	Chromatographie Gazeuse
GST	Glutathion-S-Transférase
Gpx	Glutathion péroxydase
НАР	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique (PAH)
HFO	« Heavy Fuel Oil »
HMW	Haut poids moléculaire (« High Molecular Weight »)
hpf	heure post-fécondation
Ifremer	Institut français pour l'exploitation de la mer
INERIS	Institut National de l'EnviRonnement Industriel et des riSques

jpf	jour post-fécondation (dpf)
K _{oc}	Coefficient de partage carbone organique/eau
K _{ow}	Coefficient de partage n-octanol/eau
K _p	Coefficient de partage sédiment/eau
LC	Chromatographie Liquide
LPTC	Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'environnement
LMW	Faible poids moléculaire (« Low Molecular Weight »)
MELA	Medaka Embryo-Larval Assay
MS	Spectrométrie de Masse
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Économique
PCB	PolyChloroBiphényle
PDMS	PolyDiMéthylSiloxane
POP	Polluant Organique Persistant
PMR	Réponse PhotoMotrice (« PhotoMotor Response »)
РҮ	Pyrolytique
REACH	« Registration Evaluation Authorization of Chemicals »
ROS	Espèce Réactive de l'Oxygène (« Reactive Oxygen Species »)
SOD	Supéroxyde Dismutase
SPME	MicroExtraction sur Phase Solide (« Solid Phase MicroExtraction »)
UDPGT	Uridine DiPhosphate GlucuronylTransférase
US-EPA	Agence de Protection Environnementale des Etats-Unis
WAF	«Water-Accommodated Fraction »
WSF	« Water-Soluble Fraction »
XRE	« Xenobiotic Regulatory Element »

LISTE DES FIGURES

AVANT-PROPOS

$FIGURE \ 1. \ Liste \ des \ partenaires \ impliques \ au \ sein \ du \ projet \ ANR \ ConPhyPoP. \dots 2$
FIGURE 2. SCHEMA RESUMANT LES DIFFERENTES TACHES (T) DU PROJET CONPHYPOP
INTRODUCTION
FIGURE 3. STRUCTURE CHIMIQUE DES HAP. 21
Figure 4. Relation schematique entre la presence, la biodisponibilite d'un
CONTAMINANT DANS L'ENVIRONNEMENT, SA BIOACCUMULATION ET SA TOXICITE DANS UN
ORGANISME BIOLOGIQUE
$Figure \ 5. \ Biotransformation \ \text{metaboliques des HAP au sein d'un organisme expose}$
FIGURE 6. METABOLISATION DES HAP PAR LA VOIE DU RECEPTEUR AHR
FIGURE 7. PHOTO DU POISSON-ZEBRE, DANIO RERIO
FIGURE 8. SCHEMA RECAPITULATIF DES GRANDES ETAPES DE DEVELOPPEMENT DU POISSON
ZEBRE EN RELATION AVEC LES STADES REGULES OU NON PAR L'UE ET LA DUREE DES TESTS
STANDARDS DE TOXICITE
FIGURE 9. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'APPROCHE INTEGREE MENEE DANS LE CADRE
DE CETTE THESE, RELIANT LA PERTINENCE ECOLOGIQUE, LA SENSIBILITE ET LES TEMPS DE
REPONSE DES INDICATEURS D'EVALUATION TOXIQUE ET LES CIBLES AFFECTEES PAR UN
XENOBIOTIQUE
FIGURE 10. REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'APPROCHE INTEGREE UTILISANT LES STADES
PRECOCES DE DEVELOPPEMENT DU POISSON ZEBRE DANS UN CONTEXTE D'EVALUATION DES
RISQUES CHIMIQUES

CHAPITRE I - MATERIELS ET METHODES

FIGURE 11. DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE LA PREPARATION D'UNE « WATER-ACCOMMODATEI
FRACTION » WAF
FIGURE 12. CHROMATOGRAMME DES COMPOSES FLUORANTHENE ET PYRENE ET LEURS
DEUTERES ASSOCIES ISSU DE L'ANALYSE EN GC/MS
FIGURE 13. SCHEMA EXPERIMENTAL DE LA DISTRIBUTION DES CLASSES DE TAILLE DE
GRANULES AGE DEPENDANT DES ORGANISMES
FIGURE 14. EXEMPLES DE MALFORMATIONS SUBLETALES POUVANT ETRE OBSERVEES CHEZ UNI
LARVE DE 96 HPF
FIGURE 15. DISPOSITIF EXPERIMENTAL DE L'ANALYSE DE PMR DE LARVES 120 HPF71
FIGURE 16. ILLUSTRATION D'UNE PHOTOGRAPHIE INTEGREE DANS IMAGEJ
FIGURE 17. SCHEMA RECAPITULATIF DES PRINCIPALES ETAPES DU TEST COMETE
FIGURE 18. REPRESENTATION D'UNE CELLULE COMETE ET SES NIVEAUX D'ENDOMMAGEMENT
APRES REVELATION AU GEL \mathbb{R} ED TM
FIGURE 19. PRINCIPALES ETAPES D'UNE RETRO-TRANSCRIPTION (RT)
FIGURE 20. PRINCIPE DE LA PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL

CHAPITRE II - STANDARDISATION D'UNE EXPOSITION PAR VOIE SEDIMENTAIRE

$Figure \ 21. \ Demarche \ experimentale \ conduisant \ a \ la \ fabrication \ d'un \ sediment$
ARTIFICIEL EN VUE DE STANDARDISER LES TESTS DE TOXICITE EMBRYO-LARVAIRES DE
POISSON
FIGURE 22. HOW PARTICLES SIZE AFFECTS FLUO TOXICITY IN JAPANESE MEDAKA EMBRYOS
AND LARVAE (EXPERIMENT 1)
$FIGURE \ 23 \ \text{How clay content affects Fluo toxicity in Japanese medaka \ \text{embryos and} \\$
LARVAE (EXPERIMENT 2)
FIGURE 24 HOW PEAT CONTENT AFFECTS FLUO OR SOLVENT TOXICITY IN JAPANESE MEDAKA
EMBRYOS AND LARVAE (EXPERIMENT 3)106
FIGURE 25. FLUO TOXICITY IN JAPANESE MEDAKA EMBRYOS AND LARVAE FOR DIFFERENT PEAT
SEDIMENT CONTENT (EXPERIMENT 3)108
FIGURE 26. IN VIVO MEASUREMENT OF EROD ACTIVITY IN 96 HPF ZEBRAFISH LARVAE EXPOSED
TO BAP (A) AND FLUO (B) FOR DIFFERENT PEAT SEDIMENT CONTENTS
FIGURE 27. PMR MEASURED IN 120 HPF ZEBRAFISH LARVAE EXPOSED TO BAP
FIGURE 28. PMR MEASURED IN 120 HPF ZEBRAFISH LARVAE EXPOSED TO FLUO
FIGURE 29. PMR MEASURED IN 14 DPF JAPANESE MEDAKA LARVAE EXPOSED TO BAP AND
Fluo

CHAPITRE III - EVALUATION DE LA TOXICITE DE COMPOSES PETROLIERS

FIGURE 30. ZEBRAFISH EMBRYO-LARVAL VIABILITY AND HATCHING RATES ASSOCIATED IN (A
C) WAF BAL AND (B, D) WAF HFO EXPOSURES162
FIGURE 31. PMR MEASURED IN 120 HPF ZEBRAFISH LARVAE AFTER EXPOSURE TO (A) WAF
BAL AND (B) WAF HFO166
FIGURE 32. HEARTBEAT MEASURED IN 120 HPF ZEBRAFISH LARVAE AFTER EXPOSURE TO BOTH
WAFs BAL AND HFO
FIGURE 33. IN VIVO MEASUREMENT OF EROD ACTIVITY IN WAFS-EXPOSED LARVAE AT THE
EXPOSURE END
FIGURE 34. DNA STRAND BREAKS (% TAIL DNA) MEASURED IN 24 HPF ZEBRAFISH EMBRYOS
EXPOSED TO (A) WAF BAL AND (B) WAF HFO169
FIGURE 35. CONCENTRATIONS OF PAH-METABOLITES MEASURED IN LARVAE AT THE END OF
EXPOSURE (96 HPF) FOR (A) WAF BAL AND (B) WAF HFO

<u>Chapitre IV - Consequences d'une exposition trophique parentale sur la</u> <u>Descendance</u>

FIGURE 36 SUPPLEMENTARY DATA. A) PAHS AND ALKYLATED PAHS CONCENTRATIONS FOR
THREE AROMATICS FRACTIONS (PY, BAL, HFO) AND (B) THEIR RELATIVE PROPORTIONS.
FIGURE 37. HATCHING KINETIC IN 120 HPF OFFSPRING LARVAE ORIGINATING FROM (A) PY, (B)
BAL AND (C) HFO-EXPOSED GENITORS
FIGURE 38. BEHAVIORAL PERFORMANCE IN 120 HPF OFFSPRING LARVAE ORIGINATING FROM
(A) PY, (B) BAL AND (C) HFO-EXPOSED GENITORS FOLLOWING LIGHT/DARK
CHALLENGE

FIGURE 39. CARDIAC ACTIVITY IN 120 HPF OFFSPRING LARVAE FROM PY, BAL, HI	FO-EXPOSED
GENITORS.	
FIGURE 40. IN VIVO EROD ACTIVITY IN 96 HPF OFFSPRING LARVAE ORIGINATIN	g from PY,
BAL AND HFO-EXPOSED GENITORS.	
FIGURE 41. DNA STRAND BREAKS LEVELS IN 24 HPF OFFSPRING EMBRYOS ORIGIN	ATING FROM
(A) PY (N=4), (B) BAL (N=3) AND (C) HFO (N=3) EXPOSED GENITORS	

CONCLUSION GÉNÉRALE / PERSPECTIVES

FIGURE 42. ILLUSTRATION DE L'ADSORPTION DES PARTICULES FINES SEDIMENTAIRES SUR LE
Chorion des embryons de poisson zebre en condition A) 0 % de tourbe et B) 5 %
DE TOURBE
FIGURE 43. SYNTHESE DES REPONSES INDUITES PAR LES WAF DE PETROLES SUITE A UNE
EXPOSITION EMBRYO-LARVAIRE DE POISSON ZEBRE DURANT 96 HEURES
Figure 44. Analyse morphologique craniofaciale d'une larve Controle 120 ${\rm hpf}$
REVELANT LA CHONDRIFICATION ET L'OSSIFICATION BUCCALES ET PHARYNGIENNES (VUE
VENTRALE, X50)

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

TABLEAU 1. DONNEES ECOTOXICOLOGIQUES A PRODUIRE POUR L'ENREGISTREMENT DES
COMPOSES CHIMIQUES DANS LE CADRE DE LA REGLEMENTATION REACH
TABLEAU 2. ESSAIS REGLEMENTES ET COUTS ASSOCIES BASES LE PRINCIPE ETHIQUE DE
L'EXPERIMENTATION ANIMALE ET LES BONNES PRATIQUES DE LABORATOIRE16
TABLEAU 3. PRINCIPALES LIGNES DIRECTRICES POUR LES TESTS DE TOXICITE RECOMMANDES
PAR L'OCDE PRENANT EN CONSIDERATION LES STADES EMBRYO-LARVAIRES DE POISSONS.
TABLEAU 4. CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES HAP 22
TABLEAU 5. VALEURS DE QUELQUES INDICES MOLECULAIRES CARACTERISANT L'ORIGINE DES
HAP24

CHAPITRE I - MATERIELS ET METHODES

TABLEAU 6. LISTE DES COMPOSES DOSES EN SPME-GC/MS ET LES 19 ETALONS	INTERNES
DEUTERES POUR QUANTIFICATION.	60
TABLEAU 7. CONDITIONS D'EXTRACTION DES ECHANTILLONS.	63
TABLEAU 8. MALFORMATIONS SUBLETALES MESURES CHEZ LES LARVES DE 96 HPF BA	ASEES SUR
LAMMER ET AL. (2009)	68
TABLEAU 9. Solutions utilisees dans le cadre du test Comete.	75
TABLEAU 10. SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES POUR CHAQUE GENE D'INTERET A	AU COURS
DE L'ETUDE	

CHAPITRE II - STANDARDISATION D'UNE EXPOSITION PAR VOIE SEDIMENTAIRE

TABLE 11. MEASURED PAH CONCENTRATIONS IN SPIKED SEDIMENTS. 101
TABLE 12. DEVELOPMENTAL EFFECTS IN MEDAKA EMBRYOS FOLLOWING EXPOSURE TO FLUO-
SPIKED SEDIMENTS WITH DIFFERENT CLAY CONTENT (EXPERIMENT 2) 104
TABLE 13. DEVELOPMENTAL EFFECTS IN MEDAKA EMBRYOS EXPOSED TO FLUO-SPIKED
SEDIMENTS WITH DIFFERENT PEAT CONTENT (EXPERIMENT 3)
TABLE 14. DEVELOPMENTAL EFFECTS OF FLUO-, BAP- AND BAA-SPIKED SEDIMENTS ON
MEDAKA EMBRYOS AND LARVAE (EXPERIMENTS 3, 4 AND 5)109
TABLE 15. VIABILITY AND HATCHING SUCCESS OF ZEBRAFISH ASSESSING BAP AND FLUO
TOXICITY REGARDING DIFFERENT PEAT SEDIMENT CONTENTS124
TABLE 16. DEVELOPMENTAL ENDPOINTS FOR ASSESSING TERATOGENICITY OF BAP ON LARVAL
ZEBRAFISH WITH DIFFERENT PEAT SEDIMENT CONTENTS
TABLE 17. DEVELOPMENTAL ENDPOINTS FOR ASSESSING TERATOGENICITY OF FLUO ON LARVAL
ZEBRAFISH WITH DIFFERENT PEAT SEDIMENT CONTENTS
TABLE 18. COMPARISON OF BAP TOXICITY TO ZEBRAFISH AND JAPANESE MEDAKA (LE BIHANIC
ET AL. SUBMITTED) EARLY LIFE STAGES FOR DIFFERENT PEAT CONCENTRATIONS IN
ARTIFICIAL SEDIMENT

TABLE	19. C	COMPARISON O	f Fluo 1	TOXIC:	ITY TO ZE	BRAF	ISH AND JAP	ANESE	MEDAKA (LE BIHAI	NIC
ET	AL.	SUBMITTED)	EARLY	LIFE	STAGES	FOR	DIFFERENT	PEAT	CONCENTRATIONS	IN
AR	TIFIC	IAL SEDIMENT				•••••	•••••			38

CHAPITRE III - EVALUATION DE LA TOXICITE DE COMPOSES PETROLIERS T $(-1)^{-1}$

TABLE 20. TARGET COMPOUNDS (NG.L ⁻) MEASURED IN WATER ACCOMMODATED-FRACTION OF
BRUT ARABIAN LIGHT OIL (WAF BAL) AND HEAVY ERIKA FUEL OIL (WAF HFO) DURING
ZEBRAFISH EXPOSURES152
TABLE 21. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME
PCR
TABLE 22. NUMBER OF TOTAL INDIVIDUALS SAMPLED FOR DIFFERENT CHEMICAL AND
BIOLOGICAL ANALYSIS
TABLE 23. Summarized of aromatic compounds (NG.L ⁻¹) measured in Water
Accommodated-Fraction of Brut Arabian Light oil (WAF BAL) and Heavy
ERIKA FUEL OIL (WAF HFO) DURING ZEBRAFISH EXPOSURES
TABLE 24. DEVELOPMENTAL ENDPOINTS FOR ASSESSING TOXICITY AND TERATOGENICITY OF
BOTH WAFS BAL AND HFO ON ZEBRAFISH LARVAE AT THE END OF EXPOSURE (96 HPF).
TABLE 25. RELATIVE MRNA EXPRESSION (STANDARD ERROR) OF TARGET GENES IN ZEBRAFISH
LARVAE AFTER 96 HOURS OF WAFS EXPOSURES
CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA
<u>Chapitre IV - Consequences d'une exposition trophique parentale sur la descendance</u>
<u>CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA</u> <u>DESCENDANCE</u> TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD
<u>CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE</u> TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY. BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES, 195
 <u>CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE</u> TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME
 <u>CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE</u> TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR
 <u>CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE</u> TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR
 <u>CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE</u> TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR
CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR. 200 TABLE 28. NUMBER OF TOTAL INDIVIDUALS SAMPLED FOR DIFFERENT CHEMICAL AND BIOLOGICAL ANALYSIS. 202 TABLE 29. DEVELOPMENTAL ENDPOINTS FOR ASSESSING TOXICITY AND TERATOGENICITY OF
CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. Specific primer sequences for the 13 target genes measured by real-time PCR
CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR. 200 TABLE 28. NUMBER OF TOTAL INDIVIDUALS SAMPLED FOR DIFFERENT CHEMICAL AND BIOLOGICAL ANALYSIS. 202 TABLE 29. DEVELOPMENTAL ENDPOINTS FOR ASSESSING TOXICITY AND TERATOGENICITY OF THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) ON 96 HPF OFFSPRING LARVAE FROM CONTAMINATED-GENITORS
CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR
CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR
CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR
CHAPITRE IV - CONSEQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA DESCENDANCE TABLE 26. SUPPLEMENTARY DATA) TARGET COMPOUNDS (NG.G ⁻¹) MEASURED IN SPIKED-FOOD WITH THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) DURING PARENTAL EXPOSURES 195 TABLE 27. SPECIFIC PRIMER SEQUENCES FOR THE 13 TARGET GENES MEASURED BY REAL-TIME PCR. 200 TABLE 28. NUMBER OF TOTAL INDIVIDUALS SAMPLED FOR DIFFERENT CHEMICAL AND BIOLOGICAL ANALYSIS. 202 TABLE 29. DEVELOPMENTAL ENDPOINTS FOR ASSESSING TOXICITY AND TERATOGENICITY OF THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL, HFO) ON 96 HPF OFFSPRING LARVAE FROM CONTAMINATED-GENITORS 206 TABLE 30. RELATIVE MRNA EXPRESSION (STANDARD ERROR) OF TARGET GENES IN 96 HPF LARVAE OFFSPRING FROM PARENTAL CONTAMINATION TO THREE AROMATIC FRACTIONS (PY, BAL HEQ)

AVANT-PROPOS

Le présent travail de thèse a été réalisé au sein du laboratoire d'Écotoxicologie de l'unité Biogéochimie et Écotoxicologie (BE) de l'Ifremer (Nantes) sous la direction du Docteur Thierry Burgeot, et en parallèle au sein de l'équipe AMARE (Réponses des Animaux MARins à la variabilité Environnementale) du laboratoire Littoral Environnement et Société (LIENSs, UMR 7266, Université de La Rochelle) sous la direction du Docteur Christel Lefrançois. La responsabilité scientifique et l'encadrement de cette thèse ont été réalisés par le Docteur Xavier Cousin (INRA Rennes, Ifremer l'Houmeau) au sein de l'Ifremer l'Houmeau et le Professeur Paco Bustamante au sein du LIENSs.

Cette thèse a fait l'objet d'un cofinancement entre le Conseil Général de la Charente Maritime (CG17) et l'Ifremer pour l'ensemble des trois années (2010-2013). En parallèle, j'ai eu plusieurs contrats de vacation en tant que chargée d'enseignement au département de Biologie de l'Université de La Rochelle et de l'Université d'Angers : 40 heures de Travaux Dirigés en Biologie Cellulaire (Licence 1^{ère} Année, Université La Rochelle) et 2 heures de Travaux Dirigés en Écotoxicologie (Master 1^{ère} année, Université d'Angers). Une estimation du coût global de cette thèse a été calculé suite au programme de valorisation des compétences au sein du Nouveau Chapitre de la Thèse®, en partenariat avec l'intelli'agence (ABG) et y est présentée en Annexe 1.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre d'une ANR CESA¹ ConPhyPoP « Contamination et Physiologie des Poissons exposés aux Polluants » (2009-002). L'objectif de ce projet vise à caractériser les conséquences d'une exposition à des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) en mélange sur l'ontogénèse et l'intégrité fonctionnelle de grands processus physiologiques (i.e. développement, croissance, immunité, digestion, osmorégulation, comportement, métabolisme et reproduction) chez un poisson modèle, le poisson zèbre (Danio rerio), tout au long de son cycle de vie. L'évaluation des effets physiologiques s'effectue à différents niveaux d'intégration biologique (de la cellule à l'organisme et « population ») et dans des conditions d'exposition environnementales, en termes de compositions et doses employées. L'objectif final de ce projet est d'établir une vue d'ensemble des effets toxiques et des mécanismes d'action toxique de HAP en mélange, à

¹ ANR CESA : « Agence Nationale de la Recherche » « Contaminants et Environnements : Santé, Adaptabilité, Comportements et Usages »

différents stades de vie du poisson zèbre (de l'embryon à l'adulte) dans le but de pouvoir extrapoler les données à d'autres espèces de poissons. Afin d'appréhender les effets toxiques de ces composés, deux modes d'exposition principaux sont utilisées, la voie sédimentaire et la voie trophique. Une approche utilisant des fractions dissoutes de différents pétroles a également était ajoutée en cours de projet et est seulement utilisée dans le cadre de ma thèse. Ce projet pluridisciplinaire réunit ainsi huit partenaires (Figure 1).



Figure 1. Liste des partenaires impliqués au sein du projet ANR ConPhyPoP. Ifremer (L'Houmeau, Nantes) : Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer ; LPTC UMR 5472 (Université de Bordeaux 1) : Laboratoire Physico et Toxico Chimie des systèmes naturels ; LIENSs UMR 7266 (Université de La Rochelle) : Littoral Environnement et Sociétés ; LEMA EA 3222 (Université du Havre) : Laboratoire d'Écotoxicologe des Milieux Aquatiques ; GPP (Université de Bordeaux 1) : laboratoire Génomique et Physiologie des Poissons ; le laboratoire MDI (Institut Pasteur) : le laboratoire Macrophages et Développement de l'Immunité ; Oniris (Nantes) : Plateforme APEX (Ana-Path EXperts) au sein de l'École Vétérinaire de Nantes et le laboratoire LPGP (INRA Rennes) : Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons.

Ce projet ConPhyPoP fait l'objet de quatre thèses complémentaires permettant d'étudier l'étendue des effets potentiels de mélanges de HAP à différents niveaux d'intégration biologique. Deux thèses portent sur l'ontogénèse et l'intégrité fonctionnelle du poisson zèbre (*Danio rerio*, principalement aux stades juvéniles et adultes), axés sur les processus physiologiques liés au métabolisme énergétique, les performances cardiaques et locomotrices (thèse de Julie Lucas) et sur les fonctions de reproduction et de comportement (activité de nage, apprentissage, neurotoxicité ; thèse de Caroline Vignet). Afin de caractériser les effets toxiques potentiels précoces de ces HAP, les deux autres thèses se focalisent sur le développement de tests de toxicité embryo-larvaires utilisant le médaka japonais (*Oryzias latipes*) et la truite arc-en-ciel (*Onconrynchus mykiss*) (thèse de Florane Le Bihanic ; Partenaire EPOC/LPTC, Université de Bordeaux 1) et le poisson zèbre (*Danio rerio*) au sein de la présente thèse, leurs buts étant de mettre en place des procédures de tests conformes à la DCE (Directive Cadre sur l'Eau)et au règlement REACH (enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques) soient utilisables pour évaluer la toxicité de ces composés hydrophobes. Les objectifs principaux de cette thèse sont détaillés au sein de la partie « Introduction Générale », ils ne seront donc pas développé içi. Cependant, les domaines auxquels j'interviens dans le cadre du projet ConPhyPoP sont représentés au sein de la Figure 2.



Figure 2. Schéma résumant les différentes tâches (T) du projet ConPhyPoP. En rouge est représenté les domaines dans lequel j'interviens dans le cadre de cette thèse (modifié et traduit du rapport ANR ConPhyPoP).

Plusieurs collaborations ont été entreprises pour réaliser cette thèse. Une étroite collaboration avec le laboratoire EPOC/LPTC de l'Université de Bordeaux 1 a permis la fabrication d'un sédiment artificiel (Chapitre II) pour les expérimentations réalisées en parallèle au cours de la thèse de F. Le Bihanic et de celle-ci. La majorité des analyses chimiques a été réalisée par Karyn Le Menach (Ingenieur d'étude) au sein du LPTC, sous la direction d'Hélène Budzinski (Directrice de Recherche CNRS) exceptée pour les expositions par WAF de pétrole que j'ai réalisé moi-même à Bordeaux. De plus, j'ai réalisé un séjour de 6 semaines en 2011 à l'Institut de la Recherche Environnementale de l'Université RWTH d'Aix-La-Chapelle (Allemagne), sous la direction du Docteur Stephen Keiter, afin de m'initier aux différentes techniques d'analyses EROD et au test des Comètes. Les analyses des dommages à l'ADN (tests des comètes) ont été réalisées au sein du laboratoire BE de l'Ifremer Nantes sous la direction de Farida Akcha. Finalement, un soutien important m'a été apporté dans la réalisation des analyses moléculaires qPCR par Lucette Joassard (Technicienne, Ifremer l'Houmeau). Pour les autres manipulations et analyses, elles ont été réalisées à l'Houmeau par mes soins.

VALORISATION SCIENTIFIQUE

Les résultats de cette thèse ont été valorisés au travers d'articles scientifiques soumis ou préparés pour une soumission et de communications scientifiques (orales et affichées) :

Publications scientifiques :

- Le Bihanic F., **Perrichon P.**, Le Menach K., Budzinski H., Cousin X. and Cachot J. Standardization of the MELA Medaka Embryo Larval assay with sediment exposure. *Environmental Science and Pollution Research* (En révision) – Chapitre II.
- Perrichon P., Le Bihanic F., Bustamante P., Le Menach K., Budzinski H., Cachot J. and Cousin X. Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assay with zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research* (Soumis) – Chapitre II.
- Perrichon P., Le Menach K., Akcha F., Cachot J., Budzinski H. and Bustamante P. Toxicity assessment of spilled-petroleum related compounds using zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval assay and multiscale approach. (En préparation pour la revue Aquatic *Toxicology*) – Chapitre III.
- Perrichon P., Akcha F., Le Menach K., Goubeau M., Budzinski H., Cousin X. and Bustamante P. Parental trophic exposure to three aromatic fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the zebrafish: consequences for the offspring. (En préparation pour la revue *Science of Total Environment*) – Chapitre IV.
- Vignet C., Le Menach K., Mazurais D., Lucas J., Perrichon P., Le Bihanic F., Lyphout L., Frêre L., Bégout M.L., Zambonino-Infante J.L., Budzinski H. and Cousin X. Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish – Part I : Survival and growth. *Environmental Science and Pollution Research* (Soumis) – Annexe 2.

- Larcher T., Perrichon P., Vignet C., Ledevin M., Le Menach K., Lyphout L., Landi L., Clerandeau C., F. Lebihanic, Ménard D., Burgeot T., Budzinski H., Akcha F., Cachot J. and Cousin X. Carcinogenic but no genotoxic effects detected following chronic trophic exposure of zebrafish to three fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Environmental Science and Pollution Research* (Soumis) – Annexe 3.
- Lucas J., **Perrichon P.**, Nouhaud M., Audras A., Le Menach K., Budzinski H., Leguen I. and Lefrancois C. The effect of parental trophic exposure to pyrolytic polycyclic aromatic hydrocarbons on aerobic metabolism and cardiac frequency of larval zebrafish *Danio rerio. Environmental Science and Pollution Research* (Soumis).

Communications orales :

- Perrichon P., Budzinski H., Le Menach K., Akcha K., Bustamante P. and Cousin X. Physiological effects on zebrafish offspring following dietary parental exposure to a pyrolytic PAH mixture. 17th International Symposium on Pollution Responses in Marine Organisms PRIMO17, 5-8 May 2013, Faro, Portugal.
- Le Bihanic F., Perrichon P., Budzinski H., Le Menach K., Cousin X. and Cachot J. Comparative effects of three PAH fractions from light and heavy crude oils and from a PAH-contaminated sediment on *Oryzias latipes* Japanese medaka early life stages. 3RD Young Environmental Scientists Meeting (YES), 11-13 February 2013, Kraków, Poland.
- **Perrichon P.** Etudes des effets des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques sur les stades précoces de développement chez le poisson-zèbre *Danio rerio*. *Séminaire des doctorants de 3^{ème} année*, 27 Juin 2013, LIENSs/Université de La Rochelle, France.
- Perrichon P. Développement de tests embryonnaires prédictifs d'effets toxiques précoces et tardifs pour des molécules hydrophobes. *Journée des Doctorants de 2ème année*, 31 Mai 2012, Université de La Rochelle, France.

Communications par affiche :

- **Perrichon P.**, Budzinski H., Le Menach K., Bustamante P. and Cousin X. Comparative effects of two water-accommodated fractions from light and heavy crude oils on early life stage of zebrafish *Danio rerio.* 3^{*RD*} *Young Environmental Scientists Meeting (YES)*, 11-13 February 2013, Kraków, Poland.
- Le Bihanic F., Sommard V., **Perrichon P.**, Cousin X. and Cachot J. A new reference artificial sediment for hydrophobic compound testing with the Japanese Medaka embryo-larval assay (MELA). *Fish and Frog Embryos*, 11-12 October 2012, Aulnay-sous-Bois, France.
- Le Bihanic F., **Perrichon P.**, Cousin X. and Cachot J. The use of Japanese medaka embryolarval assay (MELA) and reference artificial sediment for toxicity assessment of hydrophobic pollutants. 1st European Network for Alternative Testing Strategies in Ecotoxicology (EUROECOTOX), 28-29 June 2012, Eawag, Dübendorf, Switzerland.
- P. Perrichon. Développement de tests embryonnaires prédictifs d'effets toxiques précoces et tardifs pour des molécules hydrophobes. *Journée des Doctorants de 2ème année*, 31 Mai 2012, Université de La Rochelle, France.



INTRODUCTION GENERALE

Les écosystèmes aquatiques sont exposés à une large gamme de contaminants naturels et d'origine anthropique (e.g. métaux; Polychlorobiphényles, PCB; Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques, HAP). L'augmentation croissante des activités humaines, incluant la métallurgie, le raffinage du pétrole, la combustion du charbon ou encore l'incinération de déchets, génère des rejets toujours croissants de ces substances polluantes, pouvant représenter un sérieux risque pour la santé humaine et les écosystèmes aquatiques. Ces rejets chroniques (et parfois accidentels) peuvent entraîner des effets toxiques irréversibles sur les organismes exposés, et ainsi impacter leur survie et le recrutement des populations et communautés. Dans ce contexte, l'évaluation du risque lié à ces substances est une nécessité pour la société, afin de protéger les ressources naturelles, mais également préserver la santé humaine. Une prise de conscience européenne pour identifier, estimer, évaluer et prévenir ce risque a conduit à la mise en place de mesures réglementaires telles que la DCE (Directive Cadre sur l'Eau) et le règlement REACH (Enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des produits chimiques). Suite à ces mesures, le développement de biotests est alors devenu croissant afin de caractériser le devenir et comportement de ces substances, pour obtenir une meilleure compréhension des risques (éco)toxiques (Castaño et al., 2003; Embry et al., 2010; Farwell et al., 2006; Halder et al., 2010; Strähle et al., 2012).

Parmi les organismes aquatiques, les poissons sont fréquemment utilisés pour évaluer l'impact de nombreux contaminants dissous ou particulaires (Anne Bado-Nilles et al., 2009; Couillard et al., 2009; Davoodi and Claireaux, 2007; Kerambrun et al., 2012a, 2012c; Milinkovitch et al., 2013a; Reynaud and Deschaux, 2006). Plusieurs études ont montré que les poissons sont sensibles aux effets des contaminants inorganiques ou organiques, et que les stades de vie précoces (embryons, larves) sont particulièrement vulnérables (Barron et al., 2004; Heintz et al., 2000; Incardona et al., 2004; Muhling et al., 2012; Scott et al., 2011). Parmi les nombreux polluants qui participent à la pollution globale des milieux aquatiques, les HAP représentent une famille de Polluants Organiques Persistants (POP) ubiquistes dans l'environnement. Ces composés sont caractérisés par quatre propriétés : i) leur semipersistance dans l'environnement, ii) leur bioaccumulation chez un grand nombre d'organismes vivants, iii) leur toxicité, susceptible de provoquer des effets nocifs pour les individus exposés et iv) leur grande mobilité qui fait qu'ils peuvent être transportés sur de très longues distances, loin des points de rejets (jusqu'en Arctique par exemple). Compte tenu de ces caractéristiques, la gestion durable des risques liés à ces composés demande à conduire des études (éco)toxicologiques.

1. <u>Réglementation liée à l'évaluation de la toxicité</u> <u>d'une substance chimique</u>

1.1. Cadre réglementaire

1.1.1. La Directive Cadre sur L'eau

Dans une démarche globale de protection et gestion durable des ressources et des milieux naturels, la Directive Cadre Eau 2000/60/CE du Parlement et du Conseil européens établit un cadre politique communautaire dans le domaine de l'eau. Adoptée le 23 octobre 2000, la DCE vise au maintien et à l'amélioration de l'environnement aquatique de la Communauté par des mesures spécifiques pour réduire et arrêter progressivement les rejets, les émissions et les pertes de substances dangereuses prioritaires telles que les métaux, les pesticides ou les HAP. Elle prévoit ainsi la définition de plans de gestion par district hydrographiques en termes d'actions précoces et de planification stable à long terme des mesures de protection. Les points essentiels de cette Directive concernent la protection des ressources en eaux douces, saumâtres, côtières, superficielles et souterraines.

Ainsi, la DCE impose aux États Membres la mise en place de plans de gestion visant à atteindre le bon état écologique et chimique des masses d'eau d'ici 2015 et de supprimer d'ici 2020 les rejets de substances dangereuses prioritaires. L'état écologique résulte de l'expression de la qualité des écosystèmes aquatiques en termes de structure et de fonctionnement associés à cette masse d'eau. Il est basé majoritairement sur des éléments biologiques (diversité et abondance d'espèces végétales et animales). L'état chimique quant à lui, est considéré comme bon lorsque les concentrations de polluants ne dépassent pas les normes de qualité environnementale fixées en application des différents textes législatifs européens.

1.1.2. La réglementation REACH

Entré en vigueur le 1^{er} juin 2007, REACH est le règlement (directive CE/1907/32006 ; EC, 2007) relatif à l'enregistrement, l'évaluation, l'autorisation et les restrictions de substances nouvellement mises sur le marché européen ou jamais évaluées, de tonnage supérieur à une tonne par an. Il vise à assurer un niveau élevé de protection de la santé humaine et de l'environnement. REACH est l'acronyme du titre anglais du règlement : « Registration, Evaluation, Autorisation and restriction of CHemicals ».

Ce règlement vise tout d'abord à améliorer les connaissances sur les propriétés intrinsèques (propriétés physico-chimiques et dangerosité) de substances chimiques pour une meilleure caractérisation et une meilleure maîtrise des risques liés à leurs utilisations. Un déficit de connaissance sur l'évaluation de la toxicité et l'écotoxicité a été reporté pour environ 95 % de substances chimiques, y compris les plus anciennes (dites « existantes »), introduites sur le marché avant 1981. En effet, très peu d'informations sont disponibles puisqu'avant cette date aucun dossier d'enregistrement n'était obligatoire. D'ici 2018, REACH prévoit donc l'enregistrement de 30 000 substances nouvelles ou anciennes, produites ou importées à plus d'une tonne par an. Ces substances devront être enregistrées auprès de l'Agence Européenne des Produits Chimiques (ECHA). L'évaluation des risques liés à ces substances est assurée par les Autorités Compétentes (ACs) des États membres selon différents critères de priorités.

REACH veille également à transférer la responsabilité de l'évaluation et la gestion des risques (prises de décision) des substances chimiques (avant mise sur le marché ou utilisation) des autorités administratives vers les industriels (producteurs ou importateurs), conformément au « principe de précaution ». Ce principe peut être invoqué rapidement en cas de risque potentiel sanitaire ou environnemental suite à une évaluation scientifique et objective, si celleci ne permet pas d'identifier avec certitude le risque éventuel.

Le règlement vise à promouvoir une politique d'innovation et de substitution des substances les plus préoccupantes (cancérogènes, mutagènes, reprotoxiques, persistantes, bioaccumulables) à travers la procédure d'autorisation. Les autorisations d'utilisations de ces substances sont soumises à évaluation du dossier par la Commission européenne.

Au regard des exigences et du très grand nombre des substances chimiques à évaluer, REACH invite à limiter les expérimentations sur les vertébrés et à promouvoir le développement de méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Les évaluations toxicologiques et écotoxicologiques de substances chimiques devront ainsi favoriser au maximum l'utilisation de méthodes d'expérimentation de remplacement validées par la Commission Européenne afin de les substituer aux tests *in vivo* sur animaux. Le règlement stipule également que si des essais *in vivo* sont utilisés, ils devront être conformes aux exigences réglementaires de la protection des animaux de laboratoire (directive 86/609/CEE)

13

et des Bonnes Pratiques de Laboratoire (directive 2004/10/CE). Le Tableau 1 reporte les différents essais utilisés afin d'évaluer la toxicité de substances chimiques en fonction de leur production annuelle.

	Tonnage annuel						
Essai	1 à 10 t	10 à 100 t	100 à 1 000 t	>1 000 t			
Test de toxicité aigüe	oui	oui	oui	oui			
Test d'irritation cutanée et oculaire	oui	oui	oui	oui			
Test de sensibilisation cutanée	oui	oui	oui	oui			
Test d'Ames (mutagénécité)	oui	oui	oui	oui			
Étude de toxicité par administration répétée		oui	oui	oui			
Test de reprotoxicité		oui	oui	oui			
Test complémentaire de mutagénicité			oui	oui			
Étude de toxicité subchronique			oui	oui			
Test embryo-larvaire			oui	oui			
Étude complémentaire de génotoxicité				oui			
Étude de toxicité à long terme				oui			
Étude multigénérationnelle				oui			
Étude de carcinogénicité				oui			

Tableau 1. Données écotoxicologiques à produire pour l'enregistrement des composés chimiques dans le cadre de la réglementation REACH.

1.2. Principe éthique de l'expérimentation animale

L'évaluation éthique doit permettre de comprendre la nécessité scientifique du recours aux animaux vivants, ainsi que la raison du choix de l'espèce. Elle nécessite de respecter les principes de la bientraitance des animaux et ainsi d'optimiser les conditions d'utilisation des animaux (principe des 3 R), compte tenu des nécessités expérimentales.

1.2.1. Principe des 3R

La règle des « 3R » (« Reduce, Refine, Replace ») élaborée en 1959 par Russell and Burch constitue le fondement de la démarche éthique liée à l'expérimentation animale en Europe et en Amérique du Nord. Ce principe établit des lignes directrices afin de limiter la souffrance des animaux utilisés à des fins d'expérimentation. La première ligne directrice est de réduire (« Reduce ») le plus possible le nombre d'animaux nécessaire aux expérimentations, conformément aux exigences réglementaires (directive 86/609/CEE), en vue d'une autorisation de mise sur le marché ou d'une vérification d'innocuité/toxicité de substance chimique. La réduction du nombre d'animaux en expérimentation peut être réalisée en optimisant les plans expérimentaux (estimation, partage d'animaux) et en développant le plus possible les études *in vitro*. La réduction du nombre d'animaux utilisés doit néanmoins être favorable à l'amélioration des stratégies de recherche et ne pas réduire la fiabilité des résultats (Festing et al., 1998; Mann et al., 1991).

La seconde ligne directrice concerne l'amélioration (« Refine ») des protocoles expérimentaux afin d'optimiser les conditions d'utilisation de l'animal. Une attention particulière est portée sur le « bien-être » animal. Elle prévoit de réduire et de gérer de façon optimale la douleur et la souffrance de l'animal utilisé, en développant notamment des modèles peu ou non invasifs (imagerie, analyses *in vivo*). L'amélioration des procédures expérimentales exige également de recourir le plus possible à l'anesthésie/analgésie, de réduire la durée d'exposition des études toxicologiques et d'utiliser des approches de toxicité aigüe plutôt que chronique (Flecknell, 1994 ; Morton, 1995 ; Balls et al., 1995).

Enfin, cette règle des « 3R » encourage à, lorsqu'il n'est pas indispensable, remplacer (« Replace ») le modèle animal *in vivo* par des modèles *in vitro* validés (cellules humaines, animales, stades précoces de développement), des modèles mathématiques ou des simulations informatiques.

Au regard des exigences réglementaires (REACH) sur le développement des évaluations toxiques et écotoxiques des substances chimiques, le recours à des méthodes de remplacement dites « alternatives » devient alors une nécessité. A travers une démarche éthique sociétale, ces méthodes alternatives permettraient d'augmenter la valeur scientifique prédictive du danger et réduiraient également les coûts de mise en œuvre (achat et entretien) contrairement à l'utilisation d'animaux de haut standard de qualité (Tableau 2).

Essai	Modèle (limite des tests)	Coût HT (€)
Toxicité aigüe par voie orale	Rongeur	3 000
Toxicité à terme par voie orale	Rat (28 jours)	55 000
	Chien (1 an)	100 000
Cancérogénicité	Rat	55 000
Tératogénécité	Lapin	60 000
Toxicité génétique	Cellules bactériennes	3 000
	Cellules de Mammifères	14 000
Écotoxicité aigüe	Poisson (4 jours)	3 000
Écotoxicité chronique	Poisson (28 jours)	9 000

Tableau 2. Essais réglementés et coûts associés basés le principe éthique de l'expérimentation animale et les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

1.2.2. Méthodes prospectives in vitro

L'identification et la caractérisation des effets adverses potentiels d'une substance chimique ou d'un mélange nécessitent une utilisation accrue de méthodes prospectives (*in vivo* ou *in vitro*) avant la mise sur le marché. Outre le respect du principe éthique de l'expérimentation animale et l'application des Bonnes Pratiques de Laboratoire, les protocoles utilisés pour la recherche sont soumis généralement à une validation scientifique, une normalisation ou une certification.

En écotoxicologie, le développement de tests de toxicité sur les espèces aquatiques est essentiel. En effet, le compartiment aquatique étant le réceptacle final d'un grand nombre de composés chimiques, les espèces aquatiques y sont alors particulièrement vulnérables. Leur mode de vie « immergé » implique une exposition directe à ces composés potentiellement toxiques. Ainsi, il est nécessaire de disposer des outils pertinents d'évaluation des risques toxicologiques.

La diversité taxonomique des poissons en font une composante indispensable dans les stratégies de recherche (éco)toxicologique. Leurs diversités morphologiques, physiologiques, de vie, d'habitat, leur position dans les réseaux trophiques et leur variabilité dans les niveaux de réponse à un stress en font des bons modèles à l'évaluation de la qualité environnementale. Les poissons se distinguent également des autres groupes taxonomiques (vertébrés ou invertébrés) par leur capacité métabolique notamment dans leur capacité à métaboliser certaines classes de composés chimiques. Dans un contexte de pollution environnementale, et de par leur mode de vie immergé, les poissons sont fréquemment les cibles directes de

déversements chimiques et en font donc de bons intégrateurs des conditions environnementales. Ils sont donc régulièrement employés comme espèces sentinelles en biosurveillance environnementale.

Prenant en considération la politique réglementaire du bien-être animal, un effort de développement de tests (éco)toxicologiques a été entrepris durant les trente dernières années favorisant ainsi les tests sur cultures primaires de cellules ou de lignées cellulaires de poissons. Ces tests sont des outils particulièrement adaptés pour évaluer la toxicité d'un grand nombre de composés individuels et de mélanges présents dans l'environnement (Castaño et al., 2003). Bien que ces tests aient l'avantage d'être rapides, de réduire la quantité de matériels et de limiter le recours à des animaux vivants, ils sont peu transposables au milieu biologique réel et peuvent entrainer une forte variabilité de réponses en fonction du statut physiologique du poisson donneur et/ou de la qualité de la procédure d'isolation.

Les méthodes *in vitro* sur stades précoces de développement des poissons sont alors un bon compromis entre ces méthodes *in vitro* classiques et les méthodes *in vivo*.

Les tests de toxicité sur embryons et larves de poissons constituent alors de réelles voies de substitution dans la recherche fondamentale et appliquée. Outre le principe éthique en expérimentation, la directive 2010/63/EV préconise la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. De par ce texte, les stades précoces de développement des poissons ne sont pas considérés comme des animaux vivants et leur utilisation n'est don pas réglementée. Ces stades correspondent du stade « fécondation » jusqu'au stade où l'organisme peut se nourrir de façon exogène, correspondant également à la résorption du sac vitellin.

L'Organisation de Coopération et de Développement Économique (OCDE) recommande un certain nombre de tests normalisés permettant d'évaluer la toxicité de composés chimiques sur ces stades précoces de développement. Cette organisation regroupe plus d'une trentaine de pays (Europe occidentale, Amérique du nord, Australie, Japon...) en charge de rassembler toutes les données statistiques issues de ces tests. Des lignes directrices (LD) spécifiques aux tests chez le poisson ont été mises en place : LD N° 212 (OECD, 1998) « Poisson, test de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin », LD N° 210 (OECD, 1992) « Poisson, test de toxicité aux premiers stades de la vie » et récemment LD N° 236 (OECD, 2013a) « Poisson, test de toxicité aigüe au stade embryonnaire ». Les principaux objectifs de ces tests sont reportés dans le Tableau 3. Ces lignes directrices concernent un des espèces telles que la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), la tête-de-boule (*Pimephales promelas*), le poisson zèbre (*Danio rerio*) et le médaka japonais (*Oryzias latipes*) pour les

espèces d'eau douce ; et la fondule tête de mouton (*Cyprinodon variegatus*) et la capucette (*Menidia sp.*) pour les espèces estuariennes et marines. Néanmoins, il est possible d'utiliser d'autres espèces en justifiant son choix de leur utilisation et en adaptant la méthode expérimentale afin de rester en conformité avec les recommandations de l'OCDE.

L'intérêt de ces tests est grand, car les stades embryo-larvaires de poissons sont particulièrement vulnérables dans l'environnement aquatique. De par les intérêts écologiques, économiques et/ou patrimoniaux des poissons, un dysfonctionnement à la base du réseau trophique est à même d'engendrer une cascade de réactions néfastes pour l'écosystème dans son ensemble. De plus, les stades précoces de développement sont particulièrement sensibles à une large gamme de contaminants. Un effort de développement de ces tests embyo-larvaires a donc été entrepris afin d'évaluer la toxicité de nombreuses substances chimiques (Barron et al., 2004; Braunbeck and Lammer, 2006; Embry et al., 2010; González-Doncel et al., 2011; Halder et al., 2010; Hollert et al., 2000; Incardona et al., 2006; Lammer et al., 2009; Nagel, 2002; Padilla et al., 2009; Strähle et al., 2012). Dans le contexte de la réglementation, une amélioration croissante de ces tests est recherchée avec l'objectif d'évaluer le potentiel prédictif des effets observés à des niveaux d'intégration biologique supérieurs.

Tableau 3. Principales lignes directrices pour les tests de toxicité recommandés par l'OCDE prenant en considération les stades embryo-larvaires de poissons.

LD N° 210 "Poisson, test de toxicité aux premiers stades de la vie" du 17 juillet 1992, modifiée le 26 juillet 2013

- Déterminer les effets létaux et sublétaux de produits chimiques sur des stades précoces de développement des espèces étudiées en situation d'exposition chronique.
- Critères sublétaux : i) Suivi du stade de développement embryonnaire, ii) Éclosion et survie, iii) Apparence anormale, iv) Comportement anormale et v) Poids/Longueur.
- Utiliser des concentrations croissantes de composés dissous dans l'eau en conditions dynamiques principalement. Les conditions semi-statiques sont toutefois acceptables.
- Valider les effets par des critères CMEO (Concentration Minimale avec Effet Observé), CSEO (Concentration maximale Sans Effet Observé).
- Valider les tests par : une oxygénation du milieu > 60 %, une stabilité de la température d'exposition (variation ± 1.5 °C maximum et spécifique à l'espèce soumise à au test), un dosage analytique des concentrations expérimentales et un taux de survie des œufs fécondés (avant et après éclosion) ≥ valeurs limites déterminées pour chaque espèce.
- Durée du test dépendant de l'espèce étudiée.

LD N° 212 "Poisson, test de toxicité à court terme aux stades de l'embryon et de l'alevin" du 21 septembre 1998

- Exposition des poissons du stade compris entre l'œuf (tout juste fécondé) à la fin du stade de l'alevin.
- Aucune alimentation donnée durant le test.
- Fin du test lorsque les alevins dépendent encore de leur sac vitellin.
- Complémentaire à la ligne directrice 210 : Déterminer les effets létaux et sublétaux, servir de sélection pour un test de toxicité sur les premiers stades de vie ou test chronique, tester des espèces dans un but d'améliorer les connaissances en technique d'élevage (déterminer le passage de l'alimentation endogène à exogène).
- Critères de validité des effets et des tests similaires à la ligne directrice 210.

LD N° 236 " Poisson, test de toxicité aigüe au stade embryonnaire" du 26 juillet 2013 – Spécifique au poisson zèbre *Danio rerio*

- Déterminer la toxicité aigüe des produits chimiques sur les stades embryonnaires.
- Exposition des poissons du stade œuf fraichement fécondé durant une période de 96 heures.
- Déterminer les effets létaux par différents critères : i) la coagulation des œufs fécondés, ii) l'absence de formation des somites, iii) le non-détachement du bourgeon caudal dans le sac vitellin, iv) l'absence de battements cardiaques toutes les 24 heures durant l'exposition.
- CL50 peut être déterminée à la fin de l'exposition.
- Dosage analytique obligatoire du composé ou du mélange testés + validation des résultats dans le cadre réglementaire imposé.

2. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques

2.1. Caractéristiques physico-chimiques

Les HAP représentent une classe de polluants organiques apolaires, relativement stables dont la structure cyclique comprend au minimum deux cycles aromatiques (benzène), essentiellement constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène. Dans l'environnement, les HAP les plus présents et les plus mobiles sont constitués de 2 à 7 noyaux aromatiques, plus ou moins condensés (Neff, 1979). Parmi ces HAP, 4 sont classés comme substances dangereuses prioritaires dans le cadre de la DCE et 16 selon les recommandations de l'Agence américaine de la Protection Environnementale (US-EPA) en raison de leur toxicité et de leurs propriétés mutagènes (Figure 3) (Keith and Telliard, 1979).

Le comportement et la distribution des HAP dans l'environnement sont dépendants de leurs propriétés chimiques. Les caractéristiques physiques et chimiques des HAP varient en fonction de leurs structures et leurs masses moléculaires (MM) (Tableau 4). Ils peuvent être divisés en deux groupes : i) les HAP de faible poids moléculaire (LMW, 2 à 3 cycles benzéniques): $128 \leq MM \leq 178$ g.mol⁻¹ (e.g. naphtalène, fluorène) et ii) les HAP de haut poids moléculaire (HMW, \geq 3 cycles benzéniques) : $178 \leq MM \leq 300$ g.mol⁻¹ (e.g. benzo[a]pyrène, benzo[ghi]pérylène) (Black, 1983). En effet, les noyaux aromatiques les rendent très hydrophobes (Log K_{ow} élevé). Plus les HAP présenteront de nombreux de noyaux aromatiques, plus leur hydrophobicité sera forte, alors que leur solubilité et leur volatilité seront moindres.

Ainsi, la résistance des HAP aux différents processus de dégradation (oxydation, réduction et évaporation) sera plus grande avec l'augmentation de leurs masses moléculaires. Leur faible solubilité dans l'eau va diminuer la présence de ces HAP sous forme dissoute. En revanche, leur forte capacité d'adsorption sur la matière organique particulaire (Log K_{oc}) va favoriser leur accumulation dans les matrices sédimentaires. En outre, ce sont des molécules lipophiles qui vont avoir tendance à s'accumuler facilement dans les matières grasses (Mackay et al., 1992).



Figure 3. Structure chimique des HAP. Liste des composés identifiés comme substances dangereuses prioritaires dans le cadre de la DCE (2013/39/UE) en souligné et par l'Agence américaine de la Protection Environnementale (US-EPA) avec une étoile.
Composés	Nb grpt benzéniques ^a (Nb total de cycles)	Masse moléculaire (g.mol ⁻¹)	Hydrophobicité Log K _{ow} ^b	Adsorption particulaire Log K _{oc} c	Solubilité aqueuse (mg.L ⁻¹) ^d	Volatilité Cste de Henry ^e (Pa.m ³ .mol ⁻¹)	Cancérogénicité^f
Naphtalène	2	128	3,37	3,09	31,8	48,9	NC
Acénaphtylène	2 (3)	152	4,07	3.40	3,93	-	NC
Acénaphtène	2 (3)	154	3,92	3,70	3,70	14,7	NC
Biphényle	2	154	4,09	3.15	7,50	-	-
Fluorène	2 (3)	166	4,18	3,95	1,98	9,20	NC
Phénanthrène	3	178	4,57	4,20	1,20	3,98	NC
Anthracène	3	178	4,54	4,39	1,29	5,00	PC
Fluoranthène	3 (4)	202	5,22	4,69	0,26	1,95	NC
Pyrène	4	202	5,18	4,85	0,13	1,1.10 ⁻³	NC
Benzo[a]anthracène	4	228	5,91	5.30	0,011	0,02	С
Chrysène	4	228	5,60	5.30	2,00.10 ⁻³	9,50	PC
Triphénylène	4	228	5,49	-	3,80.10 ⁻³	-	-
Benzo[b]fluoranthène	4 (5)	252	6,04	5,80	1,20.10 ⁻³	15,6	С
Benzo[j]fluoranthène	4 (5)	252	6,21	-	$2,50.10^{-3}$	-	С
Benzo[k]fluoranthène	4 (5)	252	6,00	5,90	7,60.10 ⁻⁴	0,07	С
Benzo[e]pyrène	5	252	6,21	-	6,30.10 ⁻³	0,04	NC
Benzo[a]pyrène	5	252	6,04	6,07	2,00.10 ⁻³	0,04	FC
Pérylène	5	252	6,21	-	3,00.10-3	-	NC
Indéno[1,2,3-cd]pyrène	5 (6)	276	6,60	6,80	6,20.10 ⁻²	0,03	С
Benzo[g,h,i]pérylène	6	276	6,50	6.43	$2,60.10^{-4}$	0,01	PC
Dibenzo[a,h]anthracène	5	278	6,75	6.52	6,00.10 ⁻⁴	4,8.10 ⁻³	FC
Dibenzo[a,c]anthracène	5	278	6,70	6.15	0,50.10 ⁻³	4,8.10 ⁻³	С
Coronène	7	300	7,36	6.80	1,40.10 ⁻³	1,0.10 ⁻⁴	NC

Tableau 4. Caractéristiques physico-chimiques des HAP (d'après les bases de données de l'US-EPA, INERIS).

^a Nombre de groupements benzéniques (Nombre total de cycles), ^b K_{ow} : Coefficient de partage n-octanol/eau, ^c K_{oc} : Coefficient de partage carbone organique/eau, ^d Solubilité dans l'eau à 25 °C, ^e Constante de Henry à 25 °C, ^f Cancérogénicité (NC : Non Cancérogène, PC : Peu Cancérogène, C : Cancérogène, FC : Fortement Cancérogène).

2.2. Origines et sources dans l'environnement

Les HAP sont des polluants ubiquistes et semi-persistants dans l'environnement (Laflamme and Hites, 1978) Ils sont générés en mélange plus ou moins complexes, provenant de trois origines principales: pyrolytique, pétrogénique et diagénétique (Neff, 1979).

Les HAP sont en majeure partie d'origine pyrolytique et sont issus : i) de la combustion incomplète à haute température de la matière organique naturelle (feux de forêts, éruptions volcaniques) (Baek et al., 1991; Freeman et Cattelle, 1990; Greiner et al., 1977; Ravindra et al., 2007; Wakeham et al., 1980; Youngblood et Blummer, 1975) ou ii) de la combustion incomplète à haute température de la matière organique fossile liée aux activités anthropiques industrielles (production d'énergie, cokeries, automobile, carburants) et domestiques (incinérations de déchets, chauffage). La fumée de cigarette (Chuang et al., 1991; Schmeltz et Hoffman, 1976) ainsi que les procédés en préparation culinaire (grillage, fumage, chauffage de l'huile) constituent également une source non négligeable d'exposition pour l'Homme.

Les HAP peuvent également être d'origine pétrogénique à partir de produits pétroliers bruts ou dérivés. Ils sont formés par maturation lente de la matière organique lors de la diagénèse ou catagénèse dans le milieu sédimentaire profond, suivant un gradient géothermique. Ces mécanismes participent à la formation de pétroles, mélanges complexes de composés hydrocarbures et non hydrocarbures. Parmi ces hydrocarbures, des composés aromatiques (HAP alkylés et soufrés) y sont présents. Ces composés sont introduits dans l'environnement aquatique par des apports dits i) chroniques : rejets urbains ou industriels (activités portuaires, raffineries, lessivages des infrastructures routières, dégazages) et/ou ii) accidentels (marées noires) : naufrages de navires-citernes, ruptures d'oléoducs (GESAMP, 2007, 1993).

Les HAP d'origine diagénétique (ou biogénique) sont issus de la transformation de précurseurs organiques (triterpènes, pigments, stéroïdes, quinones) dans les dépôts sédimentaires par des processus chimiques ou biologiques (microorganismes) lors de la diagénèse précoce (Laflamme and Hites, 1978; Wakeham et al., 1980). Cette source est minoritaire comparée aux deux précédentes excepté en certains endroits très localisés (Budzinski et al., 1997).

Les sources anthropiques constituent les sources majeures d'émission de HAP dans l'environnement.

2.3. Empreintes moléculaires

2.3.1. Indices moléculaires

Une empreinte moléculaire des mélanges de HAP produits peut être définie selon les différents processus de formation (pyrolytique, pétrogénique, diagénétique) et l'abondance relative des composés. Ainsi, cette empreinte permet d'identifier l'origine d'une contamination dans une matrice environnementale donnée. Elle est basée sur des rapports de concentrations entre isomères (composés de poids moléculaire identique) thermodynamiquement différents. Certains de ces indices moléculaires, pour les deux principales origines sont reportés en Tableau 5.

Tableau 5. Valeurs de quelques indices moléculaires caractérisant l'origine des HAP.

	Indices moléculaires									
Origines	Phe/Ant ^{a,b}	Fluo/Pyr ^{b,c}	Chry/B[a]Ant ^d	ΣMPhe/Phe ^{a,e}	B[e]P/B[a]P ^f	LMW/HMW ^{g,h,i}				
Pyrolytique	1-10	> 1	< 1	< 2	< 2	< 1				
Pétrogénique	> 15	< 1	> 1	> 2	> 5	> 1				

^aBaumard et al. (1998), ^bBudzinski et al. (1997), ^cAkcha et al. (2004), ^dBaumard et al. (1997a), ^eGarrigues et al. (1995), ^fBaumard et al. (1997), ^gDe Luca et al. (2005), ^hSoclo et al. (2000), ⁱMagi et al. (2002)

MPhe : MéthylPhénanthrène

2.3.2. Profils moléculaires

Profil moléculaire de mélange d'origine pyrolytique

Les processus pyrolytiques induisent majoritairement des composés aromatiques faiblement substitués. Ces mélanges sont essentiellement caractérisés par des HAP de haut poids moléculaire.

Profil moléculaire de mélange d'origine pétrogénique

• Cas d'un pétrole brut de type Arabian Light :

L'Arabian Light, pétrole brut de référence du Moyen-Orient (Arabie Saoudite) est un pétrole (BAL 110) de nature légère et relativement liquide (densité à 20 °C : 0,86 ; viscosité à

15 °C : 60 mPa). Trois familles d'hydrocarbures composent ce pétrole : les hydrocarbures aliphatiques en fortes proportions (54 %, paraffine, naphtènes), les hydrocarbures aromatiques (34 %) et les composés polaires (12 %) de résines et d'asphaltènes. Parmi les composés aromatiques, les HAP de faibles poids moléculaires (HAP à 2-3 cycles benzéniques) prédominent et sont représentatifs d'un pétrole brut léger. Ce fioul est également caractérisé composés sulfurés la présence de de type thiophène (dibenthiophène, par benzonaphtothiophène).

• Cas d'un fioul lourd de type Erika :

Le pétrolier maltais Erika en provenance de Dunkerque (France) et à destination de Livourne (Italie) a fait naufrage le 12 décembre 1999 au large de la Bretagne (France). Une quantité d'environ 20 000 tonnes de fioul lourd a été déversée en mer. Ce fioul lourd de catégorie n° 2 (IFO 500) est hautement visqueux (densité : 1.0; viscosité à 50°C : 555 cSt). Trois familles d'hydrocarbures composent également ce produit pétrolier : les hydrocarbures aromatiques (54-55 %), les hydrocarbures aliphatiques (24-25 %) et les composés polaires de résines et asphaltènes (20-21 %). Ce fioul lourd est caractérisé par une forte proportion de composés aromatiques à hauts poids moléculaires (e.g. benzo[a]pyrène) comparés à un pétrole brut léger mais des HAP globalement de plus faibles poids comparé à un mélange d'origine pyrolytique. La majeure partie des composés polyaromatiques présents sont des composés alkylés. Les composés alkylés du naphtalène, phénanthrène et chrysène sont les plus abondants.

Profil moléculaire de mélange d'origine diagénétique

Un mélange de HAP d'origine diagénétique est caractérisé par la présence en quantité non négligeable du composé pérylène (Budzinski et al., 1997; Venkatesan, 1988).

2.4. Devenir et biodisponibilité des HAP dans l'environnement aquatique

2.4.1. Devenir des HAP dans l'environnement

Le devenir et le comportement des composés HAP dans les différents compartiments de l'environnement (atmosphère, sols, colonne d'eau, sédiment, biota) sont régis par leurs propriétés intrinsèques et les caractéristiques physico-chimiques du milieu. La multiplicité des sources de production, leur semi-persistance et leur tendance à être transporté sur de longues distances en font des composés ubiquistes dans l'environnement (Menzie et al. 2002, 1992; Neff 1979; Shen et al. 2013). Les HAP émis par les activités humaines vont se retrouver dans les eaux superficielles continentales et marines *via* les retombées atmosphériques (précipitations), des dépôts directs et/ou le lessivage des sols (Tuvikene, 1995). Ainsi, le milieu aquatique constitue le réceptacle final des HAP. En 1979, la quantité de HAP atteignant le milieu aquatique était estimée à 230 000 tonnes chaque année (Neff, 1979). Aujourd'hui, les HAP sont présents dans les zones littorales reculées telles que les côtes du Groenland ou des côtes de l'Antarctique (Neff, 1979).

2.4.2. Biodisponibilité des HAP dans l'environnement aquatique

Afin de déterminer le risque que représente un milieu vis-à-vis des organismes, il est indispensable de connaitre la fraction biodisponible des contaminants qu'il renferme. La biodisponibilité désigne la capacité d'un composé chimique (ou d'un mélange) présent dans un milieu donné à interagir avec l'organisme cible c'est-à-dire sa capacité à entrer en contact avec l'organisme (atteindre les membranes cellulaires), à y pénétrer et à exercer son effet xénobiotique (Gourlay-Francé et al., 2010). Cette notion repose sur les caractéristiques physico-chimiques des composés, du milieu ainsi que la physiologie des organismes exposés (Figure 4).



Figure 4. Relation schématique entre la présence, la biodisponibilité d'un contaminant dans l'environnement, sa bioaccumulation et sa toxicité dans un organisme biologique (d'après Gourlay-Francé et al. (2010)).

Il existe ainsi trois manières complémentaires d'estimer la biodisponibilité d'un polluant (Gourlay-Francé et al., 2010) :

- La première, par une analyse chimique afin de déterminer les différentes formes chimiques sous lesquelles se trouve le contaminant (ou mélange) dans le milieu.
- La seconde, par analyse conjointe chimique et biologique, afin de mesurer la concentration en polluant accumulé dans un organisme au cours de l'exposition. La bioaccumulation renseigne sur la concentration biodisponible dans le milieu sans préjuger de sa toxicité.
- La troisième, par une analyse purement biologique, afin d'évaluer la réponse toxique (également enzymatique ou physiologique) d'un organisme (ou population) à une exposition. Cette mesure est alors le reflet de la concentration biodisponible ayant provoqué cette réponse biologique.

Les HAP présentent une forte affinité pour les matières organiques particulaires et colloïdales dont leur nature peut jouer un rôle déterminant dans la biodisponibilité de ces composés. La distribution des HAP dans les différents compartiments de l'environnement aquatique va notamment être dictée par leurs coefficients de partage : coefficient de partage entre une phase aqueuse et une phase organique (K_{ow}), entre le sédiment et l'eau (K_p) et entre le carbone organique et l'eau (K_{oc}) (Tableau 4). Par conséquent, les HAP HMW, faiblement

solubles dans l'eau, vont s'associer plus facilement à la matière organique particulaire et colloïdale que les HAP LMW qui vont être plus solubles dans l'eau donc généralement plus biodisponibles. De la même manière, plus la teneur en matière organique dans le milieu est élevée, plus la mobilité des composés est restreinte (le K_p diminue), par conséquent les HAP HMW sont relativement immobiles. La biodisponibilité des HAP peut être également fonction de leur origine, pyrolytique ou pétrogénique. En effet, les HAP d'origine pyrolytique dénotent un fort potentiel d'adsorption sur la matière organique particulaire qui leur confère une plus grande persistance dans l'environnement. Ils deviennent donc moins mobiles, moins biodisponibles et moins toxiques pour les organismes, contrairement aux HAP d'origine pétrogénique, qui ont un faible potentiel d'adsorption particulaire et donc une plus grande biodisponibilité (Farrington and Westall, 1986; Hylland, 2006; Neff, 1984; Neff et al., 2005). En résumé, du fait de leur forte affinité aux matrices particulaires, les HAP d'origine pyrolytique vont avoir tendance à s'accumuler dans les sédiments, atteignant parfois de fortes concentrations, alors que les HAP d'origine pétrogénique vont se retrouver plus facilement dans la phase dissoute dans la colonne d'eau. De nombreux processus tels que la bioturbation, la resuspension ou la diffusion remettent ces HAP piégés dans les sédiments en circulation dans la colonne d'eau (Farrington, 1991; Neff, 1979). Ainsi, les HAP peuvent être absorbés (ou ingérés), puis accumulés et/ou transformés par les organismes aquatiques.

2.5. Bioaccumulation des HAP chez les poissons

2.5.1. Notion de bioaccumulation

Afin de comprendre les facteurs qui gouvernent la biodisponibilité d'un composé (ou d'un mélange) pour un organisme, il convient de comprendre comment ce composé s'accumule au sein de l'organisme considéré. Le terme de bioaccumulation est défini comme la capacité des organismes à concentrer et à accumuler progressivement des composés spécifiques à partir du milieu environnant. De par leur caractère hydrophobe et lipophile, les HAP peuvent traverser les membranes biologiques des organismes et s'accumuler dans les tissus riches en matière grasses comme les tissus adipeux, le foie ou encore les gonades. L'accumulation des HAP dans les organismes aquatiques est donc dépendant de plusieurs facteurs : la biodisponibilité de ces composés, la durée d'exposition et la capacité des organismes à assimiler ces composés.

La bioaccumulation chez les organismes vertébrés tels que les poissons, est très minoritaire et concerne donc essentiellement les niveaux trophiques inférieurs (invertébrés) ayant de faibles capacités de métabolisation (D'Adamo et al., 1997; Hylland, 2006; Varanasi et al., 1985). De plus, les composés accumulés au sein de l'organisme sont susceptibles d'être éliminés par diverses voies. La notion de bioaccumulation s'applique seulement lorsque la concentration des composés apportés à l'organisme est supérieure à celle éliminée. La bioaccumulation est donc régie par le processus de bioconcentration et non pas par le processus de biotransformation. Les cinétiques d'adsorption et d'élimination spécifiques à chaque composé et à chaque organisme considéré sont des facteurs déterminants pour les mesures de bioaccumulation (van der Oost et al., 2003).

Les voies d'entrée de ces composés au sein d'un organisme aquatique peuvent se faire par l'intermédiaire de diverses voies d'accumulation (eau, sédiment, aliment).

2.5.2. Bioaccumulation par voie sédimentaire

Comme précisé précédemment, certains HAP, notamment les HMW, vont avoir tendance à s'adsorber sur les particules fines, puis à s'accumuler dans les sédiments. Le sédiment constitue un véritable puits de contamination pour ces polluants hydrophobes. Par conséquent, les organismes benthiques et démersaux vivant au contact ou proche de ces sédiments sont susceptibles d'être exposés à un milieu enrichi en HAP de plus haut poids moléculaire. Les sédiments servent de substrats de ponte pour de nombreuses espèces de poissons, par conséquent, les stades embryonnaires et larvaires sont particulièrement exposés à ces polluants. L'exposition de ces stades peut être particulièrement néfaste à la survie et donc au recrutement des populations. Les sédiments remis en suspension par des phénomènes de bioturbation (i.e. activité des organismes fouisseurs) ou l'action des vagues et des courants marins peuvent être également source d'exposition des poissons.

2.5.3. Bioaccumulation par voie aqueuse (bioconcentration)

La bioconcentration signifie l'accumulation par les organismes aquatiques de substances à une concentration supérieure à celle mesurée dans l'eau. De par leur mode de vie immergé, la phase aqueuse (colonne d'eau et les eaux interstitielles) constitue une voie d'exposition et d'enrichissement majoritaire chez les poissons comparée à d'autres (Lee et al., 1972; Niimi and Dookhran, 1989; Randall et al., 1998). Les voies d'entrées de ces HAP se font principalement à travers les voies respiratoires (branchies) et la barrière corporelle (tégument, diffusion passive). Par cette voie d'exposition, les organismes vont être soumis à des HAP de plus faibles poids moléculaires, plus solubles que ceux présents dans les sédiments.

2.5.4. Bioaccumulation par voie trophique

La bioamplification est l'augmentation des concentrations d'un polluant tout au long de la chaine trophique. Ainsi, les substances chimiques qui vont être absorbés par des organismes inférieurs vont progresser tout le long de la chaîne trophique par consommation de proies contaminées. Cependant, comme indiqué précédemment, les HAP sont très bien accumulés chez les organismes inférieurs tels que les invertébrés, et fortement métabolisés chez les vertébrés tels que les poissons, par conséquent et contrairement aux autre polluants organiques persistants, les HAP ne sont pas bioamplifiés dans les réseaux trophiques (Hylland, 2006; Varanasi et al., 1985).

Cependant, l'exposition aux HAP par voie trophique peut être une voie d'exposition importante pour les organismes qui se nourrissent de proies ayant de faibles capacités de métabolisation, tels que les bivalves ou les crustacés (Peterson et al., 2003).

2.5.5. Transfert vers la descendance

Actuellement, peu d'informations sont disponibles quant au transfert des HAP vers la descendance chez les poissons par comparaison avec d'autres polluants organiques (Daouk et al. 2011; Miller and Amrhein 1995; Miller et al. 1993; Monteverdi and Di Giulio 2000; Olsson et al., 1999). Néanmoins, Nye et al. (2007) ont récemment reporté, une forte influence des conditions de vie de femelles choquemort (*Fundulus heteroclitus*) sur la croissance et le

développement de leurs descendants. En effet, une exposition à des sédiments naturels contaminés réduit la croissance des larves et module leur ratio ARN:ADN (indice liant la croissance et les conditions nutritionnelles). D'autres travaux ont également montré un potentiel transfert de certains HAP (anthracène) vers les réserves vitellines des œufs chez la tête de boule (*Pimephales promelas*) (Tilghman Hall and Oris, 1991). Ces mêmes auteurs ont également enregistré des effets tératogènes des HAP (hémorragies, œdèmes, malformations des yeux et du sac vitellin) et des retards d'éclosion chez la descendance. Plus récemment, Pollino et al. (2009) ont démontré une corrélation positive entre l'occurrence de larves malformées avec les concentrations en naphtalène d'exposition chez les parents.

Les mécanismes de transfert des HAP vers les œufs sembleraient être liés à la production de vitellogénine chez les femelles matures. La vitellogénine, précurseur du vitellus de l'œuf du poisson et synthétisée par le foie au cours de la vitellogénèse servirait alors de vecteur de HAP au cours de l'ovogénèse (Monteverdi and Di Giulio 2000).

2.6. Biotransformation des HAP

Ces processus de biotransformations se déroulent principalement au niveau du foie chez les poissons. Une fois absorbés par les organismes, les HAP (composés lipophiles) vont être acheminés jusqu'au foie où ils se fixent aux membranes des cellules. Les cellules hépatiques vont alors métaboliser ces composés parents en des composés plus hydrosolubles dans le but de les rendre plus facilement excrétable par l'organisme, principalement via la bile rejetée dans les intestins mais aussi via l'urine produite par les reins (Lawrence and Hemingway, 2003; Tuvikene, 1995). La capacité de métabolisation des HAP varie très largement d'un organisme à un autre (Driscoll and McElroy 1996, 1997; McElroy et al. 2011). La biotransformation des HAP s'effectue en deux phases : une première dite de fonctionnalisation (ou phase I) vise à introduire un groupement fonctionnel sur la molécule afin de la rendre plus polaire ; tandis que la seconde phase dite de conjugaison (ou phase II) vise à conjuguer les métabolites issus de la première phase à des composés hydrosolubles pour faciliter leur excrétion (Jimenez et Stegeman, 1993; Pritchard 1993; Williams, 1959). Les mécanismes de biotransformations sont illustrés Figure 5.



Figure 5. Biotransformation métaboliques des HAP au sein d'un organisme exposé (d'après Lagadic et al. 1997).

Avant de décrire les caractéristiques fonctionnelles de ces deux phases de biotransformation, il convient de rappeler brièvement, les étapes d'initiation de ces réactions, dépendantes de facteurs de transcription, lorsque l'organisme se retrouve en contact avec un xénobiotique de type HAP.

2.6.1. Métabolisation par la voie du récepteur AhR

La biotransformation chez les organismes est initiée par une liaison spécifique avec un récepteur cytosolique aryl hydrocarbone (AhR) (Figure 6). Sous sa forme inactive, ce récepteur forme un complexe avec des protéines chaperonnes (Hsp90, XAP2, p23). La liaison du ligand (HAP) à ce récepteur va former un complexe entrainant une translocation vers le noyau cellulaire, dans lequel il sera dimérisé avec protéine ARNT (*AhR-nuclear translocator*). Ce complexe va ensuite se lier à une séquence spécifique de l'ADN, présente sur les promoteurs de gènes cibles XRE (*xenobiotic regulatory element*). La fixation de ce

complexe conduit à l'activation de la transcription des ARN messagers d'un grand nombre de gènes (e.g. cytochrome P450 1A1, *cyp1a1*). La traduction des ARNm en protéines va ensuite avoir lieu notamment pour les gènes codant pour les enzymes CYP1A, GST et UDPGT.



Figure 6. Métabolisation des HAP par la voie du récepteur AhR (D'après Guengerich, 1993).

2.6.2. Phase de fonctionnalisation (ou phase I)

Localisée essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique des cellules hépatiques chez les poissons, cette phase consiste à métaboliser les HAP par des réactions chimiques de type oxydation/réduction, grâce à divers systèmes enzymatiques, telles que les monooxygénases à cytochrome P450. Ces activités enzymatiques, notamment l'activité éthoxyrésorufine-o-dééthylase (EROD), vont permettre de biotransformer les HAP parents en composés plus hydrosolubles (e.g. phénols, époxydes) appelés métabolites. Certaines de ces composés peuvent être électrophiles et donc directement interagir avec certaines macromolécules comme l'ADN ou entraîner un stress oxydatif *via* la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Di Giulio and Hinton, 2008). Le métabolite produit étant plus hydrosoluble que la molécule mère, est alors pris en charge par les réactions de phase II.

2.6.3. Phase de conjugaison (ou phase II)

Les métabolites produits lors de la phase I, sont pris en charge par les enzymes de phase II (uridine diphosphate glucuronosyltransférase, UDPGT; glutathion S-Transférase, GST; sulfotransférase). Ces dernières vont ensuite greffer une molécule endogène très polaire sur le métabolite oxydé, le rendant ainsi plus facilement excrétable. Ces molécules hydrophiles sont les gluthations, les sulfates, les acides mercapturiques et glucuroniques.

Les xénobiotiques ainsi oxydés, puis conjugués sont hydrosolubles et donc plus facilement excrétables.

3. Toxicité des HAP

La toxicité est par définition la capacité inhérente à une substance de produire des effets délétères sur un organisme. De nombreuses études d'évaluation de la toxicité de HAP sont réalisées à partir de tests de toxicité aigüe et de toxicité chronique. La toxicité aigüe résulte d'une exposition à forte dose sur une durée courte (par rapport à la durée de vie de l'organisme). Elle conduit généralement à une mortalité des organismes exposés. Ce type d'exposition a surtout pour objectif d'établir des valeurs seuils d'innocuité des substances que l'on chercher à repérer. Selon le mode d'action toxique du polluant et les concentrations présentes dans l'environnement, les effets aigus sont visibles ou non sur des organismes exposés. La toxicité chronique fait suite à une exposition à un polluant à des concentrations plus faibles et sur une plus longue durée. Elle peut être évaluée par différentes mesures d'effets observables à plus long terme (reproduction, déformations, retard de croissance, survie...). En environnement aquatique, l'exposition aux polluants est majoritairement de type chronique du fait des divers rejets réguliers dans l'environnement (rejets domestiques, industriels). Une exposition aigüe peut survenir accidentellement dans le cas de déversements accidentels de polluants (marées noires, naufrages, ruptures d'oléoducs).

La toxicité des HAP va dépendre également de la biodisponibilité de ces composés, de la durée d'exposition, de la capacité des organismes à assimiler ces composés mais également de leur capacité à les métaboliser. En effet, les poissons étant capables de biotransformation, ils peuvent donc modifier les composés parents en des composés plus réactifs et généralement plus toxiques que les précédents (Figure 5). La toxicité des HAP sera donc modulée par les interactions avec les systèmes enzymatiques, qui sera également dépendants des propriétés intrinsèques du composé individuel et présenteront des effets toxiques caractéristiques de ces mêmes propriétés. Les HAP de faibles poids moléculaires vont avoir tendance à exercer une toxicité aigüe sur les organismes aquatiques, contrairement aux HAP de hauts poids moléculaires (excepté en conditions de forte luminosité pour lesquelles ils sont photoinduits) (Di Giulio and Hinton, 2008; Tilghman Hall and Oris, 1991; Tuvikene, 1995). Cependant, les HAP de hauts poids moléculaires (Tableau 4).

Les interactions les plus importantes sont celles qui vont lier les HAP aux macromolécules telles que les protéines, l'ADN et l'ARN ; il en résulte des dommages cellulaires, mutagènes, cancérogènes et tératogènes (van der Oost et al., 2003). De nombreuses études ont montré les effets toxiques des HAP. Certains HAP et leurs métabolites ont été décrit comme étant particulièrement génotoxiques, provoquant ainsi des lésions structurales de l'ADN telles que des cassures de brins (simple et double), des modifications de base, des pontages intra-brins, des intercalations ou encore des adduits à l'ADN (Akcha et al. 2003, 2004 ; Le Dû-Lacoste et al. 2013; Gravato and Santos 2002; Wessel et al. 2010b, 2012; Xue and Warshawsky 2005). Lorsqu'elles sont importantes, ces lésions à l'ADN peuvent engendrer des mutations. L'ADN devient alors instable et cela peut engendrer des dysfonctionnements des cellules somatiques, la cancérogénèse et/ou l'atteinte des cellules germinales, pouvant donc avoir des réelles conséquences sur les générations suivantes (Cachot et al., 2007; Hawkins et al., 1990, 1988; Menzie et al., 1992; Myers et al., 1994, 1991). De nombreux HAP (et leurs métabolites) peuvent également exercer des effets néfastes sur les mécanismes du stress oxydatif (Carney Almroth et al., 2008; Oliveira et al., 2008).

Les HAP peuvent induire des effets immunotoxiques et ainsi altérer les réponses immunitaires innées des poissons exposés (Reynaud and Deschaux, 2006). Des lésions cellulaires (e.g. inclusions hépatocellulaires, pléomorphismes nucléaires) associées à des processus spécifiques tels que l'apoptose, la nécrose et la régénération cellulaire, ainsi que des réductions de proliférations des leucocytes et des altérations des fonctions immunitaires associées (e.g. centres mélanomacrophage, inflammation) ont été montrées (Carlson et al., 2002; Kerambrun et al., 2012b; Lyons et al., 2004; Reynaud and Deschaux, 2006).

Ces dysfonctionnements cellulaires et tissulaires engendrées par les HAP peuvent être à l'origine de perturbations physiologiques. De nombreuses déficiences physiologiques ont ainsi été décrites suite à des expositions aux HAP au niveau des processus d'osmorégulation (Li et al., 2011), des performances cardiaques (Hicken et al., 2011; Incardona et al., 2011, 2009, 2004; Lema et al., 2007; Middaugh et al., 1996; Milinkovitch et al., 2013b), de la respiration ou encore de la croissance (González-Doncel et al. 2008; Heintz et al. 2000; Kerambrun et al. 2012; Kerambrun et al. 2011). Ces perturbations des systèmes physiologiques peuvent moduler directement le comportement des organismes, en altérant leurscapacité de fuite face à un prédateur, en augmentant leur temps de recherche alimentaire ou encore en modifiant leurs activité de migration ou de reproduction (Gonçalves et al., 2008). Ces effets sur le comportement peuvent être reliés également à de l'action neurotoxique des HAP.

Les HAP peuvent également induire des déficiences au niveau du système endocrinien (Cooper and Kavlock, 1997; Hawliczek et al., 2012). Un perturbateursest défini comme une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou sous-populations (Communauté Européenne, 1999). L'action toxique des perturbateurs endocriniens peut engendrer des altérations des mécanismes impliqués dans la régulation des hormones naturelles (production, transport, métabolisme). Ces perturbations peuvent avoir des conséquences sur le système reproducteur des poissons, entraînant des maturités précoces des femelles, des phénomènes d'intersexualité ou encore l'induction de vitellogénine (Harvey and Johnson, 2002; van der Ven et al., 2003). Ils peuvent également réduire la production d'œufs et l'infertilité chez les poissons (Heintz et al., 2000; Hoffmann and Oris, 2006; Johnson et al., 2002). Comme la plupart des cas exposés précédemment, l'action reprotoxique des HAP est maximale sur des animaux en développement et particulièrement lorsque l'exposition est réalisée aux stades embryonnaires, fœtaux ou larvaires.

Les stades précoces de développement (embryons-larves) des poissons exposés sont particulièrement sensibles aux substances chimiques, dont l'impact pourrait entraîner à long terme des effets irréversibles sur la survie et le recrutement des populations (Carls and Thedinga 2010; Carls et al. 1999; Heintz et al. 2000; Heintz et al. 1999; McGurk and Brown 1996; Muhling et al. 2012). Dans une étude compilant des données toxicologiques (ECETOC, Centre européen d'écotoxicologie et de toxicologie des substances chimiques), Hutchinson et al. (1998) ont évalué sur une base de valeurs de concentrations létales 50 % (CL50), que les embryons étaient dans 99 % des cas, plus sensibles ou aussi sensibles aux expositions de substances chimiques que les stades larvaires de poissons, qui eux même étaient plus sensibles (71 %) que les stades juvéniles. De la même manière, les juvéniles montrent une plus grande sensibilité que les stades adultes dans 92 % des substances testées. Les HAP ont été décrit comme étant embryotoxiques, provoquant ainsi de nombreuses anomalies de développement, tels que des œdèmes, des malformations squelettiques, cardiovasculaires, ou des retards de croissance (Carls and Thedinga, 2010; Carls et al., 1999; González-Doncel et al., 2008; Hose et al., 1996, 1982; Incardona et al., 2004; Marty et al., 1997; Nagel, 2002; Pollino and Holdway, 2002). Des retards ou des réductions de succès d'éclosion ont également été enregistrés (Vicquelin et al., 2011).

La sensibilité particulière des stades précoces de développement vis-à-vis d'une large gamme de substances, l'impact à long-terme que peuvent avoir ces composés sur les organismes exposés et leur rôle primordial dans la dynamique des populations, font des stades embryo-larvaires de poissons des organismes modèles adaptés pour l'évaluation des risques toxicologiques environnementaux.

La majorité des études portant sur la toxicité des HAP, se focalisent principalement sur des composés individuels (Carlson et al., 2004; Driscoll and McElroy, 1997; Incardona et al., 2011, 2006; Jones and Tiller, 1999; Patel et al., 2006; Wessel et al., 2012, 2010a; Willett et al., 2001). De plus, leur toxicité est bien souvent évaluée dans des conditions aigües d'exposition, ce qui permet de comprendre les mécanismes sous-jacents aux différentes perturbations observées et de connaître les propriétés toxiques intrinsèques des composés étudiés. Cela est conforme aux demandes de la réglementation REACH, mais d'un point de vue de l'évaluation des risques toxicologiques environnementaux et notamment dans le cadre de la DCE, ces conditions aigües ne sont pas représentatives de conditions réelles d'exposition des organismes. De plus, du fait de leurs multiples sources de production, les HAP sont généralement présents dans l'environnement sous forme de mélanges complexes. Cependant, lorsqu'ils sont testés en mélange, ils sont souvent associés à d'autres composés tels que les PCB et/ou les métaux lourds, lesquels peuvent interagir de manière synergique et engendrer des effets toxiques non spécifiques des HAP (Carls et al., 1999; Heintz et al., 1999; Incardona et al., 2010; Kerambrun et al., 2012b, 2012c; Meyer et al., 2002; Milinkovitch et

al., 2013a; Rice et al., 2000). Prenant en considération ces points évoqués, les résultats obtenus dans différentes études (éco)toxicologiques sont difficilement extrapolables/comparables en conditions environnementales et pour des mélanges « purs » de HAP.

4. Modèle biologique : le poisson zèbre

4.1. Présentation du modèle

Le poisson zèbre, *Danio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822), est un poisson téléostéen d'eau douce tropical de la famille des Cyprinidés (Figure 7). Sa répartition s'étend essentiellement au nord-est de l'Inde, du Népal, et du Bangladesh au niveau des bassins du Gange et du Brahmapoutre. Il vit dans les eaux des rizières (d'où son nom *Danio*, qui vient du bengali *Dahni* signifiant « de champs de riz »), les eaux stagnantes et les petits cours d'eau à faible débit dont la température peut varier de 6 à 38 °C en fonction de la saison (Engeszer et al., 2007; Spence et al., 2008).



Figure 7 Photo du poisson-zèbre, Danio rerio. Source : The Independent News UK – Photo : Alamy.

C'est un petit poisson, pouvant atteindre 4 cm à l'âge adulte, très apprécié par les aquariophiles pour sa robustesse et sa facilité d'élevage. Il s'acclimate facilement à la vie en aquarium où il vit en communauté dans des conditions de croissance et de reproduction généralement optimales (26-28 °C). Le dimorphisme sexuel est relativement bien marqué. La

femelle présente un oviducte au niveau de la papille ano-urogénitale en amont de la nageoire anale. Le mâle est quant à lui reconnaissable à sa grande nageoire anale de couleur jaune nettement plus marquée que chez la femelle. Le poisson zèbre atteint sa maturité sexuelle à 3 mois.

Ce poisson est couramment utilisé comme modèle vertébré dans les domaines de la recherche toxicologique, pharmacologique, de la biologie du développement et la génétique (Dooley and Zon, 2000; Fadool and Dowling, 2008; Kimmel et al., 1995; Maximino and Herculano, 2010; Spitsbergen and Kent, 2003). Son utilisation en neurophysiologie et pour l'étude du comportement s'est développée récemment (Fleisch and Neuhauss, 2006; Gerlai, 2011; Linney et al., 2004). Le génome du poisson zèbre est aujourd'hui entièrement séquencé (1.6.10⁹ paires de base) (http://zfin.org/). De plus, la disponibilité d'un grand nombre de lignées transgéniques et mutantes permet le suivi de nombreux gènes, fonctions physiologiques et développement d'organes spécifiques (Haffter et al., 1996).

4.2. Choix et intérêts du modèle en écotoxicologie

Le choix d'une espèce dans le domaine de la recherche toxicologique se base généralement sur plusieurs critères tels que la sensibilité de l'espèce aux toxiques étudiés, son intérêt économique, sa pertinence écologique et la faisabilité des expérimentations. Prenant en compte ces critères de sélection, il est difficile de mettre en œuvre des tests embryo-larvaires chez les poissons. En effet, la représentativité écologique de l'espèce utilisée, les coûts d'approvisionnement en géniteurs et les installations d'élevage ajoutent une difficulté supplémentaire à la faisabilité des expérimentations. Le poisson zèbre ne peut être considéré par exemple comme représentatif des milieux aquatiques de nos régions. Pour cela, il serait préférable d'utiliser des espèces endémiques plus appropriées. Cependant, la faisabilité des expérimentations sur les stades embryo-larvaires d'espèces endémiques est particulièrement difficile, considérant les cycles saisonniers de reproduction et les cycles de développement des espèces des régions tempérées. Le choix de l'espèce est donc une affaire de compromis. Ainsi, de par sa robustesse, sa facilité d'élevage, sa sensibilité «toxicologique » et les nombreuses informations déjà disponibles sur cette espèce, le poisson zèbre apparait comme un bon modèle pour l'évaluation de la toxicité intrinsèque de xénobiotiques (Hill et al., 2005; Spitsbergen and Kent, 2003).

De nombreux attributs le rendent particulièrement pratique à la manipulation expérimentale :

- La simplicité de maintenance des géniteurs en aquarium étant donné la petite taille de l'individu, réduisant ainsi les coûts d'installations ;
- Un cycle de vie court (maturité sexuelle à l'âge de trois mois) permettant son utilisation sur un cycle de vie complet ;
- Pas de saisonnalité de reproduction en conditions optimales d'élevage (26-28 °C) permettant d'obtenir des œufs toute l'année et ceci à des intervalles courts (5-7 jours);
- Une fertilité relativement grande avec plusieurs centaines d'œufs par ponte ;
- Le développement externe des œufs permettant un accès direct pour l'observation des embryons ;
- L'absence d'adhérence et la transparence des œufs facilitant leur manipulation et l'observation des différentes étapes de développement et leurs perturbations éventuelles;
- La perméabilité du chorion aux substances toxiques ;
- La rapidité de l'embryogénèse (éclosion entre 48-72 heures post-fécondation, hpf).

L'ensemble de ces avantages fait du poisson zèbre une espèce modèle recommandée par les lignes directrices de l'OCDE pour la réalisation de tests normalisés de toxicité sur les stades embryo-larvaires (OECD, 2013b, 1992). Depuis une vingtaine d'années, l'utilisation des stades précoces de poisson zèbre a ainsi émergé dans l'identification et l'évaluation des risques (éco)toxicologiques (Hill et al., 2005; Scholz et al., 2008; Strähle et al., 2012).

4.3. Cycle de développement du poisson zèbre

Le développement embryonnaire du poisson zèbre est bien décrit dans la littérature (Hisaoka and Battle, 1958; Kimmel and Law, 1985a, 1985b; Kimmel et al., 1995; Laale, 1977). Bien que des descriptions détaillées aient été rapportées sur le développement embryonnaire, très peu d'études décrivent le développement larvaire (Parichy et al., 2009). Les grandes étapes de développement du poisson zèbre sont résumées au sein de la Figure 8. Le cycle de vie du poisson zèbre peut être considéré comme rapide. Le développement embryonnaire dure 96 heures à 26-28 °C. Durant toute cette période, les embryons sont considérés comme des modèles *in vitro* et de ce fait ne tombent pas sous la législation définie

par les directives de l'UE sur la protection d'animaux utilisés dans un but scientifique. Une fois la fécondation activée, la première division cellulaire a lieu 0,75 hpf (stade 2 cellules). L'embryon est au stade blastula à 3 hpf (stade 1k-cellules), puis au stade gastrula à 5,3 hpf (stade 50 % d'épibolie). Au cours de la gastrulation, les précurseurs des muscles lents et rapides se mettent en place. Une période de segmentation a ensuite lieu pendant laquelle les premiers somites apparaissent à 10 hpf, l'organogénèse et la différenciation du système nerveux se mettent en place. A 24 hpf ou stade pharyngula, la plupart des organes sont développés, le sang circule dans l'embryon, et des mouvements coordonnés du tronc et de la queue apparaissent. L'éclosion a lieu ensuite entre 48 et 72 heures post-fécondation (hpf). Les larves sont capables de se mouvoir activement dès l'éclosion et se nourrir de façon exogène à partir de 120 hpf (stade d'ouverture de la bouche). Les nageoires continuent de se développer au cours des jours suivants, ainsi que le squelette des poissons. Le stade juvénile est atteint au bout de 21 jours post-fécondation (jpf) où la différenciation sexuelle des individus est possible. La maturité sexuelle est ensuite atteinte vers l'âge de 3 mois en conditions d'élevage optimales correspond à l'état adulte.



Figure 8. Schéma récapitulatif des grandes étapes de développement du poisson zèbre en relation avec les stades régulés ou non par l'UE et la durée des tests standards de toxicité (adapté de Embry et al. 2010).

5. <u>Approche multibiomarqueurs/multiéchelles</u>

5.1. Biomarqueurs: des outils pour l'évaluation des risques toxicologiques

Dans un contexte de gestion de substances chimiques nouvellement mises sur le marché et d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques, des stratégies d'évaluation des risques ont été développées. Outre l'utilisation des biotests, il est nécessaire de disposer en parallèle d'outils sensibles, fiables, rapides et à moindre coût afin d'évaluer la toxicité de ces substances chimiques tout en se conformant aux différentes réglementations en vigueur. De ce fait, l'évaluation des réponses biologiques des organismes face à cette pression environnementale apparaît indispensable afin de prévoir l'évolution d'un écosystème. Ces réponses vont intervenir à différents niveaux d'intégrations biologiques et vont dépendre de plusieurs facteurs : i) la durée d'exposition, ii) de la nature et la dose de xénobiotiques considérés, iii) du compartiment environnemental considéré et iv) des caractéristiques physiologiques et de la sensibilité des organismes considérés.

Le concept de biomarqueur a alors été développé pour le diagnostic précoce de ces réponses dans le but d'anticiper les effets irréversibles tardifs de xénobiotiques. Selon Depledge et al. (1993), un biomarqueur est défini comme un changement biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui peut être mesuré dans des tissus ou des fluides corporels ou au niveau de l'organisme entier mettant en évidence l'exposition et/ou les effets d'un ou plusieurs xénobiotiques.

Trois catégories de biomarqueurs peuvent être distinguées (van der Oost et al., 2003) :

 Les biomarqueurs d'exposition correspondent à des indicateurs de la présence d'un polluant dans les systèmes biologiques. Ils sont le résultat d'interaction entre un agent xénobiotique et une molécule ou cellule cibles au sein d'un organisme. Les plus communément utilisés sont les métabolites de HAP, les activités monooxygénases impliquant les cytochromes P450 (l'activité enzymatique EROD), les protéines de réserves des œufs (vitellogénine);

- Les biomarqueurs d'effet sont des modifications biochimiques, physiologiques, comportementales établies au sein d'un organisme dont les réponses, en fonction de leur intensité, peuvent être associées à un trouble ou une maladie. Cette catégorie de biomarqueurs inclue par exemple les mesures de l'intégrité de la structure de l'ADN (cassures, liaisons, dommages chromosomiques), les mécanismes de défenses (les espèces réactives de l'oxygène (ROS)), les enzymes antioxydantes (catalase, supéroxyde dismutase) et les réactions de peroxydation lipidique ;
- Les biomarqueurs de susceptibilité indiquent une capacité inhérente ou acquise d'un organisme à répondre à un xénobiotique spécifique.

Afin d'évaluer la biodisponibilité des HAP considérés, une batterie d'indicateurs d'évaluations de toxicité a été choisie dans cette étude et appliquée à quatre niveaux d'intégration biologique (Figure 9). Les indicateurs biologiques se situent au sein d'un ensemble de méthodes dont la rapidité de réaction et la signification écologique sont inversement proportionnelles. Cette approche prend donc en considération la pertinence toxicologique/écologique ainsi que la sensibilité et le temps de réponse des indicateurs dans le but de prédire l'impact à long terme de ces HAP sur les populations et les communautés de poissons.



Figure 9. Représentation schématique de l'approche intégrée menée dans le cadre de cette thèse, reliant la pertinence écologique, la sensibilité et les temps de réponse des indicateurs d'évaluation toxique et les cibles affectées par un xénobiotique (modifié d'après Adams et al. 1989).

5.2. Choix des marqueurs d'évaluation toxique des HAP

Un certain nombre de marqueurs d'évaluation de la toxicité des HAP ont été choisis sur une base d'analyse non invasive et individuelle.

5.2.1. Les métabolites : mesure de la bioconcentration des HAP

En raison de la faible bioaccumulation des HAP dans les organismes supérieurs et de la toxicité de leurs métabolites produits, il est donc nécessaire de rechercher les métabolites présents dans les organismes. Ces mesures permettront de renseigner le type de composés présents et leur biodisponibilité, ainsi qu'établir les liens de causes à effets. Habituellement analysées sur la bile de poisson, ces métabolites seront ici mesurés sur un broyat de larves. Ces mesures sont considérées comme des preuves évidentes d'exposition à la contamination, cependant, elles ne déterminent pas précisément les niveaux d'expositions du fait des différents processus biologiques intervenant dans leur détoxification et leur excrétion. Leurs mesures, à elles seules, ne donnent pas accès aux informations sur les effets biologiques résultants.

5.2.2. Détoxication et stress oxydatif : mesure de la biotransformation des HAP

L'éthoxyrésorufine-o-dééthylase (EROD) est une enzyme monooxygénase dépendante du cytochrome P450. L'induction des monooxygénases, qui permet la biotransformation de polluants hydrophobes en composés hydrosolubles, constitue une réponse de défense des organismes exposés aux polluants. En effet, ces activités de biotransformation vont être activées dans le but de limiter les interactions avec les composants cellulaires qui peuvent être délétères pour l'organisme. L'activité EROD est le biomarqueur le plus étudié jusqu'à présent chez le poisson de par son induction révélatrice et spécifique d'une exposition à des polluants majeurs de l'environnement tels que les HAP (Burgeot et al., 1994; Flammarion et Garric, 1997; Goksor et Förlin, 1992 ; Stegeman, 1987; van der Oost et al., 2003). Après plusieurs années d'expérimentations, l'activité EROD est actuellement utilisée comme outil de biosurveillance au sein du Réseau d'Observation Chimique du littoral (ROCCH) par l'Ifremer, pour lequel est considéré comme signal d'alarme précoce à la contamination. Dans le cadre de cette thèse, une méthode non invasive de mesure de l'activité est privilégiée et complétée par des analyses de cytochrome P450 1A (cyp1a) et AhR au niveau génique.

D'après Sies (1991), le stress oxydant est un déséquilibre entre les systèmes prooxydants et antioxydants en faveurs des premiers, et est sources d'effets toxiques potentiels. De la même manière, Halliwell (1987) définit le stress oxydant comme un processus qui intervient à la suite de la production de ROS et est synonyme de dommages. La production de ROS intervient durant la première phase de biotransformation des HAP en composés hydrosolubles. Les HAP peuvent exercer des effets néfastes par le biais de ces ROS lorsqu'elles sont en excès, et ainsi engendrer un stress oxydant conduisant à des effets cellulaires transitoires ou permanents au niveau protéique, lipidique ou encore au niveau de l'ADN (Di Giulio and Hinton 2008; Halliwell et Gutteridge 1999, Livingstone, 2001; Winston and di Giulio 1991). Afin d'intercepter ou inactiver ces ROS, les organismes ont développé des défenses antioxydantes. Parmi les systèmes de défenses antioxydantes les plus étudiés, on retrouve l'enzyme superoxyde dismutase (SOD) qui va catalyser la transformation d'oxygène singulet en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Le peroxyde d'hydrogène est ensuite transformé en oxygène et en eau par l'intermédiaire de la catalase (CAT) ou par l'intermédiaire de la glutathion peroxydase (GPx) qui permet la réduction du H₂O₂ par le glutathion réduit (GSH). Lors d'une contamination aux HAP, le déséquilibre entre la production de ROS et leur neutralisation par les systèmes antioxydants correspond au stress oxydant. Les systèmes des défenses antioxydantes sont des biomarqueurs capables de révéler précocement les effets d'une exposition à des contaminants chimiques (van der Oost et al., 2003). Cependant, il est nécessaire d'établir le lien entre le potentiel déséquilibre de ces systèmes avec des indicateurs de l'état de santé des individus afin d'établir leur capacité à prédire les éventuels effets tardifs au niveau populationnel (Depledge et al. 1993; 1995). Au sein de cette thèse, ces systèmes ont été évalués au niveau génique.

5.2.3. Les dommages à l'ADN: mesure de la génotoxicité des HAP

Compte tenu de l'implication du génome dans l'ensemble du métabolisme cellulaire, l'exposition à des composés génotoxiques peut affecter le développement, la reproduction et la survie des individus et compromettre la dynamique de croissance des populations. La capacité génotoxique d'un polluant à interagir avec la molécule d'ADN et son intégrité est un aspect important à considérer pour l'évaluation des effets toxiques sur les organismes vivants. L'action génotoxique des HAP peut entraîner des lésions primaires structurales de la molécule d'ADN, se traduisant par : des mutations dans la séquence de gènes, des mutations chromosomiques (aberrations chromosomiques, cassures, réarrangements) ou des mutations génomiques (modifications du nombre de chromosomes). Ces modifications de la structure peuvent être déterminées par différents marqueurs au niveau individuel. De par sa rapidité, sa simplicité et sa sensibilité, le test des Comètes (ou « Single cell gel electrophoresis ») a très vite été adopté comme outil d'évaluation de la pression génotoxique à laquelle sont exposés nombre d'organismes, dont les poissons (Akcha et al., 2003; Clément et al., 2004; Frenzilli et al., 2009; Kilemade et al., 2004; Singh et al., 1988; Tice et al., 2000). Ce test renseigne sur les niveaux de cassures simple et double brins de l'ADN (Singh et al., 1988). Outre les cassures de brins, il permet de détecter les cellules apoptotiques (cellules « hedgehog ») et certains dommages oxydants à l'ADN (Frenzilli et al., 2009). L'évaluation des cassures de brins à l'ADN chez les poissons est en majeure partie réalisée sur les érythrocytes (Akcha et al., 2003; Inzunza et al., 2006; Kim and Hyun, 2006; Vanzella et al., 2007). Récemment, le test des Comètes a été adapté pour évaluer ces dommages sur les stades précoces de développement des poissons (Kosmehl et al., 2008; Morin et al., 2011; Vicquelin et al., 2011).

L'apoptose (ou mort cellulaire programmée) joue un rôle crucial dans la morphogénèse et la régulation de l'homéostasie tissulaire (Cole and Ross, 2001; Kerr et al., 1972; Yamashita, 2003). Ainsi tout dysfonctionnement peut s'avérer délétère pour le développement de l'organisme et affecter divers processus physiologiques clés. Il a été démontré que de nombreux polluants (incluant les HAP, peuvent entrainer des dérèglements de ces systèmes chez les poissons (Frenzilli et al., 2004; Lundebye et al., 1999; Nigro et al., 2002; Reynaud and Deschaux, 2006; Weber et al., 2002). De ce fait, l'évaluation précoce de ces systèmes permettrait de prévenir d'éventuels dommages à l'ADN et des altérations physiologiques, comportementales et morphologiques des poissons exposés aux HAP. Une des techniques pour localiser ces cellules apoptotiques de manière in situ chez les embryons entiers, est la détection par kit TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling) (Dong et al., 2001; Parng et al., 2004). A défaut des prélèvements, l'analyse qualitative en complément des tests des Comètes n'a pas pu se faire dans cette thèse. Cependant, deux gènes impliqués dans ces systèmes ont été analysés : i) le gène suppresseur de tumeur p53, codant pour une protéine dont la fonction principale est de protéger l'organisme d'éventuelles proliférations de cellules tumorigènes. De ce fait, en cas d'activation due à un dysfonctionnement, il va soit déclencher l'arrêt du cycle cellulaire pour réparer d'éventuels dommages cellulaires, soit induire le suicide cellulaire ; ii) le gène *bax* codant pour la protéine proapoptotique Bcl2, associé au gène précédent, va participer également au suicide cellulaire en libérant des facteurs apoptogéniques mitochondriaux vers le cytosol de la cellule.

5.2.4. Le rythme cardiaque : mesure de la cardiotoxicité des HAP

A un niveau sublétal, la viabilité des organismes (capacité à survivre) peut être évaluée par des mesures physiologiques directes (performances cardiaques ou comportement) permettant d'extrapoler d'éventuels dysfonctionnements des mécanismes moléculaires et/ou cellulaires. Suite aux travaux d'Incardona et al. (2004; 2009; 2010; 2011) concernant les mécanismes sous-jacents aux différentes altérations cardiaques (performance, morphologie, vascularisation), ces auteurs ont proposé l'évaluation des pathologies physiques liées au cœur comme nouveau biomarqueur diagnostic d'exposition aux HAP. Le rythme cardiaque a alors été choisi comme marqueur de la cardiotoxicité des HAP afin de rendre compte de l'état énergétique du poisson exposé. En 1983, Priede a suggèré que lorsque le rythme cardiaque d'un organisme se rapproche de ses limites physiologiques, les chances de survie de celui-ci s'amenuisent. Ce marqueur sensible à la pression environnementale vise une mesure non invasive des mécanismes cardiovasculaires. De par la transparence des larves de poisson zèbre, cette technique est facile à mettre en place.

5.2.1. La réponse photomotrice: mesure de la toxicité comportementale des HAP

Actuellement, il est difficile de relier les marqueurs moléculaires, cellulaires, de défense ou de dommage classiquement utilisés à des effets présents à des niveaux d'intégration biologique supérieurs (Forbes et al., 2006). L'étude du comportement des organismes exposés peut alors servir de lien entre les processus physiologiques et écologiques. En effet, des dysfonctionnements neurologiques, des perturbations sensorielles, endocriniennes ou métaboliques ont été reportés à la suite d'exposition à des substances chimiques engendrant des modifications sur leurs activités locomotrices. Ces perturbations peuvent avoir des conséquences directes sur leur capacité de fuite (face à un prédateur), de recherche alimentaire (capture de proies) et sur le temps de recherche, sur les activités de migration ou encore sur la recherche d'un partenaire sexuel. Toutes ces perturbations résultent de modifications physiologiques qui peuvent donc à des niveaux d'intégration biologique supérieurs altérer la reproduction et le maintien des populations.

La toxicologie comportementale est une discipline permettant d'étudier l'impact de substances chimiques sur le comportement des organismes. Depuis une dizaine d'année, les tests comportementaux utilisant des larves de poisson zèbre ont émergé dans le domaine de la pharmacologie. Outre les avantages que confèrent ce modèle (cf. partie précédente), il possède de nombreuses caractéristiques communes aux modèles mammifères (e.g. rongeurs) couramment utilisés dans le domaine des sciences comportementales en termes de génome, de structure et de fonctionnement des systèmes nerveux et physiologiques. Plusieurs travaux récents ont montré que l'analyse des phénotypes comportementaux des larves de poisson zèbre pourrait prédire les mécanismes d'action toxique des substances chimiques (de Esch et al., 2012; Kokel and Peterson, 2011; Kokel et al., 2010; Rihel et al., 2010). Différents phénotypes comportementaux ont été mis en évidence tels que les réponses photomotrices (de Esch et al., 2012; Kokel and Peterson, 2011; Kokel et al., 2010; MacPhail et al., 2009), les réponses optomotrices (Orger et al., 2000; Roeser and Baier, 2003), les réponses optocinétiques (Emran et al., 2008; Roeser and Baier 2003), ou encore les activité spontanées (Saint-amant and Drapeau, 1998). La réponse photomotrice des larves de poisson zèbre, autrement dit la capacité des larves à répondre de manière motrice à un challenge lumineux semble être un outil d'évaluation comportementale sensible et non invasif pour évaluer les potentiels effets neurotoxiques des substances chimiques. Actuellement, aucune étude n'a encore évalué ces réponses vis-à-vis des HAP. Ces tests comportementaux sur larves de poisson zèbre pourraient donc être complémentaires aux tests traditionnels pour l'évaluation des risques écotoxicologiques.

5.2.2. Pathologie et morphométrie: mesure de la tératogénicité des HAP

Les effets tératogènes des HAP sont évalués à partir de marqueurs conventionnels utilisés dans les tests embryo-larvaires de poisson zèbre (ISO 15088 : ISO 2007). Un certain nombre de critères létaux et sublétaux d'évaluation morphologique ont été décrit afin d'évaluer l'action toxique de xénobiotiques et notamment les HAP (Braunbeck and Lammer, 2006; Lammer et al., 2009; Nagel, 2002). Ces critères morphologiques ont l'avantage d'être simple d'utilisation et informatifs sur l'état de santé globale de l'individu directement relié à

la qualité du milieu. Le détail de ces critères a été développé dans le chapitre suivant « Matériel et Méthodes ».

Des analyses morphométriques sont également réalisées par mesure directe de la longueur et de la surface de la larve de poisson zèbre. Ces analyses sont complémentaires aux critères précédents pouvant indiquer un potentiel dérèglement dans le développement. De plus, à travers les mesures de surfaces vitellines, une consommation précoce des réserves vitellines avec la contamination peut être mise en évidence de manière qualitative.

5.2.3. Éclosion et survie

Afin de relier tous ces marqueurs dans leur globalité, l'éclosion et la survie embryolarvaire peuvent être surveillés tout au long de l'exposition aux xénobiotiques. En effet, des altérations moléculaires, cellulaires, physiologiques ou comportementales pourraient se refléter directement sur ces deux paramètres et engendrer un réel déclin de la population exposée.

6. Objectifs de la thèse

Dans un contexte d'évaluation des risques environnementaux, le travail présenté ici vise à promouvoir l'utilisation de tests sur les embryons de poisson zèbre dans le but de développer une alternative et de limiter les tests de toxicité sur des animaux adultes (cf I. Réglementation liée à l'évaluation de la toxicité de substance chimique). Un des objectifs de ce travail était donc de mettre en place des tests spécifiques afin d'évaluer la toxicité de molécules hydrophobes, tels que les HAP qui ne peuvent être correctement évalués par simple test d'exposition par la voie aqueuse.

De nombreuses études reportent les effets toxiques des HAP. Cependant il est difficile d'extrapoler les données disponibles en milieu environnemental compte tenu : i) de la non représentativité des concentrations testées, ii) de l'exposition à de simples composés individuels ou encore iii) des potentielles interactions synergiques entre les composés présents dans les matrices considérées. De ce fait, le présent travail vise à étudier les effets d'expositions des poissons zèbre aux stades précoces à des mélanges de HAP par différentes voies (sédimentaires, dissoutes et voie maternelle) en se rapprochant de situations environnementales réalistes en termes de compositions et de doses utilisées.

L'utilisation des stades précoces de poisson zèbre comme méthode de remplacement en expérimentation animale serait grandement améliorée, si elle pouvait prédire les effets potentiels néfastes et à long-terme des composés chimiques à l'échelle de l'organisme et/ou de la population. Conjointement aux analyses chimiques permettant de caractériser les différents composés d'un mélange, la mesure de la réponse biologique d'un organisme est susceptible d'apporter une information intégrée sur l'état de santé de l'écosystème. De ce fait, une approche multibiomarqueurs visant différents niveaux d'intégration biologique a été développée afin d'évaluer la biodisponibilité des HAP vis-à-vis des stades précoces de développement du poisson zèbre. Bien que nombreux, il est difficile (voire impossible) de considérer l'ensemble des biomarqueurs sur un même espèce ou sur une population. Par conséquent, différents critères chimiques, moléculaires, physiologiques, comportementaux et morphologiques ont été sélectionnés afin d'évaluer les effets toxiques potentiels de ces composés à différentes échelles biologiques.

Ce travail porte l'accent sur le pouvoir prédictif des marqueurs d'effet à court-terme pour évaluer la réponse toxique à long-terme du xénobiotique considéré. La Figure 10 présente une représentation schématique de l'approche utilisée dans le cadre de cette thèse. Dans le respect des réglementations européennes, du principe éthique de l'expérimentation animale et des lignes directrices de l'OCDE, trois modes d'expositions ont été réalisées à travers cette approche expérimentale en laboratoire ; ceux-ci composent les différents chapitres de ce manuscrit.



Figure 10. Représentation schématique de l'approche intégrée utilisant les stades précoces de développement du poisson zèbre dans un contexte d'évaluation des risques chimiques (modifiée d'après Scholz et al., 2008).

Ce manuscrit est organisé suivant le modèle d'une thèse sur publications en quatre chapitres précédés de l'introduction visant à établir le contexte général (réglementaire et écotoxicologique).

Le premier étant un chapitre méthodologique, il présente les différentes expérimentations et les voies d'exposition considérées. Il décrit également les différents protocoles développés pour les outils d'analyses chimiques, moléculaires, physiologiques, comportementales et morphologiques.

Le chapitre II développe un protocole de standardisation d'une exposition par voie sédimentaire considérant un sédiment artificiel dans le but de se soustraire à de la variabilité dans le temps de la composition d'un sédiment naturel dont la toxicité des composés pourrait être controversée. L'ensemble des expérimentations de ce chapitre a été réalisé en étroite collaboration entre le laboratoire EPOC (équipe LPTC) de Bordeaux, dans le cadre de la thèse de F. Le Bihanic, et le laboratoire d'écotoxicologie de l'Ifremer l'Houmeau, dans le cadre de cette thèse. Ce chapitre fait l'objet de deux articles scientifiques soumis à la revue *Environmental Science and Pollution Research*. Le premier article rapporte les différentes

étapes de fabrication du sédiment artificiel à l'appui des tests de toxicité sur les stades précoces d'une seconde espèce modèle, le médaka japonais *Oryzias latipes*. Afin de valider la composition de ce sédiment artificiel, le second article compare les réponses toxiques biologiques du médaka japonais à celles du poisson zèbre à l'issu des expositions de ces poissons à deux HAP individuels, le benzo[a]pyrène et le fluoranthène. La mise en place d'un sédiment de référence devrait permettre ensuite d'évaluer la toxicité de mélanges de HAP chez les embryons et les larves de ces deux espèces.

Le chapitre III présente une approche permettant d'évaluer la toxicité de composés en mélange par voie aqueuse en isolant la fraction soluble d'un produit pétrolier. La méthodologie employée utilise une solution appelée WAF « Water-Accommodated Fraction » de deux types de produits pétroliers, un pétrole brut (*Brut Arabian Light* BAL) et un fuel lourd de type *Erika* (HFO). Cette étude consiste à analyser le niveau d'exposition des embryons et des larves de poisson zèbre à ces fractions solubles évaluant leurs réponses précoces à travers l'utilisation de différents critères de l'échelle moléculaire à l'organisme. Ce chapitre a fait l'objet d'un article scientifique préparé pour la revue *Aquatic Toxicology*.

Le chapitre IV explore à travers une approche multibiomarqueurs, une potentielle transmission parentale de la contamination en HAP vers la première génération descendante. De ce fait, la génération parentale de poisson zèbre a été exposée de manière chronique à trois fractions aromatiques, d'origine pyrolytique et pétrogénique via de l'aliment contaminé. Après six mois d'exposition, la descendance de ces poissons contaminés a été récoltée et la réponse biologique des stades précoces de développement a été évaluée. Ce chapitre a fait l'objet d'un article scientifique préparé pour la revue *Science of the Total Environment*.

Enfin, ce manuscrit se termine par une discussion générale et les perspectives de ce travail. Prenant en considération l'ensemble des points évoqués précédemment, les objectifs finaux de ce présent travail seront i) d'identifier des indicateurs (à différentes échelles) pertinents du mode d'action toxique des HAP, ii) d'établir à l'aide des essais sur les stades précoces de poisson zèbre, les effets à courts termes capable de prédire les effets toxiques à long-terme et iii) de définir les potentielles limites de ces méthodes alternatives.



CHAPITRE I MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. <u>Maintenance et production d'œufs de poisson</u> <u>zèbre</u>

1.1. Maintenance de l'élevage

Une lignée « sauvage » TU (Tübingen, Allemagne) de poisson zèbre a été utilisée pour l'ensemble des expérimentations de ce travail de thèse. Les poissons ont été maintenus en communauté de 20-30 individus (ratio 1:2, femelle:mâle) dans des bacs de 10 L. L'eau des bacs est un mélange composé aux 2/3 d'eau osmosée et 1/3 d'eau de conduite, les deux eaux étant au préalable passées sur filtres à particules et à charbon afin d'extraire certains composés chimiques tels que les métaux lourds. L'eau présente un pH à 7,5 \pm 0,5 et une conductivité de 300 \pm 50 μ S.cm⁻¹. Les bacs d'élevage sont placés dans des racks alimentés par un système ouvert de circulation d'eau. Un bullage constant est également maintenu pour assurer l'oxygénation du milieu (saturation en oxygène supérieure à 80 %). Chaque bac d'élevage est soumis à un taux de renouvellement de l'eau équivalent à un taux de renouvellement de 20 % par semaine. La température de l'eau et de la salle d'élevage est maintenue entre 26 et 28 °C avec une photopériode de 14:10 jour/nuit. Ces conditions d'élevage permettent aux poissons de maintenir un métabolisme relativement élevé afin de raccourcir le temps de génération et obtenir également des pontes régulières, importantes et de qualité. Les taux d'ammonium, nitrites et nitrates sont aussi surveillés régulièrement et gardés dans des gammes de valeurs recommandées par Lawrence (2007).

Les poissons étaient nourris deux fois par jour *ad libitum* avec des granulés INICIO Plus 0,5 (BioMar, France) et une fois avec des larves vivantes nauplii *Artemias* sp. (INVE, Belgium). En période de ponte, un repas supplémentaire composé de vers de vase était distribué (Boschetto-Frozen fish food) pour assurer un apport d'énergie optimal.

1.2. Production des œufs

Les embryons nécessaires aux différentes expérimentations ont été obtenus à partir d'une méthode nommée ici, « ponte en couple » où un mâle et une femelle, de taille équivalente ont été placés le soir dans un pondoir de 1 L. Les individus ont été séparés l'un de l'autre par un insert comprenant une maille de 1 mm. Le lendemain matin, à l'ouverture de la lumière (8h30), les deux individus ont été regroupés dans la partie supérieure de l'insert. La ponte a été déclenchée par la mise en contact des deux individus. Les œufs ont été collectés dans la partie inférieure du pondoir et séparés des géniteurs par l'insert évitant ainsi une prédation éventuelle sur les œufs pondus.

Les pontes collectées ont ensuite été triées et placées dans un milieu riche en sels nutritifs, appelé E3 et incubées à 28 °C jusqu'à leur utilisation. Selon les normes ISO7346/3 (1996), cette eau artificielle est composée de 0,33 mM $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$, 0,33 mM $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 5 mM NaCl et de 0,17 mM KCl.

2. Exposition par sédiment contact

Le Chapitre II faisant l'objet d'une mise au point de protocole sur sédiment contact, avec notamment la fabrication d'un sédiment artificiel, la procédure ne sera pas décrite dans ce chapitre.

2.1. Enrobage des sédiments avec des HAP individuels

L'enrobage sur une matrice sédimentaire a été réalisé en mettant en contact le sédiment avec un solvant dans lequel est solubilisé le composé d'intérêt dans un ballon de 250 mL. Le protocole d'enrobage du sédiment est adapté de Vicquelin et al. (2011). Le solvant utilisé pour l'enrobage est le dichlorométhane (DCM). Le solvant est ensuite évaporé avec un évaporateur rotatif à 45 °C (115 rpm) pendant 30 à 90 min suivant la quantité de sédiment et de ses caractéristiques physico-chimiques. La température d'évaporation est largement inférieure à celle de la volatilisation du composé d'intérêt. Une fois l'évaporation totale du solvant terminée, le composé d'intérêt se retrouve piégé dans le sédiment. Le sédiment ainsi enrobé est transféré dans des barquettes en aluminium et évaporé toute une nuit sous hotte aspirante afin d'éliminer les dernières traces de solvant. Un sédiment « contrôle solvant » (dichlorométhane sans HAP) est préparé de manière similaire. Le sédiment enrobé est ensuite aliquoté pour les analyses chimiques (conservation à -20 °C), puis conservé à température ambiante et à l'obscurité. A noter que le sédiment enrobé est généralement utilisé 1 semaine après enrobage pour les expérimentations, afin de limiter une éventuelle dégradation des composés.

2.2. Caractérisation chimique des sédiments enrobés

Les quantifications des HAP individuels enrobés sur la matrice sédimentaire ont été effectuées par le laboratoire LPTC-EPOC de l'Université de Bordeaux 1 pour les sédiments naturels et par Florane Le Bihanic pour les sédiments artificiels.

Les composés organiques sont extraits à partir d'échantillon de 0,2 g de sédiment utilisant une procédure d'extraction assistée par micro-onde (10 min à 30 W) avec du DCM selon Budzinski et al. (2000). Des étalons internes sont ajoutés dans chaque échantillon avant extraction. Les échantillons sont ensuite reconcentrés dans 300 µL d'isooctane utilisant un système d'évaporation sous vide (Rapidvap Labconco, Kansas city, USA). Deux étapes de purification et de fractionnement sont ensuite réalisées sur microcolonnes d'alumine et de silice suivant la procédure décrite par Behar et al. (1989). La première permettant de retenir les composés polaires et la seconde permettant la séparation des saturés et insaturés et des composés aromatiques. Les extraits sont ensuite élués dans 3x5 mL de DCM. Finalement, ces extraits sont reconcentrés dans de l'isooctane. Les composés ont été caractérisés par Chromatographie Gazeuse couplée à un Spectromètre de Masse (GC/MS) selon Baumard et al. (1998).

2.3. Exposition embryo-larvaire par sédiment contact

Les œufs fécondés et normalement développés ont été sélectionnés au stade 8 cellules (1h15 post-fécondation) sous loupe binoculaire. Seules les pontes ayant un taux de fécondation supérieur ou égal 70 % ont été utilisées. Un mélange de 5 pontes minimum a été utilisé afin d'éviter un éventuel « effet ponte ». Les expositions ont été réalisées en boîtes de Petri en plastique (35 mm de diamètre) contenant 3 g de sédiment poids sec et 3 mL de E3. Trente embryons ont été ajoutés par boîte et placés sur une grille thermoformée de 1 mm (Nytex®) afin d'éviter leur enfouissement dans le sédiment. Les embryons ont été exposés pendant 96 heures au sein d'une étuve à 28 ± 0.5 °C avec une photopériode similaire à celle de la salle d'élevage. Pendant l'exposition, les boîtes de Petri étaient recouvertes d'un
couvercle évitant une trop grande évaporation du milieu. A la fin de l'exposition, les larves ont été transférées dans une nouvelle boîte de Petri (plastique, 100 mm de diamètre) contenant 30 mL de E3.

3. Exposition par WAF de pétrole

3.1. Préparation d'une WAF

Une WAF (Water-Accommodated Fraction) de pétrole est une solution aqueuse contenant les molécules hydrosolubles d'un produit pétrolier. Cette solution est préparée selon les procédures établies par le CROSSERF (Chemical Response to Oil Spills - Ecological effects Research Forum) (Singer et al., 2000). Une WAF correspond à l'équilibre de composés présents dans une nappe de pétrole, une phase gazeuse (dite "headspace") et une phase aqueuse (les molécules les plus solubles étant également les plus volatiles). Deux types de produits pétroliers sont testés: un pétrole brut de type Brut Arabian Light (BAL 110) et un fuel lourd provenant de type *Erika* (HFO, n°2). La WAF a été préparée avec un volume de 1,7 L de E3 dans une bouteille en verre de 2 L (Figure 11). Le produit pétrolier était déposé doucement à la surface de ce volume d'eau aux concentrations de 103 mg de pétrole.L⁻¹ d'eau pour le BAL et de 55 mg de pétrole.L⁻¹ d'eau pour le fuel de l'Erika. Durant 24 heures, la solution est faiblement agitée à l'aide d'un agitateur magnétique pour que la nappe de pétrole se disperse à la surface sans former de vortex ou de gouttelettes de pétrole, favorisant ainsi la solubilisation des molécules les plus solubles dans la colonne d'eau. Après cette période d'agitation, la WAF a été mise en repos pendant 30 minutes avant prélèvement. Pour maintenir un bon équilibre dans la préparation de la WAF, toute la procédure a été réalisée dans une salle climatisée (21 °C) et à l'obscurité afin d'éviter les phénomènes de photooxydation. La WAF a ensuite été prélevée par le robinet située en bas de la bouteille (50 % du volume total prélevé au maximum). Durant toute la durée d'exposition embryo-larvaire, la WAF mère a été conservée à 4 °C et à l'obscurité.



Figure 11. Dispositif expérimental de la préparation d'une « Water-Accommodated Fraction » WAF. A : Déversement de la nappe de pétrole à la surface de l'eau, B : Etape d'agitation à l'obscurité.

3.2. Dosage des composés dissous par SPME

Les échantillons de WAF ont été conservés à -20 °C avant analyse. Les concentrations dissoutes des composés présents dans les WAF ont été mesurées par une procédure SPME (microextraction sur phase solide) combinée à une analyse GC/MS. Durant toute la procédure d'exposition, les milieux (anciens et nouvellement ajoutés) ont été échantillonnés quotidiennement dans des flacons SPME de 10 mL. Chaque échantillon était composé d'un pool de 5 réplicas et l'analyse chimique effectuée sur deux réplicas d'expérience pour chaque type de WAF testé. Les analyses SPME ont été réalisées au sein du laboratoire LPTC-EPOC de Bordeaux selon le protocole de Kanan (2012). Pour ce faire, une solution d'étalons internes est ajoutée dans chaque échantillon avant extraction. Cette solution est composée de 19 HAP deutérés préparés dans l'éthanol et présentés dans le Tableau 6. Les extractions étaient entièrement automatisées avec un autoéchantillonneur (Gerstel® MPS2XL, Suisse) composé d'une fibre en PolyDiMéthylSiloxane (PDMS 100 µm, Supelco, Sigma-Aldrich, Afrique du Sud). L'échantillon a été incubé 3 min à 40 °C avec agitation magnétique (vitesse d'agitation : 250 tr.min⁻¹). La fibre était ensuite immergée dans le flacon pendant 1 h à 40 °C tout en étant agité à 250 tr.min⁻¹. Après la phase d'extraction, la fibre était thermiquement désorbée dans l'injecteur pendant 10 min à 270 °C. Un blanc d'analyse a été réalisé pour s'assurer de l'absence de contamination avant et pendant l'analyse.

			Ion de quantification IO (m/z)	
Composés natifs	Abréviations	Composés deutérés	IQ natifs	IQ deutérés
Naphtalène*	Ν	Naphtalène-d ₈	128	136
1-Méthylnaphtalène	1-MN	Naphtalène-d ₈	128	142
2-Méthylnaphthalene	2-MN	Naphtalène-d ₈	128	142
∑Diméthylnapthtalène	∑DMN	Naphtalène-d ₈	128	156
∑Triméthylnapththalène	∑TMN	Naphtalène-d ₈	128	170
∑Tetraméthylnaphthalène	∑TeMN	Naphtalène-d ₈	128	184
Acénaphtylène*	Acy	Acénaphtylène-d ₈	152	160
Acénaphtène*	Ace	Acénaphtène-d ₁₀	154	164
Fluorène*	F	Fluorène-d ₁₀	166	176
Phénanthrène*	Р	Phénanthrène-d ₁₀	178	188
1-Méthylphénanthrène	1-MP	Phénanthrène-d ₁₀	192	188
2-Méthylphénanthrène	2-MP	Phénanthrène-d ₁₀	192	188
3-Méthylphénanthrène	3-MP	Phénanthrène-d ₁₀	192	188
∑Diméthylphénanthrène	∑DMP	Phénanthrène-d ₁₀	206	188
∑Triméthylphénanthrène	∑TMP	Phénanthrène-d ₁₀	220	188
Anthracène*	Ant	Anthracène-d ₁₀	220	188
2-Méthylanthracène	2-MAnt	Anthracène-d ₁₀	192	188
[9+4]-Méthylphénanthrène + 1-Méthylanthracène + 4,5- Méthylphénanthrène	[9+4]-MP + 1- MAnt + 4,5-MP	Phénanthrène-d ₁₀	192	188
Dibenzo[b,d]thiophène	DB[b,d]T	Dibenzo[b,d]thiophène-d8	184	192
1-Méthyldibenzothiophène	1-MDBT	Dibenzo[b,d]thiophène-d ₈	198	192
3,2-Méthyldibenzothiophène	3,2-MDBT	Dibenzo[b,d]thiophène-d ₈	198	192
1-Méthyldibenzothiophène	1-MDBT	Dibenzo[b,d]thiophène-d ₈	198	192
2,1-Dibenzonaphtothiophène	2,1-D	Chrysène-d ₁₂	234	240
Fluoranthène*	Fluo	Fluoranthène-d ₁₀	202	212
Pyrène*	Pyr	Pyrène-d ₁₀	202	212
Benzo[a]anthracène*	BaA	Benzo[a]anthracène-d ₁₂	228	240
Chrysène* + Triphénylène	Chrys	Chrysène-d ₁₂	228	240
∑Méthylchrysène	∑Mchrys	Chrysène-d ₁₂	242	240
Benzo[b+j+k]fluoranthène*	B[b+j+k]Fluo	Benzo[b+j+k]fluoranthène-d ₁₂	252	264
Benzo[e]pyrène	B[e]P	Benzo[e]pyrène-d ₁₂	252	264
Benzo[a]pyrène*	B[a]P	Benzo[a]pyrène-d ₁₂	252	264
Pérylène	Per	Pérylène-d ₁₂	252	264
Indéno[1,2,3-cd]pyrène*	I[1,2,3-cd]Pyr	Indéno[1,2,3-cd]pyrène-d ₁₂	276	288
Benzo[g,h,i]pérylène*	B[g,h,i]Per	Benzo[g,h,i]pérylène-d ₁₂	276	288
Dibenzo[a,h]+[a,c]anthracène*	D[a,h]+[a,c]Ant	Dibenzo[a,h]+[a,c]anthracène-d ₁₄	278	292

Tableau 6. Liste des composés dosés en SPME-GC/MS et les 19 étalons internes deutérés pour quantification.

*Substances classées prioritaires par l'Agence de Protection Environnementale américaine (US-EPA)

Un total de 40 composés a été détecté et quantifié pour chaque échantillon. Ces composés cibles correspondent à 16 HAP préconisés dans la norme EPA610, deux HAP parents (benzo[e]pyrène et pérylène), deux composés aromatiques soufrés (dibenzo[b,d]thiophène et 2,1-dibenzonaphtothiophène) et 20 composés méthylés associés. L'analyse a été effectuée par GC/MS. La séparation des composés a été effectuée par un chromatographe en phase gazeuse GC7890 (Agilent Technology, Californie, USA) équipé d'un système d'injection multifonctions. Les composés sont vaporisés à 250-300 °C et caractérisés par leur temps de rétention dans la colonne capillaire HP-5MS-UI (Agilent Technology) : 30 x 0,25 mm ID x 0,25 µm (épaisseur de film). Le gaz vecteur est de l'hélium à débit constant. Le chromatographe est couplé à un détecteur par spectrométrie de masse MSD 5973 Agilent (Impact électronique: 70 eV, tension: 2000 V) permettant ainsi l'identification des composés ionisés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z), issus des ions générés. La quantification des composés est effectuée par analyse SIM « Single Ion Monitoring » des ions caractéristiques de chaque composé étudié. Les surfaces chromatographiques obtenues, à un temps de rétention donné, pour chaque composé de l'échantillon ont été intégrées manuellement (Figure 12). Les résultats obtenus ont été alors rapportés et corrigés à ceux de la gamme d'étalons internes.



Figure 12. Chromatogramme des composés fluoranthène et pyrène et leurs deutérés associés issu de l'analyse en GC/MS.

3.3. Exposition embryo-larvaire

Les expositions embryo-larvaires ont été réalisées dans des cristallisoirs en verre de 20 mL en condition statique. Trente embryons au stade 8 cellules (1h15 post-fécondation) ont été transférés dans 10 mL de WAF dans chaque cristallisoir. Un contrôle E3 (sans solution de WAF) a été réalisé également en cinq réplicas. Les cristallisoirs ont ensuite été recouverts de parafilm afin de limiter toute évaporation de la WAF et incubés à 28 ± 0.5 °C pour une exposition de 96 hpf. Un renouvellement des solutions de WAF et du milieu E3 était réalisé quotidiennement durant l'exposition. A la fin de l'exposition (96 hpf), les larves ont été transférées en boîte de Petri (Plastique, 50 mm de diamètre) contenant 15 mL de E3 jusqu'à 15 jpf.

4. <u>Exposition par voie trophique / Etude de la</u> <u>descendance</u>

L'ensemble des analyses chimiques (extraction, enrobage, caractérisation) a été réalisé par le laboratoire LPTC-EPOC de l'Université de Bordeaux 1.

4.1. Analyses chimiques

Trois fractions aromatiques d'origine différente ont été utilisées dans le cadre de ces expositions par voie trophique. Une fraction aromatique d'origine pyrolytique a été extraite à partir d'un sédiment prélevé en amont de l'estuaire de Seine (Oissel, France). Cette estuaire est reconnu pour être hautement influencé par les activités anthropiques, et par conséquent recevant une large variété de polluants, dont les HAP avec un profil essentiellement pyrolytique (Cachot et al. 2006; Cachot et al. 2007). Deux fractions aromatiques d'origine pétrogénique ont également été choisies provenant des mêmes pétroles utilisés pour les expositions par WAF, le pétrole brut de type *Arabian Light* et le fuel lourd de type *Erika*.

4.2. Extraction des fractions aromatiques

La fraction aromatique de la matrice sédimentaire Oissel a été extraite à partir d'une extraction accélérée par solvant (ASE) au moyen de l'extracteur automatique Dionex® ASE300. Les HAP ont été désorbés avec du DCM porté à haute température et haute pression suivant les conditions d'extraction des échantillons reportées dans le Tableau 7. Les échantillons ont été extraits sur cellule 34 mL (13-14 g de sédiment par cellule). L'extrait a été ensuite récupéré dans des flacons ASE puis transféré dans un ballon en verre 250 mL. Le solvant a été évaporé à l'aide d'un évaporateur rotatif Rotavap (RV10 Basic, VWR International) équipé d'un bain marie (HB10 Basic, VWR International). L'évaporation du solvant n'a pas été totale afin d'éviter de perdre les HAP de faibles poids moléculaires. Au total, 24 mL d'extrait aromatique ont été obtenus à partir de 2400 g de sédiment.

Les fractions aromatiques des deux produits pétroliers ont été extraites de manière similaire.

Solvant	Dichlorométhane 100 %
Temps de chauffage	5 min
Temps statique	5 min
Temps de purge	60 s
Volume de rinçage (%)	60 vol
Nombre de cycles	2
Température	100 °C
Pression	100 bars

Tableau 7. Conditions d'extraction des échantillons.

4.3. Purification et caractérisation des fractions aromatiques

Deux étapes de purification des extraits ont ensuite été réalisées successivement sur macro colonne d'alumine et de silice. La première étape étant réalisée deux fois permet d'éliminer les macromolécules, les molécules polaires et le soufre élémentaire et la seconde élimine la phase aliphatique et permet de récupérer ainsi la phase aromatique de l'extrait. Avant purification, une étape de conditionnement de la colonne d'alumine (150 g) a été réalisée réalisé en ajoutant 200 mL de DCM 100 %. Le solvant a ensuite été évaporé sous vide et l'extrait organique déposé en tête de colonne puis purifié sur alumine. L'extrait a été ensuite élué en bas de colonne avec 8x200 mL de DCM 100 % successifs sous vide et le

solvant évaporé sous flux d'azote. Les échantillons ont été finalement élués dans un second solvant, l'isooctane, puis reconcentrés au Rotavap (RV10 Basic, VWR International). La seconde purification sur macro colonne de silice (150 g) a été ensuite effectuée de manière similaire. Le DCM a été remplacé par le pentane qui permet l'élution de la phase aliphatique. Une fois cette phase récupérée et supprimée, les échantillons ont été élués avec 8x200 mL d'une solution pentane/DCM (65/35, v/v) récupérant ainsi la fraction aromatique de l'extrait. Les échantillons ont été finalement reconcentrés au Rotavap et conservés à -20 °C.

Les extraits ont été caractérisés par couplage GC/MS comme décrit dans la partie précédente : « exposition par WAF de pétrole ».

4.4. Enrobage de l'aliment aux fractions aromatiques

Quatre granulométries ont été préparées à partir de granulés INICIO Plus 0,5 mm (Biomar, France) : $\leq 125 \mu$ m, 125-315 µm, 315-500 µm et $\geq 500 \mu$ m. Chaque classe de taille d'aliment a été ensuite enrobée avec la fraction aromatique extraite. La procédure d'enrobage était similaire à celle des sédiments. Brièvement, une quantité donnée de granulés a été mis en contact avec un solvant DCM dans lequel est solubilisé l'extrait aromatique dans un ballon en verre de 250 mL. Le solvant est évaporé (en totalité) avec un évaporateur rotatif (RV10 Basic, VWR International) équipé d'un bain marie (HB10 Basic, VWR International) à 45 °C. L'aliment enrobé a été ensuite transféré dans des barquettes aluminium et évaporé toute une nuit sous hotte aspirante afin d'éliminer les résidus de solvant. Un contrôle solvant (DCM sans extrait aromatique) a été préparé de manière similaire. L'aliment enrobé a été conservé à 4 °C et à l'obscurité.

Pour chacune des trois fractions aromatiques, pyrolytique et pétrogéniques (léger et lourd), trois concentrations sont choisies pour évaluer les effets d'un niveau environnemental à un niveau toxicologique : 0,3X, 1X et 3X. Les concentrations nominales environnementales (1X) sont représentatives des concentrations retrouvées en HAP totaux chez les mollusques dans les sédiments de l'estuaire de Seine. Cette concentration cible est de 5 μ g.g⁻¹ de nourriture poids sec.

4.5. Exposition de la génération parentale (F₀)

Les œufs fécondés et normalement développés ont été sélectionnés sous loupe binoculaire. Dans nos conditions, le taux de fécondation des pontes était supérieur ou égal 80 %. Les œufs viables ont été incubés à 28 ± 0.5 °C par lot de 50 en boite de Petri (plastique, 100 mm de diamètre) contenant 30 mL de E3. A 24 hpf, l'ensemble des pontes récoltés (minimum de 5 pontes) ont été mélangés au sein d'une grande boîte de Petri (plastique, 145 mm de diamètre) contenant 100 mL de E3 et redistribués en boite de Petri par lot de 50. Les embryons ont été replacés dans une étuve à 28 ± 0.5 °C avec une photopériode similaire aux conditions d'élevage jusqu'à 5 jpf. Après éclosion, les chorions des embryons sont supprimés des boites. A 5 jpf, les larves ont été transférées dans des pondoirs de 1 L (AquaSchwarz, Allemagne) contenant 100 mL de E3. Le premier repas des larves avec l'aliment enrobé à une fraction aromatique a été donné à cette date. Un volume de 150 mL d'eau (2/1, v/v, eau osmosée/eau de conduite) était ajouté quotidiennement dans les pondoirs. A 12 jpf, les larves ont été transférées dans des cylindres en Plexiglas[©] (15 cm de diamètre, 17 cm de hauteur) placés au sein des bacs d'élevage 10 L (Ehret type III cage, polycarbonate PC 3108, 265x150x240 mm) évitant ainsi un trop gros volume de nage. Le fond des cylindres est constitué d'une maille de 500 µm laissant alors passer l'eau nécessaire aux larves. Les cylindres ont ensuite été retirés à 27 jpf afin que les juvéniles prennent possession de la totalité du volume du bac d'élevage. Les bacs d'élevage placés dans des racks étaient alimentés par un système ouvert de circulation d'eau similaire aux conditions standards d'élevage. Un bullage constant était maintenu pour assurer l'oxygénation du milieu. Chaque bac d'élevage était soumis à un taux de renouvellement de l'eau équivalent à 180-200 mL par heure, correspondant à un taux de renouvellement journalier de 40 %. Les bacs d'élevage étaient nettoyés quotidiennement et les morts éventuels comptabilisés et retirés.

Le premier repas a été donné à partir de 5 jpf, stade correspondant à l'ouverture de la bouche des larves. Les poissons ont été nourris deux fois par jour avec l'aliment sous forme de granulés (InicioPlus, Biomar, France) enrobés à une fraction aromatique et une fois par jour avec des larves vivantes nauplius *Artemias sp.* non-contaminées. La taille des granulés distribués était taille/âge -dépendants des poissons suivant le protocole exposé en Figure 13. Les poissons ont été nourris manuellement *ad libitum* au début de l'expérience puis à 2 % de la biomasse des individus à partir de 1 mpf.



Figure 13. Schéma expérimental de la distribution des classes de taille des granulés âge dépendant des organismes.

4.6. Production et récolte de la descendance (Génération F₁)

Les pontes des poissons matures ont été recueillies après 6 mois d'exposition à l'aliment enrobé avec une fraction aromatique de pétrole selon deux méthodes utilisées en alternance :

- Méthode 1 Ponte en batch: Trois pondoirs de 1 L avec insert comprenant une maille de 1 mm sont placés directement dans chaque bac d'élevage la veille au soir. La ponte est déclenchée à l'ouverture de la lumière le lendemain matin (8h30). Les œufs sont ensuite collectés 30 minutes à 1 heure après le déclenchement des pontes.
- Méthode 2 Ponte en couple: Un male et une femelle, de taille équivalente, sont placés la veille au soir dans un même pondoir de 1 L. Les individus sont séparés l'un de l'autre par un insert. Ils sont ensuite regroupés le lendemain matin, à l'ouverture de la lumière déclenchant ainsi la ponte. Cette méthode stimule les poissons et permet d'obtenir un plus grand nombre d'œufs pour les analyses.

Les œufs récoltés sont ensuite triés : les œufs fécondés et non fécondés sont comptés afin de déterminer les taux de fécondation de chaque ponte émise par couple de poisson. Ces résultats ne rentrent pas dans le cadre de ma thèse et seront exposés par Caroline Vignet. Les œufs fécondés ont été placés par lot de 30 dans des boîtes de Petri (plastique, 100 mm de diamètre) contenant 30 mL de E3. Les boîtes de Petri, ainsi que le milieu E3 ont été renouvelés quotidiennement pour favoriser une bonne oxygénation des embryons. Les embryons ont été incubés à 28 ± 0.5 °C le temps des analyses.

5. Analyses de paramètres biologiques

5.1. Survie et éclosion

Lors de chaque expérience, la survie des embryons et des larves de poisson-zèbre a été enregistrée quotidiennement jusqu'à 10 jpf dans le cas des expériences par sédiment contact et prolongée jusqu'à 15 jpf pour les expositions via des WAF de pétrole. Le temps de suivi a été augmenté pour évaluer la capacité des larves à puiser dans leurs réserves vitellines (Örn et al., 1998). Un pic de mortalité « normal » est observé aux alentours du 10^{ème} jour. Un individu est considéré mort lorsqu'il présente un ou plusieurs critères suivants : absence de battements cardiaques, queue non détaché, absence de développement des somites et coagulation de l'embryon. Les embryons et larves morts ont été supprimés quotidiennement.

Le taux de survie au temps t est calculé à partir de la formule suivante :

Taux de survie au temps t (%) =
$$\frac{Nombre d'individus mort au temps t}{Nombre d'individus vivant au temps t0} \times 100$$

L'éclosion chez le poisson-zèbre a lieu habituellement entre 48 et 72 hpf. Les individus éclos sont comptabilisés pendant cette période puis à 96 hpf pour éventuellement noter un retard de développement.

Le taux d'éclosion au temps t a été calculé à partir de la formule suivante :

$$Taux \, d'éclosion \, au \, temps \, t \, (\%) = \frac{Nombre \, d'individus \, éclos \, au \, temps \, t}{Nombre \, d'individus \, vivant \, au \, temps \, t} \times 100$$

5.2. Malformations et analyses biométriques (96 hpf)

A la fin de chaque exposition (96 hpf), les larves ont été prélevées afin d'observer attentivement la présence de potentielles malformations et mesurer différents paramètres biométriques. L'observation des malformations s'effectue sous loupe binoculaire (Olympus SZX9, 10x). Après anesthésie sous benzocaïne à 16 μ g.L⁻¹, les individus ont été immobilisés en position latérale gauche dans de la méthylcellulose à 3 %, puis photographiés avec une caméra couleur (DMK 31AU03) et le logiciel IC Capture 2.2 (The Imaging Sources, Allemagne). Basées sur les critères morphologiques de Lammer et al. (2009), six catégories de malformations sublétales ont été notées et présentées dans le Tableau 8.

Tableau 8. Malformations sublétales mesurés chez les larves de 96 hpf basées sur Lammer et al. (2009).

Malformations sublétales

Œdèmes: Cérébral, péricardique et/ou périvitellin
Malformations squelettiques: Courbure, malformation de la queue, scoliose, lordose, cyphose
Malformations cranio-faciales: Hyperplasie/hypoplasie crânienne, de l'œil + défaut de pigmentation, de la mâchoire
Anomalies cardiovasculaires: Hémorragie/Anémie, atrophie, hypertrophie/dystrophie des chambres cardiaques
Malabsorption du sac vitellin: Malabsorption des réserves vitellines
Anomalie de la vessie natatoire: Absence/présence de vessie natatoire

Des exemples de malformations sublétales pouvant être observées chez une larve de poisson zèbre sont représentés Figure 14.

En plus du pourcentage d'individus affectés et du pourcentage de chaque pathologie observée, l'occurrence et la gravité de ces pathologies ont été quantifiées à partir d'un système de score variant de 0 à 3 : (0) larve saine, aucune pathologie, (1) une malformation dans l'une des catégories présentées ci-dessus ou larve peu affectée, (2) deux malformations ou larves affectées (hors capacité de nage) (3) multiples malformations (supérieure ou égale à 3) ou larve sévèrement affectée.



Figure 14. Exemples de malformations sublétales pouvant être observées chez une larve de 96 hpf. A) Larve contrôle en position latérale gauche. B) larve avec hyperplasie des yeux, C) larve avec hémorragie en périphérie du sac vitellin, D) larve avec des œdèmes péricardiaque et vitellin, et une malformation squelettique de type lordose, E) larve sévèrement affectée par un ensemble d'œdèmes, de malformations squelettiques et cranio-faciales, F) une courbe de queue, G) un œdème du cerveau et une malformation de la mâchoire et H) une anomalie dans le développement et positionnement du cœur.

A partir des photographies en vue latérale gauche, différents paramètres biométriques sont mesurés afin d'évaluer la croissance et le bon développement de la larve: la longueur de la tête (de la mâchoire inférieure à l'opercule de l'oreille interne), la longueur standard (de la mâchoire inférieure au point terminal de la queue sans prendre en considération la nageoire caudale), la surface du sac vitellin (vessie natatoire incluse) et la surface de la larve entière. Les rapports longueur tête/longueur standard et surface vitelline/surface de la larve entière sont ensuite calculés pour évaluer les proportions morphologiques de chaque larve. Les mesures sont effectuées avec le logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012).

5.3. Réponse PhotoMotrice (120 hpf)

Les expériences comportementales ont été conduites afin d'évaluer la réponse photomotrice (PMR) des larves de 120 hpf. Ces expériences ont permis d'évaluer la réponse au stress et à l'anxiété des larves suivant un challenge lumineux. La PMR a été mesurée selon la procédure décrite par Péan et al. (2012; 2013) avec de légères modifications (Figure 15). La veille de l'analyse, chaque larve de 96 hpf est acclimatée individuellement dans une plaque 24 puits (Krystal Blanc 24, à fond transparent et paroi opaque) avec 2 mL de E3 dans un incubateur (28 ± 0.5 °C). Le choix s'est porté sur des plaques 24 puits plutôt que des 48 ou 96 puits pour obtenir un haut niveau d'activité de nage des larves (Padilla et al., 2011). Les plaques sont recouvertes d'un couvercle transparent afin d'éviter une éventuelle évaporation du milieu qui modifierait alors le volume de nage des larves. Le jour suivant, l'analyse comportementale est effectuée durant la période d'activité stable (entre 13 h et 18 h) du poisson zèbre comme décrit par MacPhail et al. (2009). Les plaques contenant les larves ont ensuite été transférées deux heures avant l'enregistrement en salle d'analyse thermostatée (28 \pm 0,5 °C). Les larves ont été filmées au sein d'une chambre d'acquisition munie d'une caméra et d'un plancher infrarouge pour pouvoir ainsi filmer au travers deux conditions lumineuses (lumière/obscurité) à la fois. Cinq minutes d'acclimatation au sein de la chambre d'acquisition ont été réalisées avant l'enregistrement de l'activité de nage de chacune des larves suivant un challenge lumineux. Trois périodes de 5 minutes composent ce challenge : 5 minutes de Lumière (Light On(1)), 5 minutes de Noir (Dark D) et 5 minutes de Lumière (Light On(2)). Les analyses de vidéo ont été effectuées avec le logiciel Ethovision 8.5 (Noldus, The Netherlands).

Deux méthodes d'acquisition ont été utilisées dans cette thèse, la première ayant été améliorée au cours de la thèse afin de faciliter et réduire le temps d'analyse :

Méthode 1 - Analyse depuis une vidéo préalablement enregistrée: L'enregistrement des vidéos s'est fait à l'aide d'une caméra DMK31AU03 (The Imaging Sources, Allemagne) couplée à une lentille Fujinon (1,4-12,5 mm) et du logiciel IC Capture 2.2 (The Imaging Sources, Allemagne). Une fois les vidéos enregistrées, le *tracking* est effectué par Ethovision 8.5. Méthode 2 - Analyse en temps réel (*live tracking*): L'enregistrement et le *tracking* sont faits en temps réel à l'aide d'une caméra Ikegami ICD 48E, de meilleure résolution que la première, et du logiciel Ethovision 8.5.

Les variables mesurées pour évaluer la PMR des larves sont la distance parcourue (cm.5 min⁻¹), la vitesse moyenne de nage (cm.s⁻¹), le temps de mobilité/immobilité (s).



Figure 15. Dispositif expérimental de l'analyse de PMR de larves 120 hpf, issu de Péan (2012).

5.4. Rythme cardiaque (120 hpf)

L'activité cardiaque a été mesurée sur des larves de 120 hpf par analyse de vidéo. L'activité cardiaque à ces stades de développement est suffisamment stable pour obtenir des mesures reproductibles d'une exposition à une autre. Le cœur et ses deux chambres cardiaques, atrium et ventricule, sont totalement formés. Les larves (sans anesthésie) ont été placées dans des rigoles de 1 mm moulées dans du gel d'agarose à 2 %, puis immobilisées en position latérale gauche avec de la méthylcellulose à 3%. Afin de garder des conditions optimales de développement et ainsi minimiser les risques d'altération du rythme cardiaque, l'ensemble de l'analyse a été effectuée à 28 °C \pm 0,5 °C (Barrionuevo and Burggren, 2013; Burggren, 2005). Une acclimatation de deux heures dans les rigoles est nécessaire ainsi que 2 minutes d'attente à chaque déplacement sous la loupe binoculaire Olympus SZX9 afin de stabiliser le rythme cardiaque. La chambre péricardique des larves a ensuite été filmée (x40) individuellement durant trois périodes de 30 secondes. L'enregistrement des vidéos est effectué à l'aide d'une caméra couleur DMK 31AU03 (15 images.secondes⁻¹) couplée à une lentille Fujinon (1,4-12,5 mm) et le logiciel IC Capture 2.2 (The Imaging Sources, Allemagne).

Deux méthodes de traitement de vidéo ont été utilisées au cours de ce projet de thèse, afin d'obtenir une valeur quantitative du rythme cardiaque (en battement par minutes). La première a été améliorée afin de faciliter et réduire le temps d'analyse :

- Méthode 1 Analyse en 3 étapes depuis une vidéo préalablement enregistrée Conversion/Analyse d'images/Calcul du rythme cardiaque: Dans un premier temps, la vidéo « couleur » est transformée en nuance de gris puis convertie en séquence d'images en utilisant le logiciel VirtualDub 1.9.11 (http://www.virtualdub.org/). Ensuite cette séquence est importée dans ImageJ (Schneider et al., 2012), afin de dessiner deux zones d'intérêts, une pour chaque chambre (atrium et ventricule). Grâce au *plugin* ROI (Region of Interest) Manager et l'option « Multi Measure » (multiples mesures), la densité intégrée de pixels dans chacune des zones est alors mesurée pour toute la séquence d'images (Vitesse d'acquisition de la caméra 15 images.s⁻¹ x Temps d'enregistrement 30 s = 450 images donc 450 valeurs brutes de densité de pixels par vidéo). Une analyse de Fourier est finalement réalisée sur ces données afin d'obtenir un périodogramme avec la distribution des fréquences de battements par minutes. Le rythme cardiaque et par correction obtenir un nombre de battements par minutes. Le rythme cardiaque de la larve de 120 hpf est la moyenne du nombre de battements des deux chambres cardiaques.
- Méthode 2 Analyse depuis une vidéo préalablement enregistrée grâce à la nouvelle fonctionnalité *Heartbeat Detector* du logiciel Ethovision 9.0 (Noldus, Hollande): Après avoir identifié distinctement les deux chambres cardiaques en deux arènes différentes, le logiciel mesure les changements de valeurs de gris correspondant au flux sanguin durant la contraction des deux chambres cardiaques. Le *Heartbeat detector* calcule la fréquence dominante de changement de pixels, qui est ensuite

convertie en battements par minute. Cette technique contrairement à la précédente permet d'analyser des lots de vidéos simultanément.

5.5. Activité enzymatique EROD (96 hpf)

L'activité EROD a été mesurée in vivo sur des larves de 96 hpf selon la méthode de Carney et al. (2004) et Otte et al. (2010) avec de légères modifications. Les individus ont été incubés à l'obscurité et 28 ± 0.5 °C dans une solution de 7-éthoxyrésorufine (7-ER, substrat du cytochrome P450) à 21 µg.L⁻¹ diluée dans 1 mL de E3. Après cinq heures d'incubation dans cette solution, les larves ont été prélevées, anesthésiées avec 16 µg.L⁻¹ de benzocaïne puis immobilisées en position latérale gauche dans de la méthylcellulose à 3% afin d'observer la cavité gastro-intestinale. Toute la procédure est effectuée à l'obscurité afin d'éviter une potentielle photodégradation de la 7-ER. La résorufine (molécule fluorescente) libérée par les larves a été examinée sous microscope à fluorescence (Olympus BX41, x100) équipé d'un filtre Rhodamine Red (excitation/émission : 560 nm/580 nm). Les cavités gastro-intestinales de chaque larve sont ensuite photographiées avec une caméra DMK31AU03 et le logiciel IC Capture 2.2 (The Imaging Sources, Allemagne). L'analyse d'image est rendue possible à l'aide d'un plugin HeatMapHistogram (Péan S., http://www.samuelpean.com/heatmaphistogram/) à partir du logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012) afin de quantifier de façon arbitraire l'intensité de cette fluorescence. Un seuil est défini pour toutes les images afin d'isoler la fluorescence issue de la cavité gastro-intestinale de chaque larve. Le plugin va comptabiliser le nombre de pixels pour chaque valeur de gris sur une image de 8-bit à partir du seuil défini au préalable et ensuite transformer l'image en « heatmap » c'est-à-dire en nuance de couleurs plus ou moins chaudes en fonction de l'intensité de fluorescence émise (Figure 16). Les résultats sont alors exprimés en densité intégrée de pixels.



Barre de calibration de l'intensité de fluorescence (conversion des pixels en nuance de 256 couleurs)

Figure 16. Illustration d'une photographie intégrée dans ImageJ. A : Photographie de la cavité gastrointestinale d'une larve 96 hpf exposée à un inducteur AhR, libérant ainsi la résorufine ; B : Photographie intégrée dans ImageJ, les pixels pour chaque valeur de gris sont convertis en nuance de 256 couleurs.

Cette méthode qualitative a été préalablement validée avec des expositions par voie aqueuse à un agoniste du récepteur AhR, le beta-naphthoflavone (βNF).

5.6. Dommages à l'ADN par le test Comète

Le test Comète (ou Single Cell Gel Electrophoresis) est une méthode rapide, sensible et simple pour détecter les dommages à l'ADN au niveau des cellules individuelles. Ce test est basé sur la capacité des fragments d'ADN (chargés négativement) à migrer sur un gel d'agarose lorsqu'ils sont soumis à un champ électrique. La migration d'ADN dépend directement des dommages à l'ADN dans les cellules.

Le détail des solutions utilisées lors de ce test est reporté Tableau 9.

Solutions	Préparation
PBS 1X	NaCl 137 mM + KCl 2,7 mM + Na ₂ HPO ₄ 10 mM + KH_2PO_4 1.8 mM: aiuster pH à 7.4 avec du HCl 1 M
Agarose 0,5 %	
Normal Melting Point Agarose (NMP)	500 mg + 100 mL PBS 1X
Low Melting Point Agarose (LMP)	500 mg + 100 mL PBS 1X
Tampon de lyse	NaCl 2,5 M + EDTANa ₂ 0,1 M + Tris base 0,01 M + N-sarcosinate 1 % + DMSO 10 % + Triton X-100 1 % ; pH 10
Tampon de déroulement électrophorèse	NaOH 0,3 M + EDTANa ₂ 0,001 M ; pH 13
Tampon de neutralisation	Tris base 0,4 M ; pH 7,5

Tableau 9. Solutions utilisées dans le cadre du test Comète (Sigma-Aldrich, Allemagne).

Les dommages à l'ADN ont été mesurés à partir d'un pool de cinq embryons de 24 hpf préalablement déchorionnés. Dans un premier temps, les embryons ont été digérés dans 500 μ L d'une solution PBS 1X/collagénase IV (*Clostridium histolyticum*, Sigma-Aldrich, Allemagne) à 1 mg.mL⁻¹ durant 45 minutes à température ambiante. Les échantillons étaient régulièrement homogénéisés pour faciliter la digestion. Afin de séparer les cellules et les débris tissulaires, la suspension cellulaire a été ensuite filtrée sur une maille de 48 μ m dans des tubes eppendorf de 1,5 mL (stériles). Après une centrifugation de 10 minutes à 2300 rpm et à température ambiante, le surnageant a été éliminé et le culot remis en suspension dans 30 μ L de PBS 1X.

La viabilité cellulaire est mesurée par un test d'exclusion au bleu trypan. Cet agent colorant traverse les membranes des cellules endommagées et s'accumule dans le cytosol. Les cellules endommagées ou mortes sont colorées en bleu alors que les cellules viables sont réfringentes. La concentration cellulaire de chaque échantillon a été déterminée en comptant les cellules viables sur une cellule de Malassez. La suspension cellulaire restante a été centrifugée puis remise en suspension de manière à obtenir une concentration à 10⁶ cellules.mL⁻¹.

Le test Comète a été ensuite effectué à partir de cette suspension cellulaire fraichement isolée selon la procédure alcaline de Singh et al. (1988) avec modifications de Akcha et al. (2003). Les principales étapes du test sont résumées Figure 17. Deux lames sont préparées pour chaque échantillon. 30 μ L de la suspension cellulaire ont été ajoutés à un aliquot de 225 μ L d'agarose LMP (Low Melting Point) à 0,5 %. 85 μ L de ce mélange ont ensuite été déposés



Figure 17. Schéma récapitulatif des principales étapes du test Comète.

sur une lame préalablement recouverte d'une fine couche d'agarose NMP (Normal Melting Point). Ce gel d'agarose contenant la suspension cellulaire a été uniformément réparti sur la lame à l'aide d'une lamelle et solidifié sur

lit

Viabilité cellulaire – Test d'exclusion au bleu trypan

de

glace durant une minute. Les lamelles ont ensuite été En utilisant supprimées. une procédure similaire, une troisième couche d'agarose, 100 µL de LMP à 0,5 % ont été déposé sur la lame recouvrant la suspension cellulaire. Après solidification de ce dernier gel, les lamelles ont été une nouvelle fois supprimées délicatement.

> Les lames ont ensuite été plongées dans un tampon de lyse glacé pendant 1 heure. Cette étape de lyse est effectuée à température ambiante et à l'obscurité afin d'éviter toute photodégradation de l'ADN. Cette étape a pour but de rompre les membranes biologiques et lyser tous composants cellulaires tels que les protéines et les ARN, libérant ainsi les noyaux des cellules.

Après une heure de lyse alcaline, une étape de dénaturation de l'ADN est réalisée. Les lames ont alors été immergées dans un tampon alcalin au sein d'une cuve d'électrophorèse pendant 15 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Une électrophorèse est ensuite réalisée pendant 20 minutes à 23 V ($E = 0.66 \text{ V.cm}^{-1}$) et 300 mA permettant la migration des fragments d'ADN (comètes), fonction du nombre de cassures et de la taille des fragments. A la suite de cette étape, les lames ont été neutralisées dans deux bains successifs de 5 minutes dans une solution de neutralisation Tris base 0,4 M. Après 15 minutes de déshydratation des lames dans de l'éthanol absolu, les lames ont été séchées et conservées à température ambiante et à l'obscurité, jusqu'à lecture. Une dernière étape de coloration de l'ADN doit être réalisée avant lecture, en incubant les lames avec 70 µL de GelRed[™] (1/10000) dans une boîte humide à 4 °C et à l'obscurité. Après une heure de coloration, l'observation des cellules comètes est effectuée à partir d'un microscope à fluorescence (Olympus BX60, 400x) équipé d'une caméra CDD (Luca-S EMCDD, Andor™ Technology, Irlande du Nord). Un nombre de 100 cellules (50 par lames) est mesurées aléatoirement à l'aide du logiciel Komet 6.0 (Andor[™] Technology, Irlande du Nord). Les dommages à l'ADN ont été évalués par la mesure du pourcentage d'ADN dans la queue de la cellule (Figure 18) (Hartmann et al., 2003).





5.7. Expressions de gènes cibles par q-PCR

5.7.1. Extractions des ARN totaux

Les ARN totaux ont été extraits à partir de pools de 20 larves de 96 hpf conservées dans 1 mL de RNA later (Sigma-Aldrich, Allemagne) à -20 °C. La méthodologie utilisée était l'extraction au TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, USA) suivant la procédure du fabricant. Après suppression du RNA later, les larves ont été homogénéisées, broyées manuellement à l'aide de Potters stériles dans 1 mL de TRIzol®. Les échantillons ont été ensuite incubés pendant 5 minutes à température ambiante pour permettre la complète dissociation du complexe nucléoprotéique. Une centrifugation a été réalisée durant 10 minutes à 7500 g et à 4 °C afin de supprimer les débris tissulaires de l'échantillon. Un volume de 200 µL de chloroforme est ajouté au surnageant afin de séparer les protéines hydrophobes et hydrophiles. Après une agitation de 15 secondes et une incubation de 3 minutes à température ambiante, une seconde centrifugation est effectuée (15 minutes, 12000 g, 4 °C) afin de récupérer les ARN (hydrophiles) exclusivement concentrés dans la phase aqueuse. Les ARN ont ensuite été précipités (500 µL de cette phase aqueuse) avec 500 µL d'isopropanol. Les échantillons ont été incubés 10 minutes à température ambiante puis une nouvelle fois centrifugés (15 minutes, 12000 g, 4 °C). Après centrifugation, les ARN précipités forment un culot colloïdal (quasi invisible) au fond du tube. Le surnageant supprimé, le culot d'ARN est lavé une fois avec 1 mL d'éthanol à 75 % afin de supprimer les éventuelles traces de TRIzol®. Après homogénéisation sous vortex, une nouvelle centrifugation est réalisée pendant 5 minutes, à 7500 g et à 4 °C. Après un séchage bref du culot d'ARN à l'air, les ARN ont été redissous dans 500 µL d'eau milliQ (RNase-free). Une nouvelle précipitation de l'ARN est réalisée afin d'augmenter le rendement d'extraction et la qualité des ARN en y ajoutant 1 mL d'éthanol absolu et 50 µL d'acétate de sodium à 3 M (pH 5,3). La précipitation est réalisée à -20 °C pendant 30 minutes. Une dernière centrifugation (15 minutes, 12000 g, 4 °C) est réalisée. Le culot d'ARN est séché pendant 10 minutes à 55-60 °C puis nouvellement dissous dans 40 µL d'eau milliQ (RNase free).

5.7.2. Quantification des ARN totaux extraits et traitement à la DNase

Les acides nucléiques ont été quantifiés par spectrophotométrie. 5 µL d'ARN totaux extraits ont été dilués dans 80 µL de tampon Tris 5 mM (pH 8,5), les absorbances ont alors été mesurées à 230, 260 et 280 nm. La densité optique à 260 nm est utilisée pour déterminer la concentration d'ARN dans l'échantillon. L'absorption maximum de l'ARN est à 260 nm. Les mesures couplées des ratios A260/A230 nm et A260/A280 nm sont alors utilisés pour évaluer la pureté des échantillons. Les ARN purs ont des ratios A260/A280 \approx 1,8-2,0 et A260/A230 \approx 2,0-2,2. Des ratios A260/A280 et A260/A230 inférieurs indiqueraient la présence de protéines, de phénols qui seraient absorbés aux alentours de 280 nm ou autres contaminants absorbés à 230 nm respectivement.

Afin de supprimer une éventuelle contamination à l'ADN génomique, les échantillons d'ARN (1 μ g) ont été incubés 30 minutes dans 10 μ L d'une solution de digestion RQ1 (RNA-Qualified) RNase-free DNase I (1 μ L tampon RQ1 DNase 10X + RQ1 DNAse I à 1 U. μ g⁻¹ d'ARN + H₂0 qsp 10 μ L ; Promega Madison, USA). La DNase est ensuite inactivée par ajout de 2 μ L d'une solution stop RQ1 DNase (Promega, Madison, USA) suivi d'une incubation de 10 minutes à 65 °C.

5.7.3. Rétro-Transcription (RT)

La Rétro-Transcription de l'ARN est une technique permettant de synthétiser l'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'ARN grâce à une ADN polymérase ARN-dépendante, la reverse transcriptase (Figure 19). La synthèse de l'ADNc a été réalisée à partir de 1 μ g d'ARN totaux mixé à un mélange réactionnel. Ce mélange contient 1 μ L oligo(dT)₁₈ (500 ng), 1 μ L de random hexamer (250 ng) et de l'eau milliQ qsp 5 μ L. Ce mélange a été incubé 10 minutes à température ambiante puis placé dans un thermocycleur (Eppendorf Mastercycler) durant 5 minutes à 70 °C et 5 minutes dans la glace permettant de l'hybridation des deux amorces sur les ARN. La synthèse de l'ADNc (phase d'élongation) a ensuite été initiée grâce à une Moloney-Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA), auquel a été ajoutée une solution tampon M-MLV 5X, une solution de désoxyribonucléotides triphosphates (dNTPs) à 10 mM, unités constitutives du brin complémentaire, et une solution RNAse In (40 U. μ L⁻¹). Cette dernière empêchant la dégradation de la matrice. L'ensemble a été de nouveau placé dans le thermocycleur durant 1

heure à 42 °C. L'enzyme a été ensuite inactivée par une période de chauffe 15 minutes à 70 °C. Pendant cette étape, l'ARN est alors rétro-transcrit en ADNc simple brin stable et a été stocké à -20 °C jusqu'à leur utilisation en PCR (Réaction en Chaîne par Polymérase) quantitative.



Figure 19. Principales étapes d'une Rétro-Transcription (RT).

5.7.4. Séquences d'amorce des gènes cibles

Les séquences d'amorce pour la PCR quantitative ont été déterminées à partir des séquences codantes de la banque de données GenBank (pubmed-NCBI) en utilisant le logiciel Primer3 (Rozen and Skaletsky, http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). Les numéros d'accession des 13 gènes utilisés dans notre étude et leurs amorces correspondantes sont reportés dans le Tableau 10. Les amorces utilisées sont synthétisées par Eurofins (MWG Operon, Allemagne).

Gène cible	Numéro d'accès NCBI	Séquence des amorces
gapdh	BC083506	GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC ^a
		GTGCAGGAGGCATTGCTTACA ^b
eefl	NM_131263.1	CAGCTGATCGTTGGAGTCAA ^a
		TGTATGCGCTGACTTCCTTG ^b
b2m	BC062841	GGAAAGTCTCCACTCCGAAAG ^a
		GTGAAGGCAACGCTCTTTGT ^b
g6pd	BM_182602	GTCCCGAAAGGCTCCACTC ^a
		CCTCCGCTTTCCTCTC ^b
βactin	NM_131031	CCCAGACATCAGGGAGTGAT ^a
		CACAATACCGTGCTCAATGG ^b
cyp1a	BC094977	GACAGGCGCTCCTAAAACAG ^a
		CTGAACGCCAGACTCTTTCC ^b
ahr2	NM_131264	GCCTGGGATAAAGGAGGAAG ^a
		CAGCTCCACCTGTCCAAAT ^b
cat	NM_130912	CGCTTCTGTTTCCGTCTTTC ^a
		CCCTGAGCATTGACCAGTTT ^b
sod(Cu/Zn)	BC055516	GTTTCCACGTCCATGCTTTT ^a
		CGGTCACATTACCCAGGTCT ^b
sod(Mn)	CB923500	GGCCAAGGGTGATGTGAC ^a
		ACGCTTTATGGCCTCCAAC ^b
gpx4	NM_001007282.1	AGGATCCAAGTGTGGTGGAG ^a
		GGGGTTTCCAAACAAACCTT ^b
p53	NM_131327.1	GCTTGTCACAGGGGTCATTT ^a
		ACAAAGGTCCCAGTGGAGTG ^b
bax	AF231015	GGAGATGAGCTGGATGGAAA ^a
		GAAAAGCGCCACAACTCTTC ^b

Tableau 10. Séquences des amorces utilisées pour chaque gène d'intérêt au cours de l'étude.

^{*a*} Amorce sens $(5' \rightarrow 3')$

^b Amorce anti-sens $(3' \rightarrow 5')$

5.7.5. Contrôle de la qualité des amorces par migration sur électrophorèse

La qualité des couples d'amorces est vérifiée par migration sur gel électrophorèse à partir de fragments de PCR. Un gel d'agarose à 1,5 % est préparé en diluant 0,72 g d'agarose NMP dans 50 mL de tampon de migration TAE 1X (Tris, Acétate, EDTA, pH 8,0), auquel sont ajoutés 70 μ L de BET (0,025 %, Roth). Le gel est ensuite déposé dans une cuve électrophorèse contenant du tampon de migration TAE 1X. Dans chaque puits du gel d'agarose, 5 μ L de bleu de charge (colorant, 1/6^{ème}, Promega) sont ajoutés à 15 μ L d'oligos. Un marqueur moléculaire de taille (1 Kb DNA ladder, Promega) est également déposé dans

un des puits du gel pour mesurer la taille des différents fragments. Une électrophorèse est ensuite réalisée pendant 30 minutes à 120 V permettant la migration des fragments de PCR. La révélation des fragments de PCR est ensuite réalisé sous table UV. La migration de l'amplicon ne doit montrer qu'une seule bande de migration bien nette, dans le cas contraire, les amorces sont supprimées et redessinées.

5.7.6. PCR quantitative en temps réel (qPCR)

La PCR quantitative en temps réel utilise le principe de base d'une PCR classique en amplifiant un fragment d'ADN tout au long de la réaction, grâce à un agent intercalant fluorescent, le SYBR® Green I. Les qPCR ont été effectuées en microplaques 96-puits stériles avec un thermocycleur StepOnePlus[™] (Applied Biosystems[®], Life Technologies, USA), équipé d'un spectrophotomètre, suivant les procédures du fabricant. La procédure de quantification est basée sur la fluorescence d'un mélange réactionnel lié à l'ADN double brin. Pour chaque puits de la microplaque, ce mélange réactionnel a été composé de 10 µL de tampon 2X Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems®, USA), de 2,4 µL d'amorces (sens/anti-sens) à 600 nM, de 5,6 µL d'eau Milli-Q et de 2 µL d'ADNc. La microplaque a ensuite été placée dans le thermocycleur dans lequel trois cycles thermiques ont été réalisés. Une première étape d'activation de l'enzyme a été effectuée pendant 10 min à 95 °C. Un total de 40 cycles d'amplification a été ensuite réalisé. Pendant cette période, une dénaturation (15 s à 95 °C), puis une hybridation (40 s à 60 °C) et enfin une phase d'élongation (30 s à 72 °C) ont été réalisées, pendant lesquelles la quantité d'ADN est mesurée grâce au marqueur fluorescent SYBR® GreenTM. L'accroissement du signal de fluorescence est proportionnel à la quantité d'amplicons produits (Figure 20).



Figure 20. Principe de la PCR quantitative en temps réel.

Les niveaux d'expression de gènes ont été quantifiés à partir du nombre de cycles seuils C_T (« Cycle Threshold ») de chaque amplicon produit. Les C_T correspondent au nombre de cycles nécessaires pour que le signal fluorescent émis soit significativement supérieur au niveau basal (ou bruit de fond). Plus l'échantillon est concentré en gène cible, moins il faudra de cycles pour atteindre ce niveau et par conséquent le C_T sera faible.

Les expressions de gènes cibles ont été analysées avec le logiciel REST-2009© (Qiagen, http://www.REST.de.com). Les expressions de gènes cibles ont été normalisées dans un premier temps à partir des quatre gènes de ménage (gapdh, eef1, g6pd et βactin), puis exprimées de façon relatives par rapport à l'échantillon contrôle.

5.8. Dosage des métabolites de HAP dans les larves

Les larves échantillonnées ont été placées dans l'azote liquide puis conservées à -80 °C. Les métabolites de HAP ont été extraits sur 3 pools de 50 larves par échantillon. Les analyses ont été réalisées en totalité par le laboratoire LPTC de l'Université de Bordeaux. Les larves ont été broyées dans 3-4 mL de tampon d'acétate de sodium (pH 5,0). Une déconjugaison enzymatique est ensuite réalisée pendant 16 h à 37 °C après ajout de l'enzyme beta-glucuronidase Helix pomatia-2 (\geq 100 000 units.mL⁻¹, Sigma-Aldrich, Germany) adaptée de la méthode décrite par Mazéas and Budzinski (2005). Avant extraction, une solution d'étalons internes est ajoutée dans chaque échantillon. Les métabolites sont extraits suivant une procédure SPE (extraction sur phase solide) sur cartouche Bakerbond C₁₈ (500 mg, 3cc).

L'extrait est ensuite élués dans de méthanol absolu puis concentrée sous flux d'azote. Une purification des échantillons est ensuite réalisée sur colonne de NH2 (500 mg, 3 cc, Supelco), puis élués avec une solution de dichlorométhane/méthanol (80/20, v/v). Après une seconde étape de reconcentration sous flux d'azote, les métabolites de HAP sont analysés par chromatographie liquide couplée à détection par deux spectromètres de masse quadripôlaires (LC/MS/MS) comme décrit par Le Dû-Lacoste (2008). Cette dernière permet d'améliorer la résolution et sensibilité d'analyse par rapport à une chromatographie couplée à un seul spectromètre.

CHAPITRE II

STANDARDISATION D'UNE EXPOSITION PAR VOIE SÉDIMENTAIRE (FABRICATION D'UN SÉDIMENT ARTIFICIEL ET COMPARAISON DES RÉPONSES INTERESPÈCES)

RÉSUMÉ DU CHAPITRE II

L'objectif de ce chapitre était d'utiliser une matrice sédimentaire pour évaluer la toxicité de composés hydrophobes. L'étude a été conduite sur deux poissons modèles, recommandées par l'OCDE, le médaka japonais (Oryzias latipes) et le poisson zèbre (Danio rerio). La méthode consiste à utiliser un sédiment que l'on enrobe avec les composés à tester à l'aide d'un solvant comme vecteur d'enrobage. Suite à une possible variabilité temporelle du sédiment naturel, choisi initialement, conduisant à des résultats non reproductibles par rapport aux études réalisées précédemment au laboratoire (cf. Démarche expérimentale en Figure 21), un protocole utilisant un sédiment artificiel a été menée afin de standardiser ces tests de toxicité. Ces expérimentations ont été réalisées en parallèle sur le médaka japonais (thèse de F. Le Bihanic) et sur le poisson zèbre (cette thèse) en utilisant deux HAP individuels dont la toxicité a été bien décrite dans la littérature, le benzo[a]pyrène et le fluoranthène. Bien que les différentes étapes conduisant au choix des concentrations des différents composants du sédiment artificiel aient été réalisées en parallèle chez les deux espèces, ce chapitre ne présente que les résultats qui ont fait l'objet d'une valorisation scientifique. Deux articles scientifiques soumis dans la revue Environmental Science and Pollution Research composent ce chapitre, dont le premier fait l'objet d'une révision. Le premier article rapporte ainsi les différentes étapes de fabrication du sédiment artificiel, en vue de définir les meilleures conditions d'exposition des embryons de médaka japonais. Le second article, quant à lui, compare les réponses toxiques obtenues chez le médaka avec celles du poisson zèbre pour différentes compositions du sédiment artificiel obtenu. Pour le médaka japonais, une composition appropriée pour les tests de toxicité a été fixée à 92,5 % de silice (0,2-0,5 mm de diamètre), 5 % d'argile et 2,5 % de tourbe de sphaigne. Ce sédiment artificiel a ensuite été utilisé pour évaluer différents mélanges de HAP obtenus à partir d'un extrait aromatique de sédiment (extrait pyrolytique) et deux extraits de pétroles chez le médaka japonais (thèse de F. Le Bihanic). Chez le poisson zèbre, une composition finale sans matière organique s'est révélée la plus appropriée au vu des réponses toxiques observées. Cependant, cette composition soulève la question de la pertinence environnementale, sachant que les HAP se fixent préférentiellement sur la matière organique, laquelle va moduler, entre autres leur biodisponibilité ainsi que leur toxicité. De plus, une grande sensibilité des œufs de poisson zèbre aux particules sédimentaires fines a été observée ainsi qu'une faible reproductibilité des expérimentations peuvent biaiser l'estimation de la toxicité des composés testés. Ces observations ont conduit à l'arrêt de ces expériences au cours de la thèse, remettant de ce fait en question la validité de ce type d'exposition pour les tests embryo-larvaires de poisson zèbre.





Figure 21. Démarche expérimentale conduisant à la fabrication d'un sédiment artificiel en vue de standardiser les tests de toxicité embryo-larvaires de poisson.

ARTICLE 1

Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay

Article soumis dans *Environmental Science and Pollution Research* Au sein de la revue spéciale ConPhyPoP: "PAHs and fish – Exposure monitoring and adverse effects – from molecular to individual level" (En révision)

Florane Le Bihanic^a, **Prescilla Perrichon^b**, Xavier Cousin^{b,c}, Hélène Budzinski^a, Karyn Le Menach^a, and Jérôme Cachot^{a,*}

^{*a*} University of Bordeaux 1, EPOC, UMR CNRS 5805, France ^{*b*}IFREMER, Ecotoxicology laboratory, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France ^{*c*}INRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

*Corresponding author: J. Cachot, UMR 5805 EPOC, University of Bordeaux, 351 cours de la Liberation, 33405 Talence Cedex, France. j.cachot@epoc.u-bordeaux1.fr

Abstract

Most persistent organic pollutants, due to their hydrophobic properties, accumulate in aquatic sediments and represent a high risk for sediment quality. To assess the toxicity of hydrophobic pollutants, a novel approach was recently proposed as an alternative to replace, refine and reduce animal experimentation. The medaka embryo-larval sediment contact assay uses Japanese medaka embryos incubated onto a natural sediment spiked with the compound being tested. In order to improve this assay, this work developed a reference exposure protocol with an artificial sediment specifically designed to limit natural sediment composition uncertainties and preparation variability. For the first step, the composition of the new artificial sediment was determined using a model polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), fluoranthene. For the second step, the sediment was validated with two other model PAHs, benz[a] anthracene and benzo[a] pyrene. Various developmental endpoints were recorded including survival, embryonic heartbeat, hatching delay, hatching success, larval biometry and abnormalities. A suitable artificial sediment composition for hydrophobic substances testing with the MELA was set to 2.5 % dw Sphagnum peat, 5 % dw kaolin clay and 92.5 % dw silica of 0.2-0.5 mm grain size. Spiking efficiency and bioavailability of PAHs were dependent on sediment composition. Organic matter appeared to be one of the main factors driving PAH bioavailability in sediment. Comparative toxicity of the three PAH compounds was directly related to their aromaticity and bioavailability. The results also highlighted the sensitivity of Japanese medaka early life stages to particle-adsorbed PAHs.

Keywords: artificial sediment, spiked sediment, PAH, Japanese medaka embryos, embryotoxicity, teratogenicity

1. Introduction

Due to their high capacity to adsorb and to store contaminants, aquatic sediments are major sinks for persistent organic pollutants and thereby secondary sources of contamination for aquatic ecosystems (Harris et al. 1996). Sediments represent a real threat for all organisms living in contact with sediment or feeding from them. Organic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), are ubiquitous in the environment. Several studies have documented PAH concentrations of up to 50 μ g g⁻¹ dw sediment in various affected aquatic ecosystems in Europe (Baumard et al. 1999; Benlahcen et al. 1997; Cachot et al. 2006). Multi-exposure to PAHs can occur directly from the contaminated sediment, from the molecules adsorbed onto particles in the water column and indirectly by consumption of benthic preys (Cailleaud et al. 2007; Mayer et al. 2007; ter Laak et al. 2009). The bioavailability of chemical compounds accumulated in sediments depends on several parameters either physicochemical such as molecules desorption, presence of organic matter, the properties of the overlying water, and particle size; or external causes such as dredging, storms, flood, tides, and bioturbation (Roberts 2012; Cailleaud et al. 2009; Wölz et al. 2008; Sundberg et al. 2007).

The usefulness of fish early life stages (ELS) for chemical testing has been widely described in the literature (Belanger et al. 2010; Embry et al. 2010; Vicquelin et al. 2011) mainly because ELS are very sensitive to a large variety of chemicals (Lammer et al. 2009). Tests using fish embryos and eleutheroembryos (yolk-sac larvae) are not covered as *in vivo* tests by the EU regulation on the protection of animals used for scientific purposes (EC 2010). In addition, fish ELS assays fulfil European regulation REACH requirements on the reduction, refinement and replacement of animal experimentation for toxicity assessments of chemicals (EC 2006). More recently, sediment contact assays using ELS have been proposed as an alternative to classic ecotoxicity assays for chemical testing (Barjhoux et al. 2012; Vicquelin et al. 2011) and assessment of sediment toxicity (Hollert et al. 2003; Kosmehl et al. 2006; Rocha et al. 2011). These assays better reproduce the multiple sources of exposure for benthic organisms via sediment, particle, and dissolved phase than water borne exposure.

The species of Japanese medaka, *Oryzias latipes*, was selected firstly for its sensitivity at early life stages to organic contaminants (Barjhoux et al. 2012; Cachot et al. 2007; Cachot et al. 2008; Farwell et al. 2006; Vicquelin et al. 2011) and its bioaccumulation ability for various classes of pollutants during the first hours of development (McElroy et al. 2006;
Hornung et al. 2004). In addition, Japanese medaka is easy to breed and has a transparent chorion making it suitable to follow embryonic development during exposure. Furthermore, its developmental biology is described with accuracy in the literature (Iwamatsu 2004). Lastly, baseline mortality during embryo development, hatching and sac fry development are particularly low, at around 10 % (Barjhoux et al. 2012; Vicquelin et al. 2011). A sediment contact version of the medaka embryo larval assay MELA has been developed recently for organic (Cachot et al. 2007; Vicquelin et al. 2011) and metallic pollutants testing (Barjhoux et al. 2012). Because natural sediment composition varies over time, its use in pollutant toxicity testing can be controversial (Bouloubassi et al. 2006). Since spiked molecule behaviour depends on sediment composition (Höss et al. 2010; Hsu et al. 2007), adsorption and desorption processes cannot be repeated identically with spiking on different natural sediments. Moreover, natural sediments cannot be considered totally free of contamination. Taking this into consideration, the use of chemically-spiked artificial reference sediment is a solution that allows standardization of assays for hydrophobic pollutant testing.

The present study aims to develop and validate a new reference artificial sediment for toxicity testing of hydrophobic chemicals using the MELA sediment contact assay. Three components of sediments were selected: sand, clay, and organic matter. In the first step, three consecutive experiments were performed to select a suitable grain size for sand, and appropriate content of clay and organic matter regarding spiking efficiency and toxicity of a model PAH, fluoranthene (Fluo) to *Oryzias latipes* embryos. Fluo was selected for its high hydrophobicity (log K_{ow}=5.1), its high adsorption capacity for particles and organic matter and its ubiquity in the aquatic environment (Guasch et al. 2012; Cachot et al. 2006). For the second step, the final artificial sediment composition was validated with two other model PAH compounds: benz[*a*]anthracene (BaA; log K_{ow}=5.3) and benzo[*a*]pyrene (BaP; log K_{ow}=6.1). Fluo, BaA and BaP are three priority pollutants included in the European directive 2000/60/EC (EC 2000). Experiments were conducted at relevant PAH environmental concentrations (Cachot et al. 2006).

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) supplied Fluoranthene Fluo, benzo[*a*]pyrene BaP, and benz[*a*]anthracene BaA as well as Ethyl 4-aminobenzoate (benzocaine). Spiking solutions of Fluo at 750 μ g mL⁻¹, BaP at 750 μ g mL⁻¹, and BaA at 500 μ g mL⁻¹ were all prepared in isooctane (HPLC grade, Scharlau, Barcelona, Spain). Atlantic Labo (Bruges, France) supplied pentane solvent; Biosolve (Valkenswaard, the Netherlands) and Acros Organics (Thermo fisher Scientific, Geel, Belgium) supplied the dichloromethane solvent.

2.2. Artificial reference sediment preparation and spiking

Three consecutive experiments were performed in order to ascertain the most suitable composition of the artificial sediment regarding sand grain size, clay content and organic matter content based on the OECD 218 (OECD 2004) and published protocols (Nia et al. 2011; Zielke 2011). Experiment 1 aimed to select the size of sand grain suitable for hydrophobic compound testing with the MELA. Sand supplied by Sibelco sandpit (sand reference BB 0.2/2h, Mios, France) was washed once with hydrochloric acid (7 %) then rinsed generously with Milli-Q water before being used. After 24 h of drying at 90 °C, the sand was sieved into 3 fractions: particles below 0.2 mm, particles between 0.2-0.5 mm and particles between 0.5 mm and 2 mm. The results from experiment 1 were reviewed, the 0.2-0.5 mm sand fraction was selected to compose the artificial sediment used in the following experiment.

Experiment 2 aimed to define the most suitable clay content in the artificial sediment. Kaolin clay (Merck, Darmstadt, Germany) was added to 0.2-0.5 mm sand to reach final clay concentrations of 0, 7.5, 15 or 30 % d.w in glass bottles. Sediment was moistened with Milli-Q water 1:4 v/v, mixed at 180 rpm for 4 h, and then dried for 24 h at 90 °C. Because clay was shown to affect hatching success during exposure, suitable clay content in the sediment was set below the lowest clay concentration tested to avoid the embryos clogging. Clay content in the artificial sediment was set at 5 %.

Experiment 3 aimed to set the most suitable organic matter content in the artificial sediment. *Sphagnum* blond peat (Florentaise, St Mars du Désert, France) was dried for 48 h then sieved to retain particles below 0.5 mm only. Blond peat was moistened with Milli-Q water 1:25 v/v and mixed for 48 h at 180 rpm. 0, 2.5 or 5 % dw of humid peat was then added to 0.2-0.5 mm sand fraction supplemented with 5 % of clay. The sediment was then mixed by continuous shaking at 180 rpm for an additional 24 h period. The pH was then adjusted to 6.5 using calcite solution (10 % in Milli-Q water). After 7 days of storage at room temperature for stabilisation, 1:4 v/v of Milli-Q water was added to the sediment in each bottle. Supernatant water was removed after 24 h decantation. The sediment was then dried at 105 °C for 14 h without shaking. After testing, peat content for artificial sediment was set at 2.5 %.

The last two experiments (experiments 4 and 5), aimed to validate the composition of the artificial sediment (92.5 % of 0.2-0.5 mm grain size, 5 % clay, 2.5 % peat) using two model PAHs with different aromaticity and thus different physico-chemical and toxicological properties. BaA toxicity was assessed in experiment 4 and BaP in experiment 5. The sediment was prepared using the same protocol as for experiment 3.

For experiments 1, 2 and 3, the sediment was spiked only with solvent as a control or with 10 μ g g⁻¹ dw Fluo. For experiments 4 and 5, the sediment was spiked with solvent or 10 μ g g⁻¹ of BaA or BaP. 30 g dw of artificial sediment, 60 mL of dichloromethane and spiking solution were added to a 250 mL glass flask. Solvent was evaporated with a rotary evaporator Rotavapor (IKA, Staufen, Germany) at 115 rpm, 45 °C for 50 to 60 min. To ensure elimination of residual solvent, spiked sediments were stored overnight in the dark at room temperature under fume hood (Vicquelin et al., 2011). For each spiked sediment, one sample of 5 g aliquots was kept for chemical analysis. Spiked sediments were stored few days in the dark at room temperature before the assay starts.

2.3. PAH chemical analysis of artificial sediment

Sediment samples were stored at -20 °C before analysis. Internal deuterated standards Fluo d10, chrysene d12 and BaP d12 were added prior to extraction of 0.2 g of sediment and to one blank analysis. PAH compounds were extracted for 10 min at 30 W using a microwave extraction with dichloromethane as solvent (Budzinski et al. 2000). Samples were then reconcentrated using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap Labconco, Kansas city, USA). Concentrated extracts were purified using alumina micro-columns and eluted with 3 x 5 mL

of dichloromethane. After another re-concentration step with gas nitrogen, aliphatic fraction was eluted on a silica micro-columns using a mix of pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as a solvent. Finally, samples were concentrated in isooctane then pyrene d10 and benzo[*b*]fluoranthene d12 were both added as syringe standards before injection. Fluo, BaA and BaP molecules were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) as described by Baumard et al. (1998). The entire analytical procedure was applied to the certified marine sediment SRM 1944 (NIST, Gaithersburg, MD, USA). Extraction efficiencies were globally very satisfactory, equivalent in average to 84 %.

2.4. Exposure

Gis-Amagen (INRA, Jouy-en-Josas, France) provided Japanese Medaka Oryzias latipes embryos (CAB strain) at early gastrula, stage 14-15 (Iwamatsu 2004). 1 day post fertilisation (dpf) embryos were deposited in a Nitex[®] thermoformed basket onto the surface of the sediment. Exposure by sediment contact was performed during embryonic development until hatching. Exposure units, replicated 3 times per condition, were carried out in 35 mm diameter plastic Petri dishes (Greiner, Courtaboeuf, France) containing 3 g dw of sediment, 3 mL of Egg Rearing Solution ERS (1 g NaCl, 0.03 g KCl, 4.04 g CaCl₂ and 0.163 MgSO₄ in 1 L Milli-Q autoclaved water) and 25 embryos. During exposure, the ERS medium was renewed daily. Experiments took place in a climate chamber (Snidjers Scientific, Tilburg, the Nederlands) at 26 ± 0.3 °C with a photoperiod light:dark of 12:12, 5000 lx white light. When more than half of the individuals hatched in the three replicats of a single condition, exposure was then stopped. After hatching, pro-larvae were observed and transferred into glass beaker containing 20 mL of mixed water (dechlorinated tap water mixed with distilled water 1:2 v/v aerated for 24 h). At the end of the exposure, non-hatched embryos were transferred into new plastic Petri dishes containing 3 mL ERS without sediment until hatching. Three days after hatching, the experiment was stopped by euthanizing all remaining larvae and embryos with a lethal dose of 120 mg L⁻¹ Ethyl 4-aminobenzoate. Pro-larvae were not fed during the experiment.

2.5. Oxygen monitoring

Dissolved oxygen concentration was measured daily before ERS renewal in each exposure unit with a fiber-optic oxygen mini-sensor Fibox 3 (PreSens Precision Sensor, Regensburg, Germany). Measurements were compensated with a temperature sensor PT 1000. After 3 min of oxygen and temperature sensors stabilisation, data was recorded using OxyView v6.02 software (PreSens Precision Sensor, Regensburg, Germany). The oxygen probe was placed at the interface between the ERS and the sediment.

2.6. Biological parameters

2.6.1. Survival and development

Dead embryos and larvae were recorded daily and immediately removed to avoid alteration of the medium. Embryonic survival referred to the number of live embryos or hatched larvae at the end of the experiment compared to the number of embryos at 24 h of exposure. Embryos that died within the first 24 h of the test (2 to 5 %) were not taken into consideration for the calculation since this was likely to be related to transportation stress. Larval survival referred to the number of larvae alive at the end of the experiment compared to the total number of hatched individuals. Hatching rate referred to the number of hatched individuals compared to number of live embryos at 24 h. Hatching time referred to the number of days that individuals took to develop from the fecundation stage until the hatching stage.

2.6.2. Heartbeat

Heartbeat was recorded at room temperature 23 ± 1 °C on 7 dpf embryos temporarily transferred to an ERS medium to facilitate measurement. It was registered under a stereomicroscope MZ 7.5 Leica (Nanterre, France) X25 magnification coupled with a halogen cold light source Intralux 4100 (Volpi, Schlieren, Switzerland). Heartbeat was counted over 3 periods of 20 sec for the same embryo. Values were summed to obtain beat min⁻¹ data for each embryo. Five individuals were analysed per replicate.

2.6.3. Teratogenicity

At hatching, 15 larvae per replicate were individually examined to record morphological abnormalities and lesions. Observed larvae were randomly selected and photographed at X25 magnification with a stereomicroscope MZ7.5 Leica coupled with a CCD camera DFP420C Leica (Nanterre, France). Five types of abnormalities and lesions were scored: oedema (yolk sac, pericardia or skeletal); spinal (scoliosis, lordosis, cyphosis, tail bud abnormalities); craniofacial (jaw and skull abnormalities); ocular (missing eye, cyclopia, hyper or dystrophies); cardiac (anaemia, haemorrhage, ventricle size, blood circulation, heart position). Abnormalities were scored using a scale of 5 points *i.e.* 1 point per malformation type. One larva could exhibit several abnormaly types and/or several malformations of the same type (counted once). Percentage of abnormal larvae referred to the number of larvae presenting at least one abnormality compare to the number of observed individuals.

2.6.4. Biometrics

Head length (from terminal point of lower jaw to rear operculum), total body length (from terminal point of lower jaw to the end of caudal fin) and yolk sac area (excluding swim bladder area) were measured between 0 and 24 h post hatching, on 15 larvae per condition. Swim bladder swelling was also reported. These measurements were processed using Leica Microsystems software v3.8 (Nanterre, France).

2.7. Statistical analyses

For all experiments, each exposure condition was identically replicated 3 times. Each replicate was an independent sample and the solvent treatment was considered as a control treatment. Data is indicated as mean \pm SD. Equally of variance was assessed using the F-test (p<0.01) and each Fluo contaminated sediment was compared to its respective solvent treatment with the Student's t-test (p<0.05). For experiment 3, peat toxicity was statistically analyzed for the three different peat concentrations. Normality of data distribution was tested on data residues using the Shapiro-Wilk test (p<0.01). Variance homogeneity was evaluated using Levene test (p<0.05). In cases of homogenous variance and normalized data, Anova analysis was performed followed by a Tukey post-hoc test (p<0.05). In opposite case, data

was analyzed using the Kruskal-Wallis non parametric test (p<0.05). Principal component analysis PCA (2 axis) were performed on endpoints for which significant differences were observed. Statistical analyses were performed using Statistica software v7.1 (StatSoft, Maisons-Alfort, France).

3. <u>Results</u>

3.1. Selection of suitable sand particle size

No significant mortality was observed during experiment 1. For solvent spiked sediments, only significantly increased heartbeats were recorded in embryos reared onto 0.5-2 mm sediment fractions compared to < 0.2 mm or 0.2-0.5 mm sediment fractions. Fluo spiking efficiency reached 49 %, 25 % and 34 % for < 0.2 mm, 0.2-0.5 mm and 0.5-2 mm fractions, respectively (Table 11). Fluo exposure did not affect hatching rate, or larvae morphology. However, Fluo-spiked sediment increased embryonic heartbeats. For the < 0.2 mm sediment fraction, Fluo-exposed embryos heartbeats were 10 % higher than in control embryos (Fig. 22A). For the 0.2-0.5 mm fraction, Fluo-exposed larvae hatched earlier than in the solvent control group for all three sediment fractions. Therefore Fluo larvae were smaller at hatching. Time to hatch and total larvae length were respectively 6.1 % and 4.3 % significantly lower than in the control (Fig. 22B & 22C). Moreover, the principal component analysis explained 76 % of the variances based on four endpoints: heartbeat, total larvae length, hatching time and abnormality score. In contrast with the < 0.2 mm and 0.5-2 mm treatment groups, 0.2-0.5 mm represented solvent treatment anti-correlated to Fluo treatment with high normalized coefficients along the first axis of the PCA (52.3 %) (Fig. 22D).

Therefore the 0.2-0.5 mm sediment fraction was selected as the most suitable fraction for artificial sediment.

Experiment	Grain size (mm)	e Clay (% dw)	Peat (% dw)	Solvent (ng g ¹)	Fluo (ng g ⁻¹ (%))	BaA (ng g (%))	⁻¹ BaP (ng g ⁻¹ (%))
1	< 0.2	-	-	< 0.2	4 922 (49)	-	-
	0.2-0.5	-	-	< 0.2	2 538 (25)		
	0.5-2	-	-	< 0.2	3 443 (34)		
2	0.2-0.5	0	-	0.9	6 277 (63)		
	0.2-0.5	7.5	-	0.2	11 033 (110)		
	0.2-0.5	15	-	7.7	10 511 (105)		
	0.2-0.5	30	-	8.9	5 015 (50)		
3	0.2-0.5	5	0	0	6 321 (63)		
	0.2-0.5	5	2.5	0	5 912 (59)		
	0.2-0.5	5	5	0	4 396 (44)		
4	0.2-0.5	5	2.5	0		5 082 (51)	
5	0.2-0.5	5	2.5	0			1 736 (18)

Table 11. Measured PAH concentrations in spiked sediments. Values in brackets refer to spiking efficiencies.



Figure 22. How particles size affects Fluo toxicity in Japanese medaka embryos and larvae (Experiment 1). A) Heartbeat measured at embryonic stage 7 dpf. B) Time to hatch. C) Total length of the larvae at hatching. Asterisks stand for significant differences with solvent treatment (Mean \pm SD, N = 3, Student's t-test, p<0.05). D) Principal component analysis (PCA) representing normalized coefficients on the first two axes for 4 endpoints (total larvae length, heartbeat, abnormality score, and time to hatch). Different numbers refer to different replicates of treatment.

3.2. Selection of suitable clay concentration

Addition of clay in the sediment of up to 15 % significantly increased Fluo spiking efficiency from about 60 to 100 % (Table 11). Although there was no significant mortality; addition of 15 % of clay in the solvent control decreased the hatching rate by 9.5 % compared to 0 % for the clay solvent control (Fig. 23A). In contrast larvae exposed to Fluo-spiked sediment without clay hatched 0.7 dpf later than corresponding control solvent group (Fig. 23B). For 7.5 % clay, Fluo significantly decreased the hatching rate by 12 %. For 15 % clay, contaminated larvae was significantly longer (+ 0.12 mm) than in the corresponding control solvent group (Fig. 23C). Although exposure levels were relatively high, up to 10 000 ng Fluo g⁻¹ of sediment, only a few larvae exhibited developmental abnormalities for 15 % clay sediment (Table 12). The majority of abnormalities were spinal, recorded in 32.8 % of

contaminated larvae. The corresponding PCA highlighted 69 % of variance in the four endpoints: total larvae length, heartbeat, hatching success and hatching time. 0, 15 and 30 % of clay Fluo and solvent treatment groups overlapped regarding axis 1 (40.3 %). The analysis did not reveal Fluo and solvent treatment groups as being clearly independent for any clay concentration (Fig. 23D).

Because clay addition above 7.5 % produced a deviation of hatching rate from 0 % clay sediment and produced only very limited improvement of Fluo toxicity, these concentrations were excluded. As a precautionary measure, suitable clay concentration for the composition of the artificial sediment was set at 5 %.



Figure 23 How clay content affects Fluo toxicity in Japanese medaka embryos and larvae (Experiment 2). A) Hatching rate. B) Time to hatch. C) Total length of the larvae at hatching. Asterisks stand for significant differences with solvent treatment (Mean \pm SD, N = 3, Student's t-test, p < 0.05). D) Principal component analysis PCA representing normalized coefficients on the first two axes for 4 endpoints (total larvae length, heartbeats, hatching rate, and time to hatch). Different numbers refer to different replicates of treatment.

Table 12. Developmental effects in medaka embryos following exposure to Fluo-spiked sediments with different clay content (Experiment 2). Asterisks refer to significant differences with solvent control (Mean \pm SD, N=3, Student's t-test, p<0.05).

Clay content (%)	0		7.50		15		30	
	Solvent	Fluo	Solvent	Fluo	Solvent	Fluo	Solvent	Fluo
Embryonic survival (%)	98.7±2.3	100 ± 0.0	100 ± 0.0	96.0±4.0	98.7±2.3	98.7±2.3	100 ± 0.0	100 ± 0.0
Larval survival (%)	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	98.0±3.4	100±0.0	99.3±1.7	99.6±1.4
Heart beats (beat min ⁻¹)	112±5.6	114±6.3	104±5.0	111±1.7	112±7.1	115±6.7	119±7.6	121±7.5
Larva head length (mm)	0.97 ± 0.01	0.96 ± 0.01	$0.94{\pm}0.02$	0.96 ± 0.01	0.91 ± 0.00	0.93 ± 0.03	0.95 ± 0.00	0.98 ± 0.03
Yolk sac area (mm ²)	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.35 ± 0.04	0.33 ± 0.03	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.06
Non-inflated swim bladder	6.7±6.1	8.0±6.9	12.0±4.0	5.3±6.1	28.0±14.4	24.0 ± 8.0	$16.0{\pm}10.6$	$12.0{\pm}10.6$
(%)								
Abnormalities score (/5)	0.3±0.0	0.3 ± 0.3	$0.4{\pm}0.1$	0.3±0.3	0.6 ± 0.2	0.9±0.1	0.5 ± 0.5	0.5±0.3
Abnormal larvae (%)	17.8±13.9	13.3±6.7	15.6±15.4	24.4±23.4	13.3±6.7	42.7±21.1	15.6±10.2	26.7±11.6
Deformities (%)								
Oedema	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.2±3.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Spinal	13.3±17.6	13.3±6.7	13.3±11.6	20.0 ± 20.0	8.9±3.9	32.8±11.1*	15.6 ± 10.2	15.6±13.9
Craniofacial	0.0 ± 0.0	2.2±3.9	2.2±3.9	2.2±3.9	4.4±3.9	12.1±9.5	0.0 ± 0.0	8.9±7.7
Eye	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	2.5 ± 4.4	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Cardio-vascular	0.0 ± 0.0	2.2±3.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.1±8.9	2.2 ± 3.9	4.4±7.7

3.3. Selection of suitable peat concentration

Since addition of organic matter to the sediment could putatively lead to increased microbial activity and oxygen depletion in the water column, the ERS medium was renewed daily just after dissolved oxygen concentration measurement at the water-sediment interface. In fact, oxygen saturation ranged between 97.1 % and 109.3 % without the addition of peat. For 2.5 % peat, 87.5 % dissolved oxygen was measured at the beginning of the exposure and this stabilised at around 100 % after 6 days exposure. For sediments containing 5 % peat, dissolved oxygen varied between 74.4 % and 106.9 %. Significant differences between the total dissolved oxygen measured during the experiment were observed depending on the composition of the sediment (Fig. 24A). Peat significantly decreased average dissolved oxygen concentrations at the sediment surface but mean values were above 94.8 % for all treatments. The addition of peat did not significantly affect neither embryo-larval survival nor development and growth in the control solvent group (Table 13).

Fluo spiking efficiency yielded 63 % for the no-peat sediment; 59 % for 2.5 % peat; and 44 % for 5 % peat (Table 11). No significant Fluo-induced effect was observed regarding embryonic heartbeat, hatching rate, swim bladder inflation and larvae head length (Table 13). No significant Fluo-induced effect on hatching time and yolk sac area was observed for 0 % and 5 % peat sediment whatever the exposure (Fig. 25A & 25B). For 2.5 % peat sediment content, time to hatch was significantly delayed and the yolk sac area reduced following Fluo exposure. Control larvae hatched at around 11 dpf, while Fluo-exposed larvae hatched at 12.5 dpf. PAH contaminated larvae showed yolk sac areas 25 % smaller than in the solvent control larvae (Fig. 25A & 25B). In contrast, PAH had no effect on larval head, total body length and heartbeat (Table 13). Fluo induced abnormalities for all three sediment peat contents. Both the score and the percentage of abnormal individuals were increased by Fluo exposure (Fig. 25C & Table 13). The Fluo-spiked sediment with no peat induced the highest score, 10 times higher than no peat solvent-spiked sediment. Percentages of abnormal individuals were below 10 % for all three control sediments. The majority of Fluo-induced larval abnormalities were spinal curvature, craniofacial deformities, and cardiovascular anomalies (Table 13). Severe cardiovascular dysfunction, such as heart location and blood circulation, was particularly noticeable for the no peat condition accounting for up to 23.4 % of contaminated larvae. For the different Fluo treatments, spinal deformities represented between 8.9 and 33.7 % of contaminated larvae, while craniofacial abnormalities were recorded in 13.3 % to 28.9 %.

Only 2.2 % of Fluo larvae presented no significant oedemas. Eye abnormalities were not observed (Table 13).

PCA featured 85.7 % of 4 factor variances: hatching time, abnormality score, larvae length, and yolk sac area. Solvent and Fluo treatments for 0 and 5 % peat content overlapped along axis 1 (51.4 %) (Fig. 25D). In contrast, Fluo and solvent treatments for 2.5 % peat content were clearly anti-correlated along axis 1. Therefore the most suitable peat concentration for artificial sediment was set at 2.5 %.



Figure 24 How peat content affects Fluo or solvent toxicity in Japanese medaka embryos and larvae (Experiment 3). A) Averaged dissolved oxygen during 9 days of embryo exposure. B) Yolk sac area. and C) Larval abnormality score at hatching. Different letters stand for significant differences within treatments (Mean \pm SD, N = 3, Anova, p < 0.05).

Peat content (%)	0		2.5		5	
	Solvent	Fluo	Solvent	Fluo	Solvent	Fluo
Embryonic survival (%)	97.0±5.3	98.3±2.9	100±0.0	100 ± 0.0	89.5±11.5	98.5±2.6
Larval survival (%)	$98.4{\pm}2.8$	100±0.0	100 ± 0.0	100 ± 0.0	94.5 ± 5.6	100±0.0
Heart beats (beat min ⁻¹)	97.8 ± 7.6	105 ± 3.3	103±11.1	107 ± 5.9	98.3±2.4	103±6.3
Hatching rate (%)	92.4±2.1	95.1±4.1	94.1±5.1	98.5±2.1	76.1±9.4	93.9±5.7
Larval total length (mm)	4.6 ± 0.0	4.5±0.1	4.5 ± 0.0	4.5±0.1	4.5±0.1	4.5±0.1
Larval head length (mm)	0.9 ± 0.0	$0.9{\pm}0.0$	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0	0.9 ± 0.0
Non-inflated swim bladder (%)	22.7±2.3	18.7±12.2	32.0±4.0	20.0±0.0	22.7±8.3	22.7±12.2
Abnormal larvae (%)	8.9 ± 3.9	59.9±8.3*	8.9 ± 7.7	28.9±3.9*	6.7 ± 0.0	28.9±10.2*
Abnormalities (%)						
Oedema	0.0 ± 0.0	2.2 ± 3.9	$0.0{\pm}0.0$	2.2 ± 3.9	0.0 ± 0.0	2.2±3.9
Spinal	4.4 ± 3.9	33.7±12.1*	6.7 ± 6.7	8.9±10.2	4.4 ± 3.9	11.1±10.2
Craniofacial	2.2 ± 3.9	28.9±8.7*	2.2 ± 3.9	20.0±13.3	2.2 ± 3.9	13.3±6.7
Eye	0.0 ± 0.0	00±0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Cardio-vascular	2.2 ± 3.9	23.4±9.1*	$0.0{\pm}0.0$	8.9±3.9*	0.0 ± 0.0	6.7±0.0*

Table 13. Developmental effects in medaka embryos exposed to Fluo-spiked sediments with different peat content (Experiment 3). Asterisks refer to significant differences with solvent control (Mean \pm SD, N = 3, Student's t-test, p < 0.05).



Figure 25. Fluo toxicity in Japanese medaka embryos and larvae for different peat sediment content (Experiment 3). A) Time to hatch. B) Yolk sac area. C) Larval abnormalities score at hatching. Asterisks stand for significant differences with solvent treatment (Mean \pm SD, N = 3, Student's t-test, p < 0.05). D) Principal component analysis PCA representing normalized coefficients on the first two axes for 4 endpoints (total larvae length, hatching rate, yolk sac area, and larval abnormality score). Different numbers refer to different replicates of treatment.

3.4. Validation of the artificial sediment using BaA and BaP

BaA and BaP spiking efficiency on artificial sediment yielded 50 % and 18 % respectively (Table 11). Neither of these two PAHs affected embryo or larval survival at the studied concentrations. BaA did not affect the length of time of development but significantly induced abnormalities on newly hatched larvae (Table 14). The majority of abnormalities observed after BaA exposure were changes in jaw shape. BaP compound did not induce teratogenicity but delayed hatching and increased yolk sac resorption.

Table 14. Developmental effects of Fluo-, BaP- and BaA-spiked sediments on medaka embryos and larvae (Experiments 3, 4 and 5). Results are expressed as induction factors relative to respective solvent control for purpose of comparison among the two experiments. Asterisks refer to statistical differences with control solvent (N = 3, Student's t-test, p < 0.05).

	Experiment	3	Δ	5
Endpoints	_	Fluo	T Rad evnosure	BaP
		exposure	DaA exposure	exposure
Embryonic survival		0.9	1.1	1.0
Larval survival		1.0	1.0	1.0
Heart beat		0.9	1.1	1.0
Hatching rate		1.0	1.1	1.0
Time to hatch		1.1*	1.0	1.1*
Larval total length		1.0	1.0	1.1
Larval head length		1.0	1.0	1.1
Yolk sac area		0.8*	0.9	0.8*
Non-inflated swim bladder		1.9	1.5	2.3
Abnormal larvae		3.7*	6.5*	2.5
Deformities				
Oedema		-	-	-
Spinal		2.0	7.0*	1.3
Craniofacial		5.3	17.8*	7.0
Eye		-	3.0	-
Cardio-vascular		24.2*	4.0	-

4. Discussion

Neither embryonic nor larval mortality was observed at significant levels whatever the treatment under consideration. Since only silica sand was used as a matrix to spike Fluo for experiment 1, spiking efficiencies did not exceed 50 % regardless of the grain size. However Fluo exposure induced significant adverse effects on embryo development depending on sediment grain size. Although increased Fluo adsorption onto silica was observed with the < 0.2 mm fraction, the effects of Fluo on medaka embryos were more potent with the 0.2-0.5 mm fraction. Therefore the 0.2-0.5 mm grain size fraction was selected for the composition of the artificial sediment.

The addition of clay to the sediment increased the Fluo spiking efficiency from 63 % to 100 %. This is in agreement with Fanget et al. (2002) who demonstrated efficient adsorption of Pyrene, another 4-ring PAH, to kaolin clay. They speculated that PAH could form microcrystals at the surface of the solid phase. In our study, when clay concentration reached 30 % dw, fewer Fluo molecules may be adsorbed onto sediment particles. We can assume that accessibility of adsorption sites for Fluo may be limited by the presence of an excess of clay. Despite efficient Fluo adsorption onto clay particles, few Fluo toxic effects were observed for medaka embryos and larvae. We can thus assume that in the exposure conditions of experiments 1 and 2, Fluo was weakly available to medaka embryos.

In the third experiment, it was shown that the addition of blond peat to the artificial sediment led to a reduction in the efficiency of Fluo-spiking. This result concurs with Fanget et al. (2002) who demonstrated that, humic acids attach to the surface of clay particles, which in turn reduce PAH accessibility to binding sites. Furthermore, Fluo was shown to be more toxic to medaka early life stages in absence of peat than with peat. Organic matter is an effective sorbent for hydrophobic compounds such as PAHs due to its high molecular weight, its high sorption surface, and the possibility of a strong interaction through Van der Waals bonds to these kinds of pollutants (Guasch et al. 2012). The bioavailability of PAH molecules bound to organic matter is mastered through two major mechanisms: sorption and facilitation depending on the exposure scenario (Mayer et al. 2007; Bittner et al. 2011). PAH sorption is mainly governed by humic substances that are flexible in shape in the presence of water and act as a trap for hydrophobic molecules (Laor et al. 1998; Fanget et al. 2002). Dissolved organic matter and particulate organic matter in water reduce the freely dissolved PAH concentration and their bioaccumulation in organisms (Haitzer et al. 1999; Akkanen and Kukkonen 2003; Akkanen et al. 2012; Laor et al. 1998; Fanget et al. 2002). In this study, for similar Fluo sediment content, 5 % peat concentration reduced Fluo bioavailability leading to low toxicity compared to 2.5 % peat. Penetration of hydrophobic chemicals in living organisms is limited by the aqueous unstirred boundary layer between the organisms and the water column. This layer acts as an efficient barrier for the diffusive transfer of most hydrophobic chemicals to living organisms. However, facilitation of transport in the presence of dissolved organic matter was recently demonstrated (Mayer et al. 2007; Bittner et al. 2011; ter Laak et al. 2009). In addition, dissolved organic matter can change the PAH water solubility (Döring and Marschner 1998; Laor et al. 1998). At high concentrations of dissolved humic substances the diffusive conductivity is increased, this results in increased uptake of pollutants by organisms. It may enhance transportation by associating with the toxic compound, its diffusion and its release into the organisms.

Variability in the intensity of organism responses within the three first experiments may be due to different egg batches and above all different Fluo exposure concentrations. At low concentrations, Fluo stimulated the organism, inducing tachycardia and early hatching in experiment 1. In contrast, at higher concentrations, Fluo induced stronger toxicity with morphological abnormalities leading to hatching delay in experiments 2 and 3.

In conclusion, hydrophobic pollutants are able to accumulate in sediments by binding to silicates, clay and organic matter. However organic pollutants are trapped in organic matter complex structure while binding interactions with clay and silicates are more sustainable. Consequently, the organic matter content of sediment is thought to be one of the main factors driving hydrophobic pollutant availability in the aquatic environment. In addition, the daily ERS renewal performed to stabilised dissolved oxygen above 80 % (OECD 1992), led to moderate sediment and particle re-suspension during the exposure. This process could increase PAH desorption and consequently improve PAH bioavailability.

In the final experiments the artificial sediment was spiked with BaA or BaP. BaP was shown to delay hatching but had low teratogenic effects in medaka embryos. In contrast, BaA as well as Fluo had no effect on the kinetic of embryonic development but conversely induced a high level of larval abnormalities. Our findings support those of Incardona et al. for PAH embryotoxicity (Incardona et al. 2004; 2005; 2006; 2011). Fluo toxicity can be explained by by multi-targeting cardiac functions (Incardona et al. 2004; 2005). In our study Fluo induced more severe cardio-vascular abnormalities than BaP, such as abnormal heart location and blood circulation defects. After waterborne exposure of zebrafish larvae to BaP or Fluo, Matson et al. (2008) also observed a higher prevalence of cardiac, peri-cardiac and spinal dysfunctions following exposure to Fluo. BaP bioavailability may be limited by its weak solubility. BaA, known as a strong AhR agonist (Incardona et al. 2006; Barron et al. 2004), was shown in this study to induce morphological abnormalities such as lordosis, scoliosis and craniofacial deformities but no significant cardiac dysfunction. BaP acts partly through the AhR2 agonist pathway (Incardona et al. 2011), and appeared to be less embryotoxic than BaA. Moreover, despite having a lower spiking efficiency, BaP is a compound with high soilwater partition coefficient (Log $K_{oc} = 6.1-6.3$), and may present a stronger adsorption to sediment than Fluo (Log $K_{oc} = 4.6-4.7$). In our bioassay conditions, Fluo molecules were certainly more available for Japanese medaka embryos. Our results suggest that the PAH toxicity in Japanese medaka early life stages was related to the aromaticity of the compounds tested. In contrast to the non-polar narcosis model (Schultz 1989), increasing the log Kow results in decreasing PAH toxicity: Fluo > BaA > BaP.

5. Conclusion

The present study aimed to develop a new artificial sediment for hydrophobic chemical testing using fish embryo-larval assay. Suitable sediment composition includes 92.5 % dw of 0.2-0.5 mm silica, 5 % dw clay and 2.5 % dw *Sphagnum* blond peat. This artificial sediment was tested by measuring spiking efficiency and toxicity of three model PAHs, both directly related to sediment composition. Organic matter was one of the main factors driving PAH embryo-larval toxicity. To fully validate this sediment, other hydrophobic organic pollutants and complex pollutant mixtures should be tested. It was also highlighted that Japanese medaka early life stages are highly sensitive to particle-sorbed PAHs.

Acknowledgments

This work was funded by the French National Agency for Research, program "Contaminant, Ecosystème et Santé", in the frame of the ConPhyPoP (2009-002) research project. Equipments were funded by GDR EXECO and Aquitaine Region. Florane Le Bihanic received a PhD fellowship from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Prescilla Perrichon received a PhD fellowship from Conseil Général de Charente Maritime and Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer. The authors wish to thank Steffen Keiter and Hanno Zielke for their discussion on sediment preparation and the Sibelco Company for generously providing sand.

ARTICLE 2

<u>Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity</u> <u>assay with zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese</u> <u>medaka (*Oryzias latipes*) following sediment contact <u>assay</u></u>

Article soumis dans *Environmental Science and Pollution Research* Au sein de la revue spéciale ConPhyPoP: "PAHs and fish – Exposure monitoring and adverse effects from molecular to individual level"

Prescilla Perrichon^{a, *}, Florane Le Bihanic^b, Paco Bustamante^c, Karyn Le Menach, Hélène Budzinski^b, Jérôme Cachot^b and Xavier Cousin^{a, d}

^a Ifremer, Laboratoire d'Ecotoxicologie, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France
^b Université de Bordeaux (EPOC, UMR CNRS 5805), avenue des Facultés, 33405 Talence
Cedex, France
^c Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), CNRS-Université de La Rochelle, UMRi 7266,

2 rue Olympe de Gouges, 17042 La Rochelle Cedex 01, France

^d INRA, LPGP, Campus Beaulieu, 35042 Rennes Cedex, France

*Corresponding author (present address). P. Perrichon, UMRi 7266 LIENSs, Université de La Rochelle, 2 rue Olympe de Gouges, 17042 La Rochelle Cedex 01, France. Tel.: +33 5 46 50 76 32. Fax: +33 5 46 50 76 63. prescilla.perrichon@hotmail.fr

Abstract

Due to hydrophobic and semi-persistent properties, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have a high capacity to accumulate in aquatic sediments. PAHs are used as sediment quality criteria for the assessment of habitat quality and risk for aquatic life. Sediment contact assay using zebrafish embryos and larvae are reliable alternatives for animal toxicity testing. In the context of European regulation, a new reference exposure protocol using artificial sediment was established to standardize toxicity testing and to limit natural sediment composition variability. The first objective was to develop an artificial sediment composition for zebrafish embryo-larval assay using two models PAH, benzo[a]pyrene and fluoranthene. Then, a comparative study of toxicity responses from this exposure protocol was performed using another OECD species, the Japanese medaka. The potential toxicity of both PAHs was assessed through lethal and sublethal endpoints (e.g. survival, hatching success, abnormalities, PMR and EROD) measured at different developmental stages. Regarding effects observed for both species, a suitable artificial sediment composition for PAH toxicity testing was set to 92.5 % dw silica of 0.2-0.5 mm grain size, 5 % dw kaolin clay and 2.5 % dw blond peat for Japanese medaka. PAH bioavailability and toxicity were highly dependent on the fraction of organic matter in sediment and of the K_{ow} coefficients of the tested compounds. While they are physiologically-closely related fish species, Japanese medaka embryos appeared more robust than zebrafish embryos for understanding the toxicity of PAHs due to longer exposure duration and higher chorion porosity.

Keywords: Fish embryo-larval assay, PAHs, artificial sediment, embryotoxicity, teratogenicity, behavioral performance.

1. Introduction

Aquatic environment continuously receives anthropogenic pollutants which impact the habitat quality of these ecosystems, and can represent an important threat for aquatic life. Natural phenomenon - tides, storms and bioturbation - (Hollert et al., 2000) and anthropogenic activities - trawling, dredging and wake waves - (Köthe, 2003) can release sediment-linked pollutants such as Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in the water column, leading to acute exposure of aquatic organisms. PAHs constitute an important part of pervasive compounds and their emission is increasing with the development of human activities (Dabestani and Ivanov, 1999; Landrum et al., 2003; Shen et al., 2013; van der Oost et al., 2003). These compounds are ubiquitous and semi-persistent in the environment due to their chemical properties. Indeed, most of PAHs exhibit hydrophobic properties and have a high capacity to adsorb on particles. These properties favors their accumulation in sediments which can result in high PAHs concentrations in aquatic ecosystems. Therefore, sediments represent a major source of contamination, causing a threat to organisms for which they are habitat and food source (Ahlf et al., 2002; Wölz et al., 2009). Because of their high lipophilicity, PAHs are bioaccumulated in aquatic organisms. Therefore, toxicity assessment of the PAHs is necessary to determine sediment quality values to assess their impact on aquatic life.

Fish are an indispensable component for environment quality assessment due to their life and habitat diversity, their position in aquatic food chains and their variety of stress response level (Gilliers et al. 2006; Amara et al. 2007; Kerambrun et al. 2012). Fish use in toxicity testing strategies has been considerably increased in recent years because they are sensitive to pollutants (Di Giulio and Hinton, 2008; Padilla et al., 2009). Furthermore, fish early life stage (ELS) are particularly sensitive to the adverse effects of the organic pollutants which impact their growth, development, physiology and behavior (Incardona et al., 2004; Lammer et al., 2009; Muhling et al., 2012; Scott et al., 2011). In contaminated area, the presence of pollutants can dramatically decrease ELS condition and thus impacts fish survival and population recruitment (Heintz et al., 2000; McGurk and Brown, 1996; Muhling et al., 2012). To assess the potential risk of sediment pollution on the aquatic environment, sediment contact tests with fish ELS are relevant tools to evaluate the bioaccumulation and toxicity of these pollutants (Bartzke et al., 2010; Feiler et al., 2013; Hollert et al., 2003; Kosmehl et al., 2007). However, the extensive use of this test animal raises ethical questions. In application to

the 3Rs principle (Replace, Reduce and Refine), established by Russell and Burch (1959), and to the REACh regulation (Registration, Evaluation, Authorization & restriction of Chemicals) (Hengstler et al., 2006; Van der Jagt et al., 2004), alternative methods need to be developed to reduce the number of organisms used as well as their pain and suffering (Belanger et al. 2010; Embry et al. 2010; Lammer et al. 2009; Strähle et al. 2012).

The use of fish ELS - as an experimental model - is one of the alternative methods proposed for chemical testing. Early developmental stages assays (from the embryonic stage until the exogenous feeding) are considered as *in vitro* tests. In fact, they are not regulated by the EU directive on the protection of animals used for scientific purposes (2010/63/EU). Acute toxicity tests with fish ELS have been developed considerably for hazard identification and risk assessment (Embry et al., 2010; Fraysse et al., 2006).

Five species have been recommended for chemical risk assessment: bluegill (Lepomis macrochirus), fathead minnow (Pimephales promelas), rainbow trout (Oncorhyncus mykiss), Japanese medaka (Oryzias latipes) and zebrafish (Danio rerio) (Lammer et al., 2009; OECD, 2013b). Zebrafish and Japanese medaka were selected as experimental model in the present study. The use of zebrafish for toxicity testing provides a large number of benefits (Hill et al., 2005; Spitsbergen and Kent, 2003). First, they are easily bred in the laboratory and eggs are available in high numbers throughout the year. Moreover, transparency of chorion and larvae allow to monitor morphological defects and all stages of development during exposure, which are well described and illustrated in the literature (Kimmel et al., 1995). Finally, zebrafish have a short development time (hatching between 48 and 72 hpf at 28 °C). Japanese medaka offers similar advantages than zebrafish embryos, except that the development time is longer. Japanese medaka hatches after 9 to 10 days post-fertilization at 26 °C which increase the duration of exposure. Zebrafish and medaka are now used extensively for sediment toxicity testing and several previous studies demonstrated that these species are suitable (Barjhoux et al., 2012; Braunbeck et al., 2005; Cachot et al., 2007; Farwell et al., 2006; Hollert et al., 2003; Höss et al., 2010; Kosmehl et al., 2006; Vicquelin et al., 2011).

The aim of the present study was to assess and to compare the toxicity of two hydrophobic compounds, Benzo[a]pyrene (BaP) and Fluoranthene (Fluo) on ELS of two fish species, the zebrafish and the Japanese medaka following sediment contact exposure protocol. BaP and Fluo are listed as priority substances by the European Water Framework Directive 2000/60/EC (EC, 2000) and were selected in this study for their high adsorption capacities on particles. The first objective was to establish artificial sediment based on protocols described in Le Bihanic et al. (submitted a). The use of artificial sediment provides some benefits

compared to natural sediment: 1) absence of background contamination, 2) wellcharacterization, 3) reproducible composition of sediment, and 4) absence of indigenous biota (Burton, 2002). The artificial sediment was constituted of three essential compounds: sand, clay and organic matter. Firstly, the organic matter content of the artificial sediment was adapted for the zebrafish model assessing bioavailability of these two PAHs: BaP (Log K_{ow} = 6.04) and Fluo (Log K_{ow} = 5.16). Then, a comparative sensitivity of zebrafish and Japanese medaka embryo-larval assays was performed using results from this study and previously published researches (Le Bihanic et al. submitted a). In order to compare sensitivity of toxicity responses (threshold and intensity) of both ELS assays, individual, morphological and behavioral markers were used.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Benzo[a]pyrene, fluoranthene and benzocaine were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Spiking PAH solutions were made in isooctane (HPLC grade, Scharlau Barcelona, Spain) at 750 μ g.L⁻¹. PAH spiked-sediment and chemical analysis were performed with dichloromethane solvent from Biosolve (Valkensward, The Netherlands) and Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium).

2.2. Preparation of spiked artificial sediment

The artificial sediment was prepared according to Le Bihanic et al. (submitted a). The reconstituted sediment was composed of sand 0.2-0.5 mm size (sieved from sand BB 0.2/2 h, Mios, France), 5 % kaolin clay (Merck, Darmstadt, Germany) and *Sphagnum* blond peat (Florentaise, St Mars du Désert, France). Three concentrations of peat (0, 2.5 and 5 % of peat) were tested to adapt its composition to the zebrafish ELS protocol. Briefly, peat was dried 48 h and sieved (0.5 mm). Milli-Q water was added to the peat (12:1, v/v) in glass bottles and shaken during 48 h at 180 rpm at room temperature. Sand and 5 % kaolin clay were then mixed to humid peat, and shaken for 24 h. pH was adjusted to 6.5 with 10% CaCO₃ solution.

After seven days of stabilization (at room temperature) 1:4 v/v of milli-Q water was added to the sediment and shaken again. After a 24 h equilibration period, supernatant water was removed and the sediment was dried at 105 °C for 14 h. After cooling, the artificial sediment was spiked with two PAHs, BaP and Fluo at 10 μ g.g⁻¹ dw sediment each, equivalent to 20fold environmental concentration based on the concentration measured in sediments from the upper Seine estuary (France) (Cachot et al., 2006). 60 mL of dichloromethane and PAH solution were mixed to 30 g of sediment in a 250 mL round-bottom glass flask. Then, solvent was evaporated with a rotary evaporator Rotavapor (IKA, Staufen, Germany) for 60 min (115 rpm, 45 °C). The spiked sediment was stored overnight in the dark at room temperature under a fume hood to ensure complete residual solvent elimination. A solvent control sediment (dichloromethane without PAH) was prepared in the same manner. An aliquot (5 g) of each spiked sediment was sampled for PAH chemical analysis.

2.3. PAH chemical analysis of artificial sediment

Sediment samples were stored at -20 °C before analysis. Fluoranthene-d10, benzo[a]pyrene-d12 were used as internal standards for the quantification of PAHs. Briefly, organic compounds were extracted from 0.2 g of sediment using a microwave (10 min at 30 W) with dichloromethane (solvent) (Budzinski et al., 2000). Samples were then concentrated into 300 μ L of isooctane using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap Labconco, Kansas city, USA). Extracts were purified and fractionated on alumina and silica micro-columns, following the procedure described by Behar et al. (1989). Finally, these extracts were concentrated again in isooctane and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) as described by Baumard et al. (1998). Extraction efficiencies were equivalent in average to 84 %.

2.4. Zebrafish embryo-larval assays

2.4.1. Maintenance and egg production of zebrafish

Wild type TU strain (Tübingen, Germany) zebrafish (*Danio rerio*) were maintained in communities in 10 L tanks under standard conditions in water obtained after a mix of reverse osmosis treated water and tap water, both being filtered beforehand with dust and charcoal

filters, to obtain a pH of 7.5 \pm 0.5 and a conductivity of 300 \pm 50 µS.cm⁻¹. Racks aeration allowed an oxygen saturation \geq 80 %. Water and room temperature were kept between 26 and 28 °C with 14 h light/10 h dark photoperiod. Ammonia, nitrite and nitrate were monitored daily for 2 months then weekly and remained within recommended ranges (Lawrence, 2007). The fish were fed twice a day with commercial granulates (INICIO Plus 0.5, BioMar, France) and an additional distribution of *Artemias* sp. nauplii (INVE, Belgium), occasionally supplemented with red sludge worms (Boschetto-Frozen fish food). Eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish. One adult male and one female were placed together the evening before eggs were required in spawning boxes (AquaSchwarz, Germany). Spawning and fertilization took place within 30 min after the onset of light in the morning.

2.4.2. Zebrafish exposure

Fertilized and normally developed eggs were selected at 8-cell stage (1h15 post fertilization) using a dissecting microscope. Egg fertilization rate had to be \geq 70 % and a mix of five spawns was used to avoid a potential spawn effect. Artificial water (E3) according to ISO 7346/3 (1996) was used as test medium (0.33 mM CaCl₂ · 2 H₂O, 0.33 mM MgSO₄ · 7 H₂O, 5 mM NaCl and 0.17 mM KCl). Exposure tests were carried out in plastic Petri dish (35 mm diameter) with 3 g dw artificial sediment and 3 mL artificial water in triplicates. 30 embryos were placed on a 1 mm thermoformed Nytex® grid to avoid being buried into the sediment, and exposed for 96 hours in incubator at 28 ± 0.5 °C, with the same photoperiod as the rearing room. During exposure, Petri dishes were covered with lid in order to prevent evaporation. At the end of exposure, larvae were transferred in new Petri dish containing only E3 medium for analysis.

2.4.3. Survival and hatching success

Embryonic and larvae survival were daily recorded until 10 dpf. Dead individuals were removed. Survival rate (SR) was estimated as: $SR = 100 (SNt_x / SNt_0)$, where SNt_x and SNt_0 are the number of live individuals at times t_x (measured time) and t_0 (beginning of the experiment, 0 hpf). Similarly, hatched individuals were counted between 48 and 72 hpf. At the exposure end, hatching success (HS) was calculated as: $HS = 100 (HIt_{96h} / SNt_{96h})$, where

HIt_{96h} is the number of hatched and live at 96 hpf (exposure end). All data were expressed as percentages.

2.4.4. Biometric measurements and abnormalities monitoring

At the end of exposure (96 hpf), 15 larvae per replicate (45 per treatment) were anesthetized with benzocaine (16 μ g.L⁻¹). Larvae were immobilized in left lateral view with 3 % methylcellulose under dissecting microscope (Olympus SZX9, 10x). Then, larvae were photographed using DMK 31AU03 camera and IC Capture 2.2 software (both The Imaging Sources, Germany). From these pictures, head length (from terminal point of lower jaw to rear operculum), standard body length (from terminal point of lower jaw to the end of tail without caudal fin) and yolk sac area (including swim bladder area) were measured with ImageJ software (Schneider et al., 2012). Furthermore, morphological abnormalities were recorded individually based on the sublethal endpoints as described in Lammer et al. (2009). Abnormalities scored were: 1- Edema formation (brain, pericardia, yolk sac); 2- Skeletal deformities (scoliosis, lordosis, tail bud deformities); 3- Craniofacial deformities (jaw, development of eyes, head deformities); 4- Cardiac deformities (anemia, hemorrhage, atrium/ventricle size, blood circulation heart position); 5- Yolk sac malabsorption. Abnormalities were analyzed with a scoring system from 0 to 3 according to their occurrence and severity: (0) healthy larvae, (1) one abnormality or mild-affected, (2) two abnormalities or moderately affected, (3) three abnormalities or more or severely affected larvae. In addition, general developmental retardation was noted. Results were expressed in percentage.

2.4.5. Behavioral test by monitoring of PhotoMotor Response

Behavioral tests were conducted to monitor photomotor response (PMR), following the procedure described by Péan et al. (2013) with slight modifications. The day before analysis, 4 dpf larvae were acclimated individually in a 24 wells-plate (Krystal 24, transparent bottom and opaque walls) with 2 mL of E3 medium in climate chamber (28 ± 0.5 °C). Well-plates were covered with lid to avoid evaporation and were transferred two hours before video tracking in analysis room (28 ± 0.5 °C) the following day to perform behavioral analysis. Behavioral analysis were performed during period of stable activity (between 1 and 6 pm) for zebrafish according to MacPhail et al. 2009. Larvae were filmed in a lightproof and temperature-controlled box with a DMK31AU03 camera (The Imaging Sources, Germany) and lens Fujinon (1.4-12.5 mm) and IC Capture 2.2 software (The Imaging Sources,

Germany). An infrared floor into the box was used to record in both light and dark conditions. Larvae were placed in the box five minutes before recording their behavior in order to acclimatize them in light. Recording includes three periods of 5 min: 5 min Light On (1), 5 min Light Off and 5 min Light On (2). Video analyses were performed with Ethovision 8.5 software (Noldus, The Netherlands). The behavioral performances of larvae (30 per PAH treatments) were assessed by measuring the distance moved (cm) during the three periods of the light/dark challenge. Distance moved is calculated by the difference between center point of the larvae from two consecutive X-Y coordinates summed over a 5-min periods.

2.4.6. In vivo EROD activity

In vivo EROD activity was measured on 15 zebrafish larvae per treatment. The assay was performed according to Carney et al. (2004) and Otte et al. (2010) with slight modifications. Briefly, individual larvae (96 hpf) from each replicate treatment were incubate in 21 µg.L⁻¹ 7-ethoxyresorufin dissolved in 1 mL of E3 for 5 hours. Larvae were then anesthetized with 16 µg.L⁻¹ benzocaine and mounted in 3 % methylcellulose to immobilize them (left lateral view) for observation of yolk sac. All the procedure was performed in lightprotected conditions and at 28 ± 0.5 °C. Fluorescence of the resorufin was examined under a fluorescence microscope (Olympus BX41, 100x) equipped with Rhodamin red filter (excitation/emission: 560 nm/580 nm). Yolk sac of larvae was photographed with camera (DMK31AU03) and IC Capture 2.2 software (both The Imaging Sources, Germany). Image with HeatMap Histogram (Péan S., analysis was done plugin http://www.samuelpean.com/heatmap-histogram/) from ImageJ software (Schneider et al., 2012). For EROD analysis, a Control treatment composed of 15 larvae non-sediment exposed was analyzed in supplement. Results were expressed in integrated density of pixels (arbitrary unit).

2.5. Medaka embryo-larval assay

2.5.1. Japanese medaka exposure

The fish embryo-larval toxicity test was performed as described in Le Bihanic et al. (submitted a). 1 dpf medaka embryos (CAB strain providing GIS-Amagen (INRA), Jouy-en-Josas, France) were exposed using the same procedure as for zebrafish embryos with some modifications. Embryos were exposed during all the embryonic development until hatching peak (11 dpf) at $26 \pm 0.3^{\circ}$ C with a 12h light/12h dark photoperiod. During the exposure artificial water was daily renewed. Egg Rearing Solution ERS was used as artificial water (85.6 mM NaCl, 0.4 mM KCl, 0.4 mM CaCl₂ and 1.4 mM MgSO₄). After hatching, larvae were observed and transferred in new Petri dish containing a mix of osmose water and tap water. Experiment was stopped three days post hatching peak.

2.5.2. Morphological endpoints

Similar morphological endpoints were analyzed for medaka embryo-larval assay and are described in Le Bihanic et al. (submitted a). As zebrafish embryo-larval assay, survival rate, hatching success, biometric analysis, abnormalities and heartbeat (in supplementary data) were analyzed.

2.5.3. Behavioral test by monitoring of PMR

PMRs were measured in similar condition than zebrafish assay with slight adaptations for Japanese medaka. 14 dpf larvae were acclimated individually 2 hours in a 48 well-plate with 500 µl of ERS in dark inside the Daniovision chamber (Noldus, The Netherlands) at 23°C. 18 larvae per treatment were filmed with IR digital video camera (Ikegami Electronics, Neuss, Germany) during four periods of 10 min : 10 min Light Off (1), 10 min Light On (1), 10 min Light Off (2) and 10 min Light On (2). The video analyses were performed with Ethovision 9.0 software (Noldus, The Netherlands). As zebrafish assay, the behavioral performances of larvae were assessed by measuring the distance moved (cm) during the four periods of the light/dark challenge.

2.6. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Statistica 9.0 software (StatSoft, USA). A one-way measure ANOVA was conducted or each variable and treatment to assess difference between experimental replicates. No difference between replicates was detected, the three replicates were considered as homogenous group. Normality and homoscedasticity of the data were verified using Shapiro-Wilk and Levene tests respectively. For percent survival, hatching and abnormalities data, Fisher tests were performed. Student-t tests were performed for the biometric analysis and the PMR in order to assess the effects of the different exposure treatment (BaP, Fluo) with their respective Solvent control. EROD data were analyzed using a one-way measure ANOVA supplemented by a post-hoc Tukey test. When the parametric assumptions were not respected, the non-parametric Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were conducted. The behavioral data for Japanese medaka assay were analyzed with an ANOVA (Le Bihanic et al. submitted a). Results were expressed as mean \pm SEM. The statistic threshold was fixed at P=0.05.

3. <u>Results</u>

3.1. Chemical analysis of spiked sediments

Spiking efficiencies ranged from 17 to 63 % according to concentrations of peat and compound analyzed. For BaP, they were of 17, 18 and 20 % for 0, 2.5 and 5 % peat respectively. For Fluo, spiking efficiencies were 3.7-fold for 0 %, 3.3-fold for 2.5 % and 2.2-fold for 5 % higher than for BaP in sediment. Fluo spiking efficiency was slightly higher for no-peat sediment (63 %) than for 2.5 % (59 %) and 5 % peat (44 %).

3.2. Zebrafish embryo-larval assay

3.2.1. Survival and hatching success

Survival and hatching success of zebrafish embryos during BaP and Fluo exposures are shown in Table 15. Whatever the peat proportion, BaP tested concentration did not induce lethal effects on embryos and larvae while it was the case for the Fluo exposure. Survival rate for BaP-exposed fish ranged from 89.9 to 95.6 % at the end of the exposure (96 hpf) and from 88.9 to 92.2 % at 240 hpf. In contrast, 5 % Fluo-spiked sediment with no peat induced a significant larval mortality compared to the solvent control group with 43.2 and 13.2 % respectively (Fisher, P<0.01). For 2.5 % peat Fluo-spiked sediment, no significant larval mortality was observed with 95.6 % and 96.7 % for Solvent and Fluo survival rate respectively (Fisher, P>0.05).

BaP did not induce hatching delay for all three sediment peat contents (success varied from 95.2 to 100 %). In contrast, hatching success was significantly reduced by Fluo in 0 and 5 % peat sediment as compared to respective control group (decreasing of 10.4 % and 13.5 %, P=0.005 and P=0.004 respectively).

			Survival rate	e (%)	Hatching success (%)	
			96 hpf	240 hpf	96 hpf	
0.0/ Deet	Solvent	n= 89	89.9	89.9	100	
0 % Peat	BaP	n= 90	95.6	92.2	100	
$2 = 0/D_{}$	Solvent	n= 90	93.3	87.8	95.2	
2,5 % Peat	BaP	n= 90	94.4	92.2	100	
5.0/ D /	Solvent	n= 90	93.3	88.9	100	
5 % Peat	BaP	n= 90	92.2	90.0	100	
	Solvent	n= 90	97.8	96.7	100	
0 % Peat	Fluo	n= 90	54.6*	Production Production 240 hpf 96 hpf 89.9 100 92.2 100 87.8 95.2 92.2 100 88.9 100 90.0 100 96.7 100 46.6* 89.6* 93.3 100 96.7 96.5 94.4 97.7 82.4* 84.2*	89.6*	
$2 = 0/D_{}$	Solvent	n= 90	95.6	93.3	100	
2,5 % Peat	Fluo	n= 90	96.7	96.7	96.5	
5 0/ D4	Solvent	n= 90	96.7	94.4	97.7	
5 % Peat	Fluo	n= 90	83.5*	82.4*	84.2*	

Table 15. Viability and hatching success of zebrafish assessing BaP and Fluo toxicity regarding different peat sediment contents.

Asterisks indicate significant differences with respective Solvent control (Fisher test, P<0.05)

3.2.2. Biometric measurements

Biometric measurements of 96 hpf larvae exposed to BaP or Fluo for each peat content, are shown in Tables 16 and 17, respectively. For all three sediment peat contents, BaP exposure did not induce modifications of larval biometric parameters (Table 16) whereas larvae exposed to Fluo had developmental retardation (Table 17). For 0 % peat content, standard body length and ratio head/standard length were significantly reduced in Fluo-exposed larvae (1.1 fold smaller as compared to control larvae, Student t, P<0.001 each). In contrast yolk sac area and ratio yolk sac/whole larval area were significantly increase of 1.3 and 1.4 fold respectively (Student t, P<0.001). For 2.5 % peat content, no biometric modifications were observed between treatments except for the ratio yolk/whole larval area in Fluo-exposed larvae (1.04 fold) that significantly increased (Student t, P=0.04). Similar results were observed for 5 % peat content. Larvae exposed to Fluo had a ratio yolk sac/whole larval area 1.1 fold larger than control larvae (Student t, P=0.04).

3.2.3. Morphological abnormalities

The percentage of abnormal individuals at 96 hpf, and the different abnormalities and severity are also summarized in Tables 16 and 17 for BaP for Fluo treatments, respectively. Peat concentration in each treatment did not induce significant morphological abnormalities as compared to respective control (Fisher, P=0.61, P=0.73 and P=1.0 for 0 %, 2.5 % and 5 % respectively). No developmental retardation was observed in BaP exposed larvae whatever the peat concentration. In absence of peat, 56 % of Fluo-exposed larvae exhibit a delayed development, and 100 % of larvae at the highest peat concentration. While it was a control condition, 49 % of larvae display developmental retardation at the highest peat concentration.

	0 %	Peat	2.5 % Peat		5 % Peat	
	Solvent	BaP	Solvent	BaP	Solvent	BaP
	n=35	n=38	n=35	n=40	n=39	n=38
Standard length (mm)	3.57 ± 0.03	3.57 ± 0.03	3.58 ± 0.03	3.62 ± 0.02	3.60 ± 0.03	3.60 ± 0.02
Ratio Head/Standard length (%)	18.3 ± 0.11	18.6 ± 0.14	18.6 ± 0.15	18.2 ± 0.18	18.6 ± 0.14	18.5 ± 0.11
Yolk sac area (mm ²)	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.34 ± 0.01
Ratio Yolk sac/Whole larval area (%)	26.4 ± 0.41	26.4 ± 0.53	26.6 ± 0.42	25.5 ± 0.37	26.6 ± 0.68	26.4 ± 0.48
Abnormal individuals (%)	2.86	7.89	14.3	10.0	7.69	5.26
Severity of abnormality (Scoring/3) (%):						
No affected (Score 0)	97.1	92.1	85.7	90.0	92.3	94.7
Mild (Score 1)	0.00	2.63	2.86	7.50	0.00	0.00
Moderate (Score 2)	0.00	2.63	2.86	0.00	0.00	0.00
Severe (Score 3 or more)	2.86	2.63	8.57	2.50	7.69	5.26
Abnormalities among abnormal individuals	5					
(%):						
Oedemas	1.43	2.63	5.10	3.33	3.21	1.50
Axial Skeleton	0.00	1.32	4.08	5.00	1.92	1.50
Craniofacial	0.71	1.32	4.08	1.67	2.56	1.50
Cardiovascular	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Yolk sac malabsorption	0.71	2.63	1.02	0.00	0.00	0.75
Developmental retardation (%)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Table 16. Developmental endpoints for assessing teratogenicity of BaP on larval zebrafish with different peat sediment contents.

No significant differences were observed

(P>0.05)

0 %	Peat	2.5 % Peat		5 % Peat	
Solvent	Fluo	Solvent	Fluo	Solvent	Fluo
n=43	n=18	n=41	n=39	n=41	n=19
3.45 ± 0.02	$3.11 \pm 0.09*$	3.41 ± 0.02	3.40 ± 0.02	3.30 ± 0.02	$3.17\pm0.02*$
18.3 ± 0.10	$16.4 \pm 0.42*$	17.7 ± 0.16	17.2 ± 0.20	17.0 ± 0.16	17.3 ± 0.20
0.31 ± 0.01	$0.40\pm0.02\texttt{*}$	0.31 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.35 ± 0.01
27.0 ± 0.40	$39.0 \pm 2.50*$	27.0 ± 0.40	$28.0\pm0.50*$	30.0 ± 0.80	$32.0\pm0.90*$
4.65	22.2	7.32	2.56	2.44	10.5
95.4	77.8	92.7	97.4	95.1	79.0
2.33	11.1	7.32	2.56	2.44	15.8
0.00	11.1	0.00	0.00	2.44	5.26
2.33	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
8					
1.16	11.1	7.32	2.56	0.00	3.51
1.16	7.41	0.00	0.00	2.44	3.51
1.16	0.00	0.00	0.00	0.00	3.51
0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
1.16	3.70	0.00	0.00	0.00	0.00
2.00	56.0*	0.00	10.0	49.0	100*
		$\begin{tabular}{ c c c c c c }\hline\hline 0 & \% & \mbox{Peat} \\\hline\hline Solvent & Fluo & $n=18$ \\\hline\hline 3.45 \pm 0.02 & 3.11 ± 0.09*$ \\\hline\hline 18.3 \pm 0.10 & 16.4 ± 0.42*$ \\\hline 0.31 \pm 0.01 & 0.40 ± 0.02*$ \\\hline\hline 27.0 \pm 0.40 & 39.0 ± 2.50*$ \\\hline\hline 4.65 & 22.2 \\\hline\hline 95.4 & 77.8 \\\hline\hline 2.33 & 11.1 \\\hline\hline 0.00 & 11.1 \\\hline\hline 2.33 & 0.00 \\\hline\hline s & \hline\hline 1.16 & 11.1 \\\hline\hline 1.16 & 7.41 \\\hline\hline 1.16 & 3.70 \\\hline\hline 2.00 & 56.0*$ \\\hline\hline \end{tabular}$	$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$	$\begin{tabular}{ c c c c c c c c c c c c c c c c c c c$

Table 17. Developmental endpoints for assessing teratogenicity of Fluo on larval zebrafish with different peat sediment contents.

Asterisks indicate significant differences with respective Solvent control (P<0.05)

3.2.4. In vivo EROD activity

EROD activities in 96 hpf zebrafish larvae exposed to BaP, showed a significant induction over Solvent control and Control treatment for 0 and 5 % peat (Fig. 26A). EROD activity increased significantly from 2.4 to 1.6-fold compared to Solvent control, for 0 and 5 % peat respectively (ANOVA, P<0.001). No increase was observed for 2.5 % peat (ANOVA, P=0.12). For EROD activity measured in larvae exposed to Fluo-spiked sediment with 2.5 % peat (Fig. 26B), a significant 2.4-fold induction was observed over the Solvent control (ANOVA, P=0.03) but not over the Control treatment (ANOVA, P=0.58). No significant difference of EROD activity was however recorded between both controls (ANOVA, P=0.33). Similarly, no significant difference was observed in larvae exposed to Fluo spiked-sediment with 0 % and 5 % peat (ANOVA, P=0.22 and KW, P=0.05 respectively).



Figure 26. *In vivo* measurement of EROD activity in 96 hpf zebrafish larvae exposed to BaP (A) and Fluo (B) for different peat sediment contents. All data are presented as mean \pm SEM, n=15 per treatment. Asterisks indicate significant differences with Control treatment and Dark traits between others treatments (ANOVA, * P<0.05 and *** P<0.001).

3.3. ELS PhotoMotor Response

3.3.1. Zebrafish larvae PMR

PMR of zebrafish larvae (at 120 hpf) exposed to BaP in different conditions of peat are shown in Fig. 27. Response patterns of larvae were similar for each peat condition showing an increasing swimming activity during in stress period (Light Off). BaP larvae swimming activity was significantly reduced from Control treatment only in Light Off period for 0 % peat condition (Fig. 27A). Fish from all treatments 2.5 % and 5 % showed a similar response pattern to the challenge and no significant differences in swimming activity were observed (Student t, P>0.05) (Fig. 27B, 27C). PMR of zebrafish larvae (at 120 hpf) exposed to Fluo in different conditions of peat are shown in Fig. 28. Swimming activity decreased significantly in each period of light/dark changes for the condition without peat (Fig. 28A). No significant differences were observed between Fluo and Solvent treatments for 2.5 % and 5 % peat conditions (Student t, P>0.05) (Fig. 28B, 28C).

3.3.2. Japanese medaka larvae PMR

PMR of Japanese medaka (14 dpf) exposed to BaP and Fluo are shown in Fig. 29. The first dark period is performed to stabilize swimming activity of larvae. Response patterns of larvae were similar for each peat condition showing an increasing swimming activity during Light Off (2) period. 0 % BaP-exposed larvae swam significantly higher distances than Solvent control larvae (Fig. 29A). Swimming activity of 0 % Fluo-exposed larvae was not significantly different compared to Solvent control (ANOVA, P>0.05). Regarding 2.5 % peat condition, whatever PAH considered, no significant differences in swimming activity were observed (ANOVA, P>0.05) (Fig. 29B). PMR of larvae in 5 % peat condition showed an opposite response pattern to the larvae in condition without peat (Fig. 29C). Distance moved by BaP-exposed larvae was only significantly lower in first light period as compared to Solvent control larvae. Fluo-exposed larvae swam significantly 1.9-fold less for Light On (1) and 1.8-fold less for Light Off (2) periods than Solvent control larvae.


Figure 27. PMR measured in 120 hpf zebrafish larvae exposed to BaP. Locomotor activity of larvae in each 5-min periods of light/dark challenge was measured for different peat sediment contents: 0 % peat (A), 2.5 % peat (B), 5 % peat (C). All data are presented as Mean \pm SEM, n=30 per treatment. Dark traits indicate significant differences with respective Solvent control (Student t-test, P<0.05).



Figure 28. PMR measured in 120 hpf zebrafish larvae exposed to Fluo. Locomotor activity of larvae in each 5-min periods of light/dark challenge was measured for different peat sediment contents: 0 % peat (A), 2.5 % peat (B) and 5 % peat (C). All data are presented as Mean \pm SEM, n=30 per treatment. Dark traits indicate significant differences with respective Solvent control treatment (Student t-test, P<0.05).



Figure 29. PMR measured in 14 dpf Japanese medaka larvae exposed to BaP and Fluo. Locomotor activity of larvae in each 10-min periods of light/dark challenge was measured for different peat sediment contents: 0 % peat (A), 2.5 % peat (B) and 5 % peat (C). All data are presented as Mean \pm SEM, n=15 per treatment. Dark traits indicate significant differences with Solvent control treatment (ANOVA, P<0.05).

4. Discussion

Over the last decades a number of different ecotoxicity tests have been developed demonstrating the suitability of fish embryo-larval to reflect toxicity of organic pollutants. Zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) have shown reliable results in toxicity assessment using aqueous exposure. In the case of hydrophobic compounds waterborne exposure is not suitable and therefore specific tests had to be developed. This has been done using an exposure of fish embryos to sediment and spiked sediment (Barjhoux et al., 2012; Hollert et al., 2003; Vicquelin et al., 2011). In order to standardize the embryo-larval assay for toxicity measurement of hydrophobic compounds, a screening procedure using artificial sediment with varying peat content was developed on Japanese medaka (Le Bihanic et al. submitted a) and zebrafish in the present study. Responses of zebrafish and Japanese medaka to two PAH models, the 5-ring PAH benzo[a]pyrene (BaP) and the 3-benzenic-ring PAH fluoranthene (Fluo), were assessed to validate the suitability of artificial sediment composition. Using similar PAH-spiked sediment, exposure routs and toxicity endpoints, it was shown that toxicity thresholds and intensity of responses of these two physiologically close species were different.

Our results on zebrafish as well as medaka embryo-larval assays, suggest that the PAH bioavailability is reduced by increasing the content of organic matter in the artificial sediment. This finding is consistent with field studies demonstrating that the bioavailability of PAH is highly dependent on the concentration of organic matter and their interaction (Fanget et al., 2002; Guasch et al., 2012). Furthermore, our results about spiking efficiencies of PAH in the prepared sediments also support this statement. Indeed, a reduction of Fluo-spiking efficiency was observed with increasing peat concentration. The high sorption capacity of compounds to the organic matter is linked to the high hydrophobicity natures of both BaP (Log $K_{ow} = 6.04$) and Fluo (Log $K_{ow} = 5.16$). Humic substances act as a trap for hydrophobic molecules which in turn reduce their dissolved concentrations and their bioaccumulation in living organisms (Akkanen and Kukkonen, 2003; Akkanen et al., 2005; Haitzer et al., 1999; Laor et al., 1998; Mayer et al., 2007). In this study, results about toxicity of both hydrophobic compounds were consistent with their toxic properties. BaP is known to be genotoxic, carcinogenic and immunotoxic (Carlson et al., 2004; Costa et al., 2011; Wessel et al., 2010a) whereas Fluo has rather teratogenic and mutagenic properties (Wessel et al., 2012).

BaP exposure did not induce mortality, hatching failure or delayed hatching in zebrafish embryo-larval assays. Moreover, BaP did not lead to teratogenic effects (Table 16). Somewhat different results have been reported for BaP-exposed medaka embryos (Le Bihanic et al. submitted a). A few teratogenic effects were observed in medaka but contrary to zebrafish, a significant effect on the kinetic of embryonic development was noted. This compound is not known to directly induce developmental effects. However, at high-doses, BaP can lead to important morphological and carcinogenic effects (Hawkins et al., 1988; Incardona et al., 2011). In contrast to BaP-exposed zebrafish larvae, significant developmental defects were observed in Fluo-exposed embryos. These effects are reflected by an increasing mortality, a lack of embryo hatching and alterations of growth and development (Tables 15 and 17). Although morphological abnormalities are currently used as sensitive endpoints in embryo-larval assay (Lammer et al., 2009; Nagel, 2002), neither edemas, axial skeleton, craniofacial, cardiovascular abnormalities were recorded during Fluo exposure. Furthermore, the decrease in larval standard length and the increase of their yolk sac area, caused by Fluo exposure in absence of peat attest for a developmental delay.

Zebrafish larval behavioral assays appeared to be a robust endpoint in toxicity testing (Ali et al., 2012; Bilotta et al., 2002; MacPhail et al., 2009). The assessment of developmental neurotoxic effects of various compounds can be analyzed through their swimming capacity, stress-regulating systems and motor responses (perception and reaction) to stimuli (Champagne et al., 2010; de Esch et al., 2012; Drapeau et al., 2002; Linney et al., 2004). Studies regarding behavioral effects in fish have been extensively reported using psychotropic substances (Ali et al. 2012; Cowden et al. 2012; Kokel et al. 2010; Padilla et al. 2011; Rihel et al. 2010). In the present study, a significant decrease of PMR in zebrafish was observed for the highest concentration of Fluo in absence of peat. Moreover for each peat concentration tested, the zebrafish larvae presented a similar behavioral pattern (Fig. 28). The first light period (5 min in duration, Light On (1)) reflected basal activity which was followed by an excitation phase characterized by an increasing in locomotor activity during the sudden darkness period. Then, a return to basal activity period corresponding to a recovery phase was observed (Light On (2)). This pattern of response is consistent with previous results reported in the literature (Kokel et al., 2010; MacPhail et al., 2009; Padilla et al., 2011). Concerning Japanese medaka, the potential toxicity of PAH on larval behavior assays was recently analyzed (Le Bihanic et al. submitted b). It appeared that the developmental neurotoxic behavior of Japanese medaka larvae is altered by PAH (Fig. 29). BaP led to an increase in PMR in absence of peat which was suppressed in the highest tested peat concentration. In contrast, Fluo induced a decrease in PMR in this later exposure condition. Japanese medaka PMR pattern was similar to zebrafish one. Only few studies dealt with the impact of organic pollutant on the fish PMR. Using a similar approach, Péan et al. (2013) reported a stimulation of this PMR following PCB contamination transferred in offspring zebrafish larvae. Furthermore, changes in zebrafish swimming rates, depending on PBDE congeners, have been shown by Usenko et al. (2011). Additionally, a PAH lethargic effect on hunting behavior and visual acuity was demonstrated by Gonçalves et al. (2008) in juveniles gilthead seabream (*Sparus aurata*). Even still poorly explored, behavioral effects of organic pollutants clearly deserve further research.

Significant induction of enzymatic EROD activity in zebrafish assays appeared only in the absence or at the highest peat concentration during BaP exposure (Fig. 26A). The EROD activity modulation by BaP is in general agreement with AhR agonist properties of this compound. The ability to BaP to induce EROD activity (indicator of phase I biotransformation activities) through AhR2 pathway has been established in marine fish (Au et al. 2004; Barron et al. 2004) and freshwater fish (Bols et al., 1999; Costa et al., 2011; Incardona et al., 2011; Nacci et al., 2002; Noury et al., 2006; Willett et al., 1995, 2001). Regarding results of Fluo exposure, no significant induction of EROD activity was observed compared to the Control treatment. Indeed, Fluo is rather considered as inhibitor of AhR and thus is not able induce cytochrome P450 1A monooxygenase activity (Kopecka-Pilarczyk and Correia, 2009; Van Tiem and Di Giulio, 2011; Willett et al., 2001, 1998). Unfortunately, the EROD enzymatic activity was not measured in Japanese medaka.

Overall, results on zebrafish or medaka embryo-larval assays suggest that the toxicity of PAHs is related to their bioavailability, directly correlated with their absorption ability on particles of peat. The 5-ring BaP appeared less bioavailable than the 3-benzenic rings Fluo for accumulation from sediment in fish. These findings are consistent with studies of Varanasi et al. (1985) and Djomo et al. (1996) which demonstrated that uptake rate of 4,5-ring PAHs are lower than those of 2,3-ring PAHs. Indeed, in the absence of peat, Fluo appeared to be more labile and then more bioavailable for embryos. Fluo tended to pass passively through the chorion, and lead to narcotic effects on embryos. Indeed, lethal effects were reported in zebrafish and a high proportion of abnormalities was observed in medaka. Bioavailability of Fluo appeared near-zero for 2.5 % peat and intermediate for 5 % peat in zebrafish embryo-larval assay. This bioavailability pattern of Fluo for zebrafish and medaka embryos was somewhat different. Particles of blond peat tended to be fixed on the surface of clay particles and to limiting PAHs accessibility to binding sites, decreasing exchanges and PAHs

metabolisation (Fanget et al., 2002). However, following Fluo exposure, important developmental defects and developmental retardation were observed in zebrafish at the highest concentration of peat (5 %) (Table 13). Because of high proportion of peat, PAHs on binding sites could be saturated and would be then slightly more available for embryos. However, while Fluo will be slightly available, exchanges with embryos would be less important than in condition without peat not leading to lethal effects. All these results proved that zebrafish seems to be more sensitive to physical properties of sediment compared to medaka.

Taking into consideration the results of both zebrafish and medaka toxicity testing (Le Bihanic et al. submitted a), an artificial sediment without peat was suitable for zebrafish and with 2.5 % peat for medaka. Synthetic results of lethal and sublethal endpoints assessed further to both assays with different composition of artificial sediment are summarized in Tables 18 and 19 for BaP and for Fluo exposures, respectively. No toxic effects of BaP were reported in zebrafish and medaka exposures at 0 % and 5 % peat except for the photomotor responses. BaP induced a slight decreasing locomotor activity during stress period in zebrafish whereas a high hyperactivity was shown in medaka. Furthermore, neither survival, nor hatching, nor morphology or behavior disruptions were recorded in zebrafish at intermediate peat concentration. In contrast, BaP appeared more available in medaka at 2.5 % peat leading to hatching kinetic and morphometric alterations. Regarding Fluo exposure, completely opposite toxicity responses were reported in both species for each artificial sediment tested. Acute toxicity effects of Fluo were recorded in zebrafish at 0 % and 5 % peat content compared to Japanese medaka. These effects expressed by embryo-larval mortality, hatching, morphometric alterations and a significant hypoactivity of fish. Effects intensity was more representative of Fluo intrinsic toxicity at 0 % than 5 % peat due to higher bioavailability. In Japanese medaka, Fluo toxicity showed significant abnormalities for both concentrations. In addition, a significant hypoactivity of fish at 5 % peat was observed revealing potential neurological alterations.

The first aim of this work was to develop an artificial sediment drawing close to a composition of natural sediment in order to standardize sediment exposure methods. Regarding all results for both species with respect to ethical requirements (3R principles and ELS guidelines), MELA sediment contact assay appears to be more robust than zebrafish embryo-larval assay to reveal BaP and Fluo toxic effects and more resilient to physico-chemical properties of sediment. This higher degree of sensitivity of zebrafish would be due to a highest porosity of chorion therefore highest diffusion of compounds (see the section on

acute effects). Using a concentration set to 2.5 % peat, the degree of sensitivity of the Japanese medaka would be mainly due to its sensitivity to PAHs and to longer exposure duration during the critical embryonic developmental period, as well as by the metabolic activity. Indeed, the embryonic phase in Japanese medaka at 26 °C ranges from 8 to 11 days compared to 2 days in zebrafish (Kimmel et al., 1995; Padilla et al., 2009). In this context, our results support that Japanese medaka could constitute a better model for hydrophobic chemicals (such as PAHs) testing than zebrafish although zebrafish assay has been proved as valuable alternative when short-time exposures are targeted. The use of finer markers representative of early toxic actions of compounds, in addition to conventional phenotypic endpoints should be essential in predicting toxicity of hydrophobic pollutants (Voelker et al., 2007). It will increase sensitivity and relevance of biological responses. Omitting these information, molecule or treatment safety could be overestimated or underestimated.

Table 18	. Comparison of Bal	P toxicity to zeb	orafish and Japa	nese medaka (I	Le Bihanic et	al. Submitted) early l	ife stages fo	or different	peat conce	entrations in
artificial s	sediment										

		zebrafish			Japanese medaka		
	Exposure time	96 hpf			12 dpf		
	Peat concentration	0%	2.5 %	5%	0%	2.5 %	5%
	Embryo-larval mortality	No	No	No	No	No	No
Survival/Hatching Hatching success		No	No	No	No	No	No
	Hatching Time	No	No	No	No	Yes (+)	No
	Larval body length	No	No	No	No	No	No
Morphology	Yolk sac area	No	No	No	No	Yes (-)	No
	Abnormal individuals	No	No	No	No	No	No
Behavior	Photomotor response	Yes (-)	No	No	Yes (+)	No	No

Signs in brackets indicate significant inductor/increase (+) or inhibitor/decrease (-) effect

Table 19. Comparison of Fluo toxicity to zebrafish and Japanese medaka (Le Bihanic et al. Submitted) early life stages for different peat concentrations in artificial sediment

			zebrafish		Japanese medaka		
	Exposure time		96 hpf		12 dpf		
	Peat concentration	0%	2.5 %	5%	0%	2.5 %	5%
	Embryo-larval mortality	Yes (+)	No	Yes (+)	No	No	No
Survival/Hatching	Hatching success	Yes (-)	No	Yes (-)	No	No	No
	Hatching Time	No	No	No	No	Yes (+)	No
	Larval body length	Yes (-)	No	Yes (-)	No	No	No
Morphology	Yolk sac area	Yes (+)	No	No	No	Yes (-)	No
	Abnormal individuals	No	No	No	Yes (+)	Yes (+)	Yes (+)
Behavior	Photomotor response	Yes (-)	No	No	No	No	Yes (-)

Signs in brackets indicate significant inductor/increase (+) or inhibitor/decrease (-) effect

5. Conclusion

As a complement of the previous work performed on the Japanese medaka by Le Bihanic et al. (Submitted a), our study validated the use of artificial sediment for developmental toxicity testing using fish embryo-larval assay for Japanese medaka. Suitable artificial sediment comprises 92.5 % dw of 0.2-0.5 mm silica, 5 % dw kaolin clay and 2.5 % dw *Sphagnum* blond peat. This composition was not suitable for zebrafish of which responses were more sensitive in sediment without organic matter. Furthermore, this study demonstrated that two physiologically-close fish species exhibited differences in their ability to reflect the relative developmental toxicities of hydrophobic organic pollutants. These differences might be explained by differences in their developmental kinetic (leading to a longer exposure duration), and adsorption/metabolisation and cell damage repair ability. Japanese medaka appears more adapted for toxicity assessment of hydrophobic compounds such as PAHs. Finally, to avoid any misinterpretation regarding the risk assessment to human or environment health, several OECD fish species should be systematically considered.

Acknowledgments

Financial support for PhD grants was received by FLB from the Ministère de l'Enseignement de Supérieur et de la Recherche and by PP from both the Conseil Général de Charente Maritime and the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer). This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche, program "Contaminant, Ecosystème et Santé", in the frame of the ConPhyPoP (2009-002) research project and CPER A2E. This project is co-financed by the European Union with the European fund of regional development. S. Keiter and H. Zielke are acknowledged for their recommendation on sediment preparation and the Sibelco Company for generously providing sand. D. Leguay is acknowledged for technical support of zebrafish behavioral assays and L. Lyphout for help in the zebrafish breeding maintenance. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence continental to coastal ecosystems.



CHAPITRE III

ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DE COMPOSÉS PÉTROLIERS PAR L'UTILISATION DE TESTS EMBRYO-LARVAIRES COUPLÉS A UNE APPROCHE MULTIMARQUEURS

RÉSUMÉ DU CHAPITRE III

L'objectif de ce troisième chapitre était de développer un test embryo-larvaire sur poisson pour évaluer la toxicité de produits pétroliers. L'utilisation d'une méthode standardisée de type WAF « Water-Accommodated Fraction » a été utilisée afin de simuler la toxicité d'une nappe de pétrole non dispersée (Singer et al., 2000). Cette méthode expérimentale réalisée en milieu fermé, permet de récupérer la fraction hydrosoluble du produit pétrolier (équilibre entre la phase aqueuse et la phase gazeuse, cf. Chapitre I). Dans cette étude, la toxicité desWAF d'un pétrole brut de type Arabian Light et d'un fuel lourd de type Erika a été évaluée sur les stades précoces de poisson zèbre. Pour cela une approche multimarqueurs a été entreprise afin d'évaluer le degré d'exposition des individus (l'activité EROD, les niveaux de métabolites de HAP) mais également d'établir les dommages potentiels de ces composés pétroliers à différents niveaux d'intégration biologique (i.e. de la cellule à la population). L'utilisation de ce mode d'exposition procure une méthode expérimentale sensible et reproductible d'évaluation de la toxicité des composés dissous. Le point fort de cette étude est l'utilisation conjointe d'un test embryo-larvaire et d'une approche multiéchelle avec des critères conventionnels de biotests (critères morphologiques macroscopiques) complétés par des marqueurs classiques utilisés en biosurveillance environnementale (l'activité EROD, les dommages à l'ADN, les niveaux de métabolites de HAP). Cette étude est présentée sous forme d'un article scientifique préparé pour la revue Aquatic Toxicology.

<u>Toxicity assessment of spilled-petroleum related</u> <u>compounds using zebrafish (*Danio rerio*) embryo</u> <u>larval assay and multiscale approach</u>

Article préparé pour la revue *Aquatic Toxicology*

Prescilla Perrichon^{a,b,*}, Karyn Le Menach^c, Farida Akcha^a, Jérome Cachot^c, Hélène Budzinski^c, Paco Bustamante^b

^a Ifremer, Laboratoire Biogéochimie et Écotoxicologie, L'Houmeau/Nantes, France

^b Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), CNRS-Université de La Rochelle, UMRi 7266,

2 rue Olympe de Gouges, F17042 La Rochelle Cedex 01, France

^c Université de Bordeaux, UMR EPOC CNRS 5805, avenue des Facultés, F33405 Talence Cedex, France

*Corresponding author. Tel.: +33 5 46 50 76 32; fax: +33 5 46 50 76 63

E-mail addresses: prescilla.perrichon@hotmail.fr (P. Perrichon), k.lemenach@epoc.ubordeaux1.fr (K. Le Menach), Farida.Akcha@ifremer.fr (F. Akcha), j.cachot@u-bordeaux1.fr (J. Cachot), h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr (H. Budzinski), paco.bustamante@univ-lr.fr (P. Bustamante)

Abstract

In the present study, zebrafish, Danio rerio were exposed 96 hours to two wateraccommodated fractions (WAF) prepared from Brut Arabian Light (BAL) and Erika fuel (HFO) oils in order to assess their impact on embryo-larval developmental processes. Three WAF concentrations per oil (BAL1, 10 and 100 %; HFO10, 50 and 100 %) were exposed in order to cover a wide range of polycyclic aromatic hydrocarbons concentrations found after oil spills in the environment. The levels of EROD activity, cyp1a and ahr2 gene expression and PAH-metabolites were determined in order to assess exposure and toxicity of WAF. A multimarkers approach was undertaken to assess the extent of embryos and larvae responses at different biological scale: oxidative stress and apoptosis processes, DNA damages, cardiac activity, PhotoMotor behavioral responses, morphological assessing (edemas, craniofacial and axial skeleton abnormalities, cardiovascular defects), hatching success and survival monitoring. For similar PAH concentrations, the HFO appeared to be the most toxic than BAL. A strong damage level was observed at the highest concentration of WAF HFO (100 %, Σ TPAHs=12047 ± 1989 ng.L⁻¹) with lethal effect, hatching delay, 91.1 % of abnormalities (mainly edemas), defects in size, decrease of swimming activity and bradycardia. An amount of 22.0 % of abnormal larvae were also recorded in WAF HFO 50 % (Σ TPAH=5371 ± 976 ng.L⁻¹). No morphological, physiological and behavioral alterations were observed in WAF HFO10 and WAF BAL-treated larvae. Furthermore, no genotoxic effects were recorded in embryos whatever the WAF treatment. The activation of genes involved in antioxidant defenses (sod, cat, gpx) suggests an induction of oxidative stress following the exposure to BAL and HFO. The induction of EROD activity coupled to an increase of expression level for cypla showed the exposure of larvae whatever the WAF treatment, while no significant difference in PAH-metabolite levels was recorded in WAF BAL compared to Control. The use of zebrafish embryo-larval assay with multimarkers approach provides to be suitable in toxicological risk assessment of spilled-petroleum related compounds. Furthermore, the increase of effects analysis period over the ethical period appeared necessary in order to not underestimated acute effects of exposed compounds.

Keywords: WAF, fish early life stages, teratogenicity, swimming activity, bradycardia, EROD, PAH-metabolites, DNA integrity

1. Introduction

Oil pollution by liquid petroleum (crude oil and refined-products) represents an important source of contamination in marine ecosystems. Petroleum compounds coming from catastrophic spills and chronic discharges from maritime transport (oiled-ballast water, cargo washing, wreckage), offshore exploitation (drilling operations) and natural seepage may lead to disastrous ecological consequences when released into the environment (GESAMP, 2007, 1993). Impact assessment of these petroleum compounds appeared complicated due to their complex mixtures of organic compounds. Among these tens of thousands of compounds, 75 % are hydrocarbons including Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) (OSPAR, 2004). These semi-persistent pollutants exhibit different levels of toxicity towards aquatic organisms (Incardona et al., 2004; Lee and Anderson, 2005). Furthermore, their physico-chemical properties modulate petroleum oil toxicity (Heintz et al., 1999). The Low-Molecular-Weight (LMW) PAHs or 2,3-rings PAHs are rapidly disperse in the water column (Log $K_{ow} < 4$) after oil spills but they are less persistent in the environment, because of their high volatility. In contrast, High-Molecular-Weight (HMW) PAHs or \geq 3-rings PAHs are more hydrophobic (Log $K_{ow} > 4$), therefore less water soluble, more persistent and 10 to 1,000-fold more toxic than LMW PAHs (Black et al., 1983; Rice et al., 2001). Oil toxicity is related to aromatic fraction (LMW + HMW PAHs), however their association with others petroleum compounds have to be considered to fully qualify toxicity of crude/fuel oils (Martinez-Gomez et al., 2010).

During recent decades, biomonitoring tools have received considerable attention because of obvious environmental damage after oil contamination. Acute and chronic releases petroleum hydrocarbons may have long-term physiological effects on organisms (NRC, 2003). Dissolved fraction of petroleum appeared to be more available to aquatic organisms. Once accumulated, PAHs are metabolized in more toxic metabolites through phase I biotransformation activity, which is predominantly catalyzed by cytochrome P450 1A (CYP1A) (Meador et al., 1995; Varanasi et al., 1985). Activation of these mechanisms via aryl hydrocarbon receptor (AhR) activation modulate expression of a battery of genes involved in metabolism and impacting negatively exposed organisms at different biological organization levels (Incardona et al., 2011, 2005; Nebert et al., 2004). Fish early-life stages (ELS) are particularly sensitive to the adverse effects of PAHs (Lammer et al., 2009) which can dramatically decrease the condition of ELS and consequently impacts the survival and

147

population recruitment (Heintz et al., 2000; McGurk and Brown, 1996; Muhling et al., 2012). Crude oil and refined-products may alter growth, development, morphology including induction of edemas, craniofacial and spinal abnormalities (Carls and Thedinga, 2010; González-Doncel et al., 2008; Hose et al., 1996; Kerambrun et al., 2012d; Marty et al., 1997; Norcross et al., 1996; Pollino and Holdway, 2002). In addition, a heartbeat decreasing was found in embryonic stages of Inland silversides fish (*Menidia beryllina*) exposed to water soluble fraction of Alaska North Slope crude oil (Middaugh et al., 1996). Recently, Incardona et al. (2004) demonstrated cardiac defects (anemia) that may occurs with exposure to PAH mixtures from crude oil. Alterations of swimming and feeding behavior were reported too, reducing fish ability to capture prey (Tilseth et al., 1984). Regarding genotoxic responses, several studies have demonstrated an increasing of DNA damages (strand breakage and adduct formation) after exposure to PAH-contaminated sediment or dissolved-fraction of oils (Le Dû-Lacoste et al., 2013; Wessel et al., 2012). Finally, several studies reported detrimental effects on mechanisms of oxidative stress (Couillard et al., 2005).

The multibiomarker approach is considered as a key for understanding the potential effects of pollutants mixture in aquatic environment. Use in parallel of biological and biochemical indicators involved in biotransformation's petroleum products appeared essential to assess the bioavailability and toxicity of crude oil or refined-products (Eason and O'Halloran, 2002; Hagger et al., 2006; van der Oost et al., 2003). Furthermore, coupled-measurements of short and long-term effect markers at low biological organization level may improve ecological pertinence (Adams et al., 1989; Martinez-Gomez et al., 2010). The use of fish ELS bioassays coupled to predictive markers of toxic effects was recently proved to be a valid early warning risk assessment tool (Adams et al., 1989; Bartzke et al., 2010; Embry et al., 2010; Halder et al., 2010).

In the context of reduction, refinement and replacement of animal experimentation (3R principle), established by Russell and Burch (1959) and in agreement with the REACh regulation (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals) (Hengstler et al., 2006; Van der Jagt et al., 2004), the present study aimed to compare the toxicity of two kinds of Water-Accommodated Fractions (Singer et al., 2000) from a light crude oil, Brut Arabian Light (BAL) and a Heavy Fuel Oil, Erika (HFO) using zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval assay. Toxicity assessment of spilled-petroleum-related compounds intended to explore a wide range of fish responses through a multiscale approach, mixing exposure markers (i.e. PAH-metabolites, *Cyp1A* and EROD activity) and damages markers (i.e. DNA damages, oxidative stress, heartbeat, PhotoMotor behavioral Responses). These markers were

supplemented with conventional endpoints used in fish bioassay (i.e. abnormalities, hatching success, survival) in order to predict at higher biological level, the toxic effect on individuals and population.

2. Materials and Methods

2.1. Maintenance and egg production of zebrafish

Zebrafish (TU strain) was maintained in communities in 10 L tanks under standard conditions reported in Perrichon et al. (submitted) for egg production. Eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish. One adult male and one female were placed together the evening before eggs were required in spawning boxes (AquaSchwarz, Germany). Spawning and fertilization took place within 30 min after the onset of light in the morning. Zebrafish were fed twice daily *ad libitum* with commercial granulates (INICIO Plus, BioMar, France) and live nauplius larvae of *Artemias* sp. (Ocean Nutrition, Belgium) once a day, occasionally supplemented with red sludge worms (Boschetto-Frozen fish food).

2.2. Experimental procedure

2.2.1. WAF preparation

The Water-Accommodated Fraction of oil was prepared according to guidelines established by the Chemical Response to Oil Spills – Ecological effects Research Forum (CROSSERF) (Singer et al., 2000). Briefly, the WAF is a laboratory-prepared medium derived from low energy (no vortex) mixing of a poorly soluble test petroleum product which is essentially free of particles of bulk material (Aurand and Coelho, 1996; Coelho and Aurand, 1997). Two kinds of oils were used: an *Arabian Light* crude oil (BAL 110) and an *Erika* Heavy Fuel Oil (HFO, no 2). The WAF was prepared with 1.7 L of artificial water in 2 L glass aspirator bottle closed by a lid to avoid the evaporation of light compounds. Oil concentrations introduced gently at the water surface were 103 mg oil/L water and 55 mg

oil/L water for BAL and HFO oils respectively. These concentrations proved to be a more realistic approach in an oil spill release in static condition (Bado-Nilles et al., 2009; Tronczynski et al., 2004). A low mixing energy method (no vortexing) using magnetic stirrer was carried out for 24 hours in order to prevent solubilization of molecules from the oil to the water column. Following 24 hours mixing period, WAF was settled 30 minutes before embryos exposure. To maintain WAF equilibrium, procedure was set in an air-conditioned room (21 °C) and bottles were covered with an aluminum foil. WAF sample was collected from a tap located at the bottom of the bottle. During exposure duration (96 h), WAF stock was stored at 4 °C in the dark.

2.2.2. Zebrafish exposure

WAF solutions were diluted daily in three different concentrations with artificial water (ISO 7346/3, 1996). The WAF preparations used were 1 %, 10 % and 100 % from WAF BAL stock solution and 10 %, 50 % and 100 % from WAF HFO stock solution. A Control with only artificial water was used (0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 5 mM NaCl and 0.17 mM KCl). Exposure tests were carried out in 20 mL glass dishes in five replicates at static condition. 30 embryos (8-cell stage, 1h15 post-fertilization) were used per concentrations and Control. Glass dishes were covered with parafilm in order to prevent evaporation and incubated at 28 \pm 0.5 °C for an exposure period of 96 hours. During exposure, WAF solutions and artificial water were renewed daily. After exposure, larvae were transferred to clean water until 15 dpf. Each WAF exposure was replicated three times in order to test experiment reproducibility.

2.3. WAF compounds analysis

WAF samples were stored at -20 °C before chemical analysis. The replicates for each condition were pooled and analyses were performed on two experiment replicates for both oils. Dissolved concentrations of the tested WAF were measured by SPME (Solid-Phase MicroExtraction) procedure combined with GC/MS (Gas Chromatography coupled Mass Spectrometer) analysis. During all the exposure procedure, water (old and added new) was sampled every day in 10 mL SPME vials. Internal deuterated standards solution in ethanol

was added to 8 mL of water sample prior to extraction. Extractions were entirely automated with a Multipurpose Sampler (Gerstel® MPS2XL, Switzerland) using a PDMS (PolyDiMethylSiloxan) fiber (Supelco, Sigma-Aldrich, South Africa) following the procedure described by Kanan (2012). Briefly, the fiber (100 μ m) was immersed into the vial with 1 h stirring period at 250 rpm. After extraction, the fiber was thermally desorbed into the GC/MS system (Agilent GC 7890A/Agilent MSD 5975C, Agilent Technology, California) for 10 min at 270 °C. A blank analysis was carried out to ensure the absence of contamination prior and during analysis.

The 40 detected compounds are listed in Table 20. Among these target compounds, 16 priority PAHs selected by the US EPA (Environmental Protection Agency), 2 additional parent PAHs (benzo[e]pyrene and perylene), 2 sulfuretted aromatics (dibenzo[b,d]thiophene and 2,1-dibenzonaphthothiophene) and 20 methylated-PAHs associated were identified.

		C	oncentration (ng.L-1) in	WAF Brut Arabian Lig	ght oil	Concentration (ng.L-1) in WAF Heavy Erika Fuel oil				
Compounds	Molecular Weight (g.mol ⁻¹)	Control	1 %	10 %	100 %	Control	10 %	50 %	100 %	
Naphthalene*	128	2.21	159.82 ± 66.22	683.43 ± 28.46	5187.16 ± 173.32	1.39	561.40 ± 29.38	2916.19 ± 488.72	5394.09 ± 146.36	
1-Methylnaphthalene	142	1.77	803.37 ± 357.66	3471.99 ± 12.91	25624.57 ± 1241.59	1.03	2278.65 ± 172.13	10583.31 ± 2587.35	45176.86 ± 18810.74	
2-Methylnaphthalene	142	1.80	636.09 ± 296.53	2898.01 ± 55.92	22302.23 ± 1049.13	0.72	3753.02 ± 265.34	17989.01 ± 4373.23	34014.18 ± 791.28	
\sum Dimethylnapththalene	156	29.47	2400.26 ± 1022.99	12074.82 ± 110.75	62915.45 ± 4526.23	n.d.	9924.91 ± 436.01	48633.33 ± 11918.78	88902.76 ± 3404.16	
Σ Trimethylnapththalene Σ Tetramethylnaphthalene Acenaphtylene*	170 184 152	51.09 n.d. n.d.	$\begin{array}{l} 1546.12\pm 638.68\\ 317.94\pm 124.58\\ n.d. \end{array}$	$\begin{array}{l} 7201.50 \pm 6.96 \\ 1851.28 \pm 20.91 \\ n.d. \end{array}$	39626.68 ± 3530.44 8971.73 ± 1195.31 n.d.	n.d. n.d. n.d.	$5211.60 \pm 253.30 \\ 1388.54 \pm 128.18 \\ 8.40 \pm 0.62$	$\begin{array}{c} 26214.96 \pm 5908.86 \\ 6540.50 \pm 1437.54 \\ 22.20 \pm 1.84 \end{array}$	$\begin{array}{l} 49234.75 \pm 2468.37 \\ 12949.03 \pm 572.86 \\ 86.05 \pm 31.32 \end{array}$	
Acenaphtene*	154	0.83	n.d.	11.76 ± 1.46	64.32 ± 6.07	n.d.	90.24 ± 8.95	437.90 ± 102.97	1302.39 ± 449.62	
Fluorene* Phenanthrene*	166 178	0.55 2.56	14.72 ± 5.74 22.81 ± 8.12	64.68 ± 1.14 67.44 ± 0.15	$\begin{array}{c} 398.48 \pm 32.53 \\ 383.40 \pm 36.61 \end{array}$	0.57 1.74	76.95 ± 7.07 566.64 ± 276.99	375.70 ± 79.59 941.87 ± 168.27	$\begin{array}{c} 634.44 \pm 59.10 \\ 3531.02 \pm 1504.80 \end{array}$	
1-Methylphenanthrene 2-Methylphenanthrene	192 192	2.34 0.41	30.64 ± 12.41 8.21 ± 3.51	$\begin{array}{c} 34.64 \pm 1.62 \\ 22.66 \pm 1.78 \end{array}$	$\begin{array}{c} 183.63 \pm 15.07 \\ 156.26 \pm 14.93 \end{array}$	0.88 0.70	$\begin{array}{c} 307.21 \pm 157.86 \\ 118.27 \pm 28.08 \end{array}$	$\begin{array}{c} 326.18 \pm 50.79 \\ 570.41 \pm 83.78 \end{array}$	$\begin{array}{c} 1401.95 \pm 570.85 \\ 2454.66 \pm 989.21 \end{array}$	
3-Methylphenanthrene	192	0.30	7.01 ± 3.12	20.65 ± 0.32	116.26 ± 1.61	0.33	292.08 ± 142.37	484.91 ± 70.17	2078.09 ± 835.64	
∑Dimethylphenanthrene	206	5.47	68.34 ± 26.68	79.52 ± 1.32	419.68 ± 28.73	n.d.	382.20 ± 104.48	869.48 ± 219.24	4062.61 ± 1593.77	
∑Trimethylphenanthrene	220	3.79	n.d.	23.46 ± 1.89	128.45 ± 15.67	n.d.	473.26 ± 278.18	384.21 ± 115.59	1266.07 ± 504.74	
Anthracene*	178	n.d.	n.d.	17.20 ± 10.06	7.23 ± 0.82	n.d.	26.49 ± 3.03	118.87 ± 18.53	169.94 ± 2.30	
2-Methylanthracene	192	0.32	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	77.45 ± 39.48	99.90 ± 12.31	430.29 ± 165.25	
[9+4]-Methylphenanthrene + 1- MethylAnthracene + 4,5-Mphenanthrene	192	0.72	5.56 ± 0.17	48.20 ± 0.85	318.18 ± 25.50	0.30	233.26 ± 114.71	366.79 ± 49.77	1604.12 ± 651.63	
Dibenzo[b,d]thiophene	184	0.32	51.47 ± 19.93	240.03 ± 0.19	1503.71 ± 133.47	0.09	78.76 ± 7.50	368.71 ± 73.60	627.48 ± 61.53	
1-Methyldibenzothiophene	198	n.d.	29.75 ± 11.63	150.31 ± 2.04	952.34 ± 77.30	n.d.	53.37 ± 4.61	246.32 ± 36.98	471.97 ± 2.94	
3,2-Methyldibenzothiophene	198	n.d.	30.32 ± 12.16	137.51 ± 1.65	885.37 ± 67.49	n.d.	69.05 ± 6.00	305.35 ± 41.95	574.87 ± 6.82	
1-Methyldibenzothiophene	198	n.d.	21.85 ± 8.68	98.42 ± 2.63	642.02 ± 48.47	n.d.	30.10 ± 2.72	129.45 ± 20.41	241.37 ± 3.66	
2,1-Dibenzonaphthothiophene	234	n.d.	n.d.	1.06 ± 0.21	3.98 ± 1.00	n.d.	8.94 ± 3.92	19.69 ± 6.84	24.71 ± 5.76	
Fluoranthene*	202	0.46	1.66 ± 0.24	2.06 ± 0.62	7.82 ± 2.51	0.53	5.86 ± 0.52	21.91 ± 2.01	40.34 ± 2.19	
Pyrene*	202	0.26	1.28 ± 0.17	1.85 ± 0.51	5.18 ± 0.68	0.14	23.30 ± 3.30	93.23 ± 12.59	164.32 ± 6.24	
Benzo[a]anthracene*	228	n.d.	n.d.	n.d.	2.19 ± 0.58	n.d.	13.68 ± 7.97	11.61 ± 3.53	14.88 ± 1.31	
Chrysene + Triphenylene*	228	0.20	1.27 ± 0.29	0.55 ± 0.01	2.57 ± 0.21	n.d.	10.91 ± 3.14	31.65 ± 10.06	45.29 ± 4.99	
∑Methylchrysene	242	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	34.30 ± 7.43	89.35 ± 43.60	114.94 ± 36.36	
Benzo[b+j+k]fluoranthene*	252	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.49 ± 0.34	2.33 ± 1.19	2.45 ± 0.87	
Benzo[e]pyrene	252	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.52 ± 0.68	3.87 ± 2.42	3.46 ± 1.55	
Benzo[a]pyrene*	252	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.91 ± 0.40	2.31 ± 1.50	1.59 ± 0.84	
Perylene	252	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.68 ± 0.00	1.88 ± 0.00	1.03 ± 0.51	
Indeno[1,2,3-cd]pyrene*	276	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Benzo[g,h,i]perylene*	276	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	2.00 ± 0.00	3.82 ± 0.00	5.26 ± 0.00	
Dibenzo[a,h]+[a,c]anthracene*	278	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1.21 ± 0.00	

Table 20. Target compounds $(ng.L^{-1})$ measured in Water Accommodated-Fraction of Brut Arabian Light oil (WAF BAL) and Heavy Erika Fuel oil (WAF HFO) during zebrafish exposures. Values are means \pm SEM of both chemical replicates.

* Priority contaminants selected by the US Environmental Protection Agency (EPA)

n.d. < detection limit.

2.4. Biological analysis

2.4.1. Teratogenic analysis

Lethal and sublethal endpoints were recorded as described in Lammer et al. (2009) and Perrichon et al. (submitted). Briefly, mortality and hatching success were daily monitored during exposure. Survival monitoring was prolonged until 15 dpf. After an exposure of 96 hours, biometric analysis (standard and head lengths, head length, whole body and yolk sac surface) and abnormalities were recorded. Five categories of abnormalities were scored: 1-Edemas formation (brain, pericardia, yolk sac); 2- Skeletal deformities (scoliosis, lordosis, tail bud deformities); 3- Craniofacial deformities (jaw, development of eyes, head deformities); 4-Cardiac deformities (anemia, hemorrhage, atrium/ventricle size, blood circulation heart position); 5- Yolk sac malabsorption. Moreover, a scoring matrix (score of 0-3) was applied following occurrence and severity of these abnormalities: (0) healthy larvae, (1) one abnormality or mild-affected larvae, (2) two abnormalities or moderately affected larvae, (3) three abnormalities or more or severely affected larvae. Results were expressed as percentages.

2.4.2. Behavioral and physiological analyses

PhotoMotor Response on 120 hpf larvae were monitored, following the procedure described by Péan et al. (2013) with modifications by Perrichon et al. (submitted). Briefly, locomotor activity of larvae was recorded during a light/dark change challenge in a temperature-controlled box (28 ± 0.5 °C). Recording includes three periods of 5 min: 5 min Light On (1), 5 min Dark (D) and 5 min Light On (2). Video analyses were performed with Ethovision XT 8.5 software (Noldus, The Netherlands). The behavioral activity was assessed by measuring the swimming distance (cm) during these three periods. This distance is calculated considering the center point of the larvae between two consecutive X-Y coordinates summed over a 5-min periods.

Cardiac activity was recorded at 28 ± 0.5 °C on 120 hpf larvae. Larvae were introduced in 1 mm wide lines molded in agarose (2 %), immobilized with 3 % methylcellulose and positioned in lateral view. An acclimation of 2 hours was performed before analysis in order to stabilize heartbeat. Heart area are recorded under dissecting microscope (Olympus SZX9, 40x) coupled to a camera (DMK 31AU03, The Imaging Sources, Germany) at 15 frames per seconds and IC Capture 2.2 software (The Imaging Sources, Germany). Larvae were placed under dissecting microscope two minutes before recording their heartbeat in order to acclimatize them to the light microscope. For each larva, three successive movies of 30 s were acquired. Video analysis was performed with Heartbeat detector of Ethovision XT 9.0 software (Noldus, The Netherlands) which analyzes frequencies of atrium and ventricle contractions. Heart activity was expressed in beat per minutes.

2.4.3. Molecular analysis

DNA strand break measurements by the alkaline comet assay were performed on 24 hpf embryos. Pools of five dechorionated embryos for three replicates were digested with 1 mg.mL⁻¹ of phosphate-buffered saline 1X/collagenase IV from *Clostridium histolyticum* (PBS 1 X, 137 mM NaCl · KCl 2.7 mM · Na₂HPO₄ 10 mM · KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4, Sigma-Aldrich, Germany) solution during 45 minutes at room temperature. Cells suspension was filtered through 48 µm gauze into a 1.5 mL reaction tube in order to separate individual cells from tissue debris. Following a centrifugation for 10 minutes at 2300 rpm at room temperature, cells pellet was resuspended with 30 µl of PBS. Then, the comet assay was performed as described by Akcha et al. (2003). For each samples, two slides were prepared. DNA was stained with 70 µL of GelRedTM solution (1/10000) for one hour at 4 °C in the dark. Slides were analyzed using a fluorescence microscope (Olympus BX60, 400x) coupled to a Luca-S EMCCD camera (AndorTM technology, Northern Ireland) and imaging analysis software (Komet 6.0, AndorTM Technology, Northern Ireland). Genotoxical assessment was assessed by measuring the DNA percentage in the comet tail (50 cells per slides).

EROD activity as indicator of phase I biotransformation activity was determined following procedure described by Perrichon et al. (submitted). To summarize, these activity measurements were performed on five larvae (96 hpf) per condition replicates which were incubate in 7-ethoxyresorufin for 5 hours. Levels of formed resorufin into gastrointestinal cavity were observed by fluorescence microscopy (excitation/emission, 560 nm/580 nm) and quantified from image analysis software ImageJ (Schneider et al., 2012) coupled with HeatMap Histogram *plugin* (Péan S., http://www.samuelpean.com/heatmap-histogram/). Fluorescence results were expressed in integrated density of pixels (arbitrary unit).

2.4.4. Gene expressions

Larvae were sampled at the exposure end (96 hpf) and stored in RNA later (Sigma-Aldrich) at -20 °C until used. Total RNA were extracted on 20 pooled larvae using Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions with chloroform/ethanol purifications. Total RNA concentration extracted was quantified by spectrophotometry at 260 nm. Furthermore, purity of RNAs was verified by measuring the A260/A230 nm and A260/A280 nm ratios and by electrophoresis on a 1.8 % agarose gel with ethidium bromide staining. To remove the possibility of genomic DNA contamination, RNA sample was digested by RNase-free DNase I (Promega Madison, USA) and then purified.

Then, a reverse transcription of RNA was performed. First-strand cDNA was synthetized from total 1 µg RNA using reaction mix including 500 ng of oligo $(d_T)_{15}$, 250 ng of random hexamer primers (Promega, Madison, USA), which was added 10 mM of deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) solutions to a final volume of 10 µl. The reaction was initiated using M-MLV Reverse Transcriptase 5X (Promega, Madison, USA) following manufacturer's instructions. Reaction was incubated for 1 h at 42 °C in an Eppendorf Mastercycler and inactivated by heating for 15 min at 70°C. The cDNA mixture was stored at – 20°C until a real-time PCR analysis.

PCR primers were designed with Primer3 software (Rozen and Skaletsky, http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). The accession numbers of the 11 genes used in our study and the corresponding primers are reported in Table 21. Real-time PCR reactions were performed in sterile 96-wells PCR plates with StepOnePlusTM instrument (Applied Biosystems[®], Life Technologies USA) following the manufacturer's instructions. Quantification procedure was based on fluorescence of reaction mixture which related to double-stranded DNA. This reaction mixture included Fast SYBR[®] Green Master Mix 5X (Applied Biosystems[®], USA), 2.4 µL of primers at 600 nM (Eurofins MWG Operon, Germany), 5.6 µL of Milli-Q water and 2 µL of cDNA. Thermal cycling conditions were: enzymatic activation during 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles including a denaturation (95 °C, 15 s), a hybridization (60 °C, 40 s) and an annealing (72 °C, 30 s). Gene's expression levels were quantified from the threshold cycle (CT) number and normalized to four housekeeping genes (*eef1*, *βactin*, *g6pd* and *gapdh*).

Target gene	Accession Number	Primer $(5' \rightarrow 3')$
gapdh	BC083506	GTGGAGTCTACTGGTGTCTTC ^a
		GTGCAGGAGGCATTGCTTACA ^b
eefl	NM_131263.1	CAGCTGATCGTTGGAGTCAA ^a
		TGTATGCGCTGACTTCCTTG ^b
g6pd	BM_182602	GTCCCGAAAGGCTCCACTC ^a
		CCTCCGCTTTCCTCTC ^b
b2m	BC062841	GGAAAGTCTCCACTCCGAAAG
		GTGAAGGCAACGCTCTTTGT ^b
βactin	NM_131031	CCCAGACATCAGGGAGTGAT ^a
		CACAATACCGTGCTCAATGG ^b
cypla	BC094977	GACAGGCGCTCCTAAAACAG ^a
		CTGAACGCCAGACTCTTTCC ^b
ahr2	NM_131264	GCCTGGGATAAAGGAGGAAG
		CAGCTCCACCTGTCCAAAT ^b
cat	NM_130912	CGCTTCTGTTTCCGTCTTTC ^a
		CCCTGAGCATTGACCAGTTT ^b
sod(Cu/Zn)	BC055516	GTTTCCACGTCCATGCTTTT ^a
		CGGTCACATTACCCAGGTCT ^b
sod(Mn)	CB923500	GGCCAAGGGTGATGTGAC
		ACGCTTTATGGCCTCCAAC ^b
gpx4	NM_001007282.1	AGGATCCAAGTGTGGTGGAG
		GGGGTTTCCAAACAAACCTT [♭]
p53	NM_131327.1	GCTTGTCACAGGGGTCATTT ^a
		ACAAAGGTCCCAGTGGAGTG
bax	AF231015	GGAGATGAGCTGGATGGAAA
		GAAAAGCGCCACAACTCTTC ^b
^a Forward primer		

Table 21. Specific primer sequences for the 13 target genes measured by real-time PCR.

^b Reverse primer

2.4.5. PAH-metabolites analysis in larvae

Larvae were sampled at the end of the exposure period (96 hpf) and stored -80 °C until used. Metabolites were extracted on 50 pooled larvae and three replicates per WAF concentrations. Larvae were manually homogenized in 3-4 mL of sodium acetate buffer (pH 5.0). An enzymatic deconjugation was performed during 16 h at 37 °C after addition to betaglucuronidase enzyme from Helix pomatia-2 (\geq 100 000 units.mL⁻¹, Sigma-Aldrich, Germany) using methods adapted to Mazéas and Budzinski (2005). Prior to PAH-metabolites extraction, internal standards solution was added to samples. Metabolites were extracted by Solid-Phase Extraction (SPE) procedure using octadecyl cartridge (500 mg, 3 cc, Bakerbond C₁₈-SPE) and eluted in 100 % methanol solvent. After re-concentration of organic extracts with gas nitrogen, samples were purified by SPE using amino-column (500 mg, 3 cc, Supelco NH₂-SPE) and eluted with dicholoromethane/methanol solution (80/20, v/v). After another reconcentration step with gas nitrogen, PAH-metabolites extracts were analyzed by Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS) analysis as described in Le Dû-Lacoste (2008).

2.4.6. Statistical analysis

Sampling procedure of chemical and biological analysis was reported in Table 22. Statistical analyses were performed using Statistica 9.0 software (StatSoft, USA) with significant level of 5 %. Comet assay data were normalized using a logarithm transformation (Zar, 2010). Biological endpoints of fish exposed to the different concentrations per WAF were analyzed with nested-ANOVA (N-ANOVA), followed by post hoc Tukey tests. When the parametric assumption of normality (Shapiro-Wilk tests) and homoscedasticity of variance (Levene tests) were not respected, the non-parametric Kruskal-Wallis (KW) test and multiple pairwise comparisons were conducted. Behavioral data were analyzed using a one-way repeated measure ANOVA (R-ANOVA) with exposure concentrations as a dependent factor and light as a fixed factor. A post hoc Newman Keuls test was performed when a significant difference was detected. These results were expressed as means \pm standard error of means (SEM). The survival, hatching and abnormalities data, expressed in percentage, were analyzed with Chi-square tests to detect significant differences between exposure conditions. Gene expressions were analyzed with a Relative Expression Software Tool REST-2009© (Qiagen, http://www.REST.de.com). The gene expression level was given in relative expression ratio compared to the control condition.

Table 22. Number of total	l individuals samp	pled for differ	ent chemical	and biological	analysis.	The number	into brackets	s corresponds	to the nu	mber of
replicates used.										

			WA	F BAL		WAF HFO				
Sampling point	Endpoints	Control	1%	10%	100%	Control	10%	50%	100%	
0-15 dpf	Survival	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	
48-96 hpf	Hatching success	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	150(5)	
96 hpf	Morphological analyses	47(5)	44(5)	46(5)	45(5)	37(5)	55(5)	50(5)	45(5)	
120 hpf	PMR analyses	43(5)	35(5)	40(5)	39(5)	46(5)	44(5)	43(5)	20(5)	
120 hpf	Heartbeat	16(5)	15(5)	19(5)	16(5)	18(5)	20(5)	20(5)	23(5)	
96 hpf	EROD activity	25(5)	25(5)	25(5)	25(5)	25(5)	25(5)	25(5)	25(5)	
24 hpf	Comet assay	5(3) ^a	5(3) ^a	5(3) ^a	5(3) ^a	$5(3)^{a}$	$5(3)^{a}$	$5(3)^{a}$	5(3) ^a	
96 hpf	Gene expression (RT-PCR)	$20(6)^{ab}$	$20(6)^{ab}$	$20(6)^{ab}$	$20(6)^{ab}$	$20(6)^{ab}$	$20(6)^{ab}$	$20(6)^{ab}$	$20(6)^{ab}$	
120 hpf	PAHs metabolites	50(3) ^{ab}	$50(3)^{ab}$	$50(3)^{ab}$	50(3) ^{ab}	$50(3)^{ab}$	$50(3)^{ab}$	$50(3)^{ab}$	$50(3)^{ab}$	

^a Individuals pooled for analysis; ^b The replicates number corresponds to experiment replicates

3. <u>Results</u>

3.1. Chemical analysis

During experiment period, the WAF renewal was stable for tested concentrations (results not shown). In Control conditions, PAH concentrations were low. Furthermore, the concentrations linearly decreased with WAF dilutions (Table 23). Concentrations of sum of total PAHs ranged from 262 ± 95 ng.L⁻¹ to 7566 ± 383 ng.L⁻¹ in WAF prepared with BAL oil loading of 103 mg.L⁻¹ and ranged from 1477 \pm 356 ng.L⁻¹ to 12047 \pm 11393 ng.L⁻¹ in WAF prepared with *Erika* fuel oil loading of 55 mg.L⁻¹. It appears that LMW PAHs (from 206 ± 75 to 6041 ± 249 ng.L⁻¹) were predominant in WAF BAL when compared to HMW PAHs (from 4.45 ± 0.05 to 17.76 ± 1.05 ng.L⁻¹). Furthermore, this light WAF was characterized by the greater presence of aromatic sulfurretted compounds (sulfPAHs and MDBT) compared to WAF HFO. The heaviest WAF HFO was characterized by the greater presence of HMW PAHs (from 59.0 \pm 17.3 to 276.6 \pm 20.8) compared to the WAF BAL. If we compare similar range of TPAH concentrations between both WAF BAL and HFO, it appears that HMW PAHs proportion was 13.3 to 15.6-fold greater in WAF HFO than BAL (i.e. BAL10 vs HFO10 and BAL100 vs HFO50). Similarly, methylated compounds of Phe were on average 5.3-fold more important in the WAF Erika oil than the Arabian Light. Furthermore, a characteristic of the heavy oil fraction was the presence of MChrysenes (from 34.3 ± 7.4 to 115 ± 36.4 ng.L⁻¹) compared to BAL oil which it was not detected.

Table 23. Summarized of aromatic compounds $(ng.L^{-1})$ measured in Water Accommodated-Fraction of Brut Arabian Light oil (WAF BAL) and Heavy *Erika* Fuel oil (WAF HFO) during zebrafish exposures. Values are means \pm SEM of both chemical replicates.

						Concentrations (ng.L)			
		Σ TPAHs	Σ 16PAHs	Σ LMW PAHs	Σ HMW PAHs	Σ sulfPAHs	Σ MNaph	Σ MPhe	Σ MDBT	Σ MChrys
	Control	7.4	7.08	6.16	0.92	0.32	84.14	13.35	n.d.	n.d.
BAL	1 %	261.82 ± 94.92	210.35 ± 74.99	205.90 ± 75.04	4.45 ± 0.05	51.47 ± 19.93	5703.79 ± 2440.42	128.80 ± 52.29	81.92 ± 32.47	n.d.
	10 %	1090.05 ± 22.30	848.96 ± 22.28	844.50 ± 21.15	4.46 ± 1.13	241.09 ± 0.02	27497.59 ± 27.97	229.13 ± 4.50	386.24 ± 6.32	n.d.
,	100 %	7566.04 ± 382.77	6058.35 ± 248.30	6040.59 ± 249.34	17.76 ± 1.05	1507.69 ± 134.48	159440.67 ± 2490.24	1322.47 ± 101.51	2479.74 ± 193.26	n.d.
	Control	13.24	12.33	12	0.33	0.91	230.84	16.94	n.d.	n.d.
UEO	10 %	1476.83 ± 353.54	1388.27 ± 341.90	1330.13 ± 324.81	59.00 ± 17.30	87.70 ± 11.43	22556.71 ± 1254.95	1883.74 ± 865.15	152.52 ± 13.32	34.30 ± 7.43
HFO	50 %	5370.90 ± 975.68	4979.60 ± 893.51	4812.73 ± 859.93	169.77 ± 35.31	388.40 ± 80.43	109961.13 ± 26225.76	3101.90 ± 601.66	681.12 ± 99.34	89.35 ± 43.60
	100 %	12046.71 ± 1988.85	11392.67 ± 1921.35	11117.94 ± 1900.78	276.58 ± 20.78	652.18 ± 67.29	230277.57 ± 2604.40	13297.79 ± 5311.09	1288.21 ± 13.41	114.94 ± 36.36

 Σ TPAHs : sum of total PAHs; Σ 16PAHs : sum of 16 PAHs listed priority by US-EPA; Σ LMW PAHs: sum of low molecular weight PAHs; Σ HMW PAHs: sum of high molecular weight PAHs; Σ sulfPAHs: sum of aromatic sulfuretted compounds; Σ Mnaph: sum of MethylNaphtalenes; Σ MPhe: sum of MethylPhenanthrenes; Σ MDBT: sum of MethylDibenzothiophenes; Σ MChrys: sum of MethylChrysenes.

n.d. < detection limit.

3.2. Teratogenic analysis

Survival and hatching rates of zebrafish during WAF exposures are shown in Fig. 30. During exposure the time (from 1.5 to 96 hpf), both WAFs did not induce lethal effects on both embryos and larvae. At the end of exposure, survival rates ranged from 93.3 ± 1.6 % to 96.0 ± 1.2 % for WAF BAL exposure (Fig. 30A) (Chi-Square, p=0.74) and from 89.3 ± 2.2 % to 95.3 ± 1.7 % for WAF HFO exposure (Fig. 30B) (Chi-Square, p=0.25). WAF BAL exposure did not induce significant mortality during 15 dpf (Chi-Square, p>0.05). Starting from 13 to 15 dpf, a basal mortality was observed. In contrast, WAF HFO exposure induced significant mortality of larvae from 144 hpf at the highest concentration (HFO100, Chi-Square, p<0.001). As observed in WAF BAL, a basal mortality was recorded from 13 dpf to 15 dpf in others WAF HFO concentrations.

Hatching rates during WAF BAL exposure varied in duration and for each concentration (Fig. 30C). At the first hatching day (48 hpf), no larvae hatched at the highest concentration of WAF BAL. Hatching rate ranged from 2.8 ± 1.1 % to 7.6 ± 2.2 % were recorded in others concentrations (Chi-Square, p>0.05). No significant difference in hatching rates were recorded at 72 hpf and 96 hpf for larvae exposed to WAF BAL. At the end of exposure (96 hpf) hatching success were ranged from 93.0 ± 0.5 % to 99.3 ± 0.5 %. Hatching rates of zebrafish larvae were also duration-variable for WAF HFO exposure (Fig. 30D). At 48 hpf, 17.9 ± 4.8 % of WAF HFO50-exposed larvae were hatched and were significantly higher than Control, WAF HFO10 and HFO100-exposed larvae, with 4.2 ± 1.9 , 3.7 ± 1.4 and 2.9 ± 1.6 % respectively (Chi-Square, p<0.001). At 72 hpf, hatching rate of larvae following exposure to the highest concentration was significantly lower than other concentrations (60.0 ± 11.4 %, Chi-Square, p<0.001). At the end of the exposure period (96 hpf), a significant hatching delay was recorded for the highest concentration (WAF HFO100) with only 83.5 \pm 5.5 % of hatched larvae (Chi-Square, p<0.001). No delay was observed for the others WAF HFO concentrations (hatching rates ranged from 98.6 ± 1.0 to 100.0 ± 0.0 %).



Figure 30. Zebrafish embryo-larval viability and hatching rates associated in (A, C) WAF BAL and (B, D) WAF HFO exposures. Pointer indicates time point from which significant differences were observed between 100 % WAF HFO and others concentrations. Letters denote significant differences between WAF concentrations at different times (Chi-Square, p<0.05).

Biometric measurements of 96 hpf larvae exposed to WAF BAL and WAF HFO are shown in Table 24. WAF BAL-exposed larvae were significantly larger in size for BAL1 and BAL10 concentrations than Control larvae (N-ANOVA, p=0.01, p=0.03, respectively). No significant differences were observed in ratio head/standard lengths, yolk sac surface and ratio yolk sac/whole larval surface in larvae exposed to different WAF BAL concentrations. In contrast, WAF HFO induced more modifications of larval biometric parameters. At the highest WAF HFO concentration, larvae were significantly smaller than Control, HFO10 and HFO50-exposed larvae (N-ANOVA, p<0.001). Ratio head/standard length was significantly reduced in WAF HFO10-exposed larvae compared to Control and HFO100 larvae (N-ANOVA, p<0.01). Yolk sac surface in WAF HFO100 larvae was larger than larvae exposed to HFO10 and HFO50 concentrations respectively (KW, p<0.001). Furthermore, a significant reduction of ratio yolk sac/whole larval surfaces was observed in larvae exposed to WAF HFO10 and HFO50 concentrations (KW, p<0.05).

The percentage of abnormal individuals at 96 hpf, and the different abnormalities and severity are summarized in Table 24. No growth retardation was recorded whatever concentrations of WAF BAL and WAF HFO. WAF BAL exposure did not induce significant morphological abnormalities as compared to Control (Chi-Square, p=0.39) whereas WAF HFO exposure induced concentration dependent abnormalities, with 2.7, 1.8, 22.0 and 91.1 % abnormal individuals for Control, HFO10, HFO50 and HFO100. Similarly, the severity of abnormalities was concentration dependent. Larvae exposed at the lowest concentration were not affected compared to Control larvae (98.2 %), whereas 18.0 % were mild-affected for WAF HFO50 concentration with 13.9 % of edemas (27.2 %:81.8 %, yolk sac:pericardial edemas). Following the exposure to the highest concentration of WAF HFO, 20.0 % and 40.0 % of larvae were moderately and severely affected, respectively, by 41.6 % of edemas, 35.9 % of cardiovascular and craniofacial abnormalities, 13.6 % shared between yolk sac malabsorption and axial skeleton abnormalities. Among edemas category, 41.5 % and 100 % of larvae presented yolk sac and pericardia edemas respectively.

		WAF Brut Ar	rabian Light oil		WAF Heavy Erika Fuel oil				
	Control	1 %	10 %	100 %	Control	10 %	50 %	100 %	
Standard length (mm)	3.67 ± 0.04^{a}	3.79 ± 0.02^{b}	3.78 ± 0.03^{b}	$3.77 \pm 0.02^{a,b}$	$3.77\pm0.02^{^{a}}$	3.82 ± 0.03^{a}	3.77 ± 0.04^{a}	3.57 ± 0.03^{b}	
Ratio Head/Standard length (%)	19.7 ± 0.32	19.6 ± 0.14	19.8 ± 0.13	19.4 ± 0.14	19.1 ± 0.14^{a}	19.9 ± 0.11^{b}	$19.5 \pm 0.20^{a,b}$	18.9 ± 0.25^{a}	
Yolk sac surface (mm ²)	0.27 ± 0.006	0.29 ± 0.006	0.29 ± 0.006	0.29 ± 0.006	$0.32 \pm 0.005^{a,b}$	0.30 ± 0.005^a	0.30 ± 0.010^{a}	0.36 ± 0.015^{b}	
Ratio Yolk sac/Whole larval surface (%)	22.7 ± 0.69	22.5 ± 0.38	22.6 ± 0.33	22.8 ± 0.33	23.9 ± 0.27^{a}	22.2 ± 0.35^{b}	22.4 ± 0.94^{b}	$25.8\pm0.84^{^a}$	
Abnormal individuals (%)	10.6	9.09	10.9	20.0	2.70^{a}	1.82 ^a	22.0 ^b	91.1 [°]	
Severity of abnormality (Scoring/3) (%):									
No affected (Score 0)	89.4	90.9	91.3	80.0	97.3	98.2	78.0	11.1	
Mild (Score 1)	6.38	9.09	4.35	20.0	2.70	0.00	18.0	28.9	
Moderate (Score 2)	2.13	0.00	4.35	0.00	0.00	0.00	2.00	20.0	
Severe (Score 3 or more)	2.13	0.00	0.00	0.00	0.00	1.82	2.00	40.0	
Abnormalities among abnormal individual (%):	S								
Edemas	5.32	4.55	3.11	13.3	0.00	0.45	13.9	41.6	
Axial Skeleton	2.66	4.55	4.66	4.44	2.70	0.91	3.47	6.46	
Craniofacial	0.00	0.00	0.00	2.22	0.00	0.00	2.32	16.5	
Cardiovascular	0.00	0.00	1.55	0.00	0.00	0.00	2.32	19.4	
Yolk sac Malabsorption	2.66	0.00	1.55	0.00	0.00	0.45	0.00	7.17	

Table 24. Developmental endpoints for assessing toxicity and teratogenicity of both WAFs BAL and HFO on zebrafish larvae at the end of exposure (96 hpf). Biometric values are means \pm SEM and abnormalities values are percentages of total effective.

Letters denote significant differences between WAF concentrations (N-ANOVA and Chi-Square test for biometric measurements and abnormalities respectively, p<0.05).

3.3. Behavioral and physiological analyses

Figure 31 shows the PMR of zebrafish larvae (at 120 hpf) following exposure to both WAFs BAL and HFO. Response patterns of exposed or non-exposed larvae to the WAF BAL (Fig. 31A) were similar during the light/dark challenge showing an increasing swimming activity during sudden darkness period (R-ANOVA, p<0.001). Then, a recover phase (Light On (2)) was similarly observed to the first light period (5 min in duration, Light On (1)) (R-ANOVA, p=0.99). Swimming activity increased significantly only during both 5 min light periods for larvae exposed to WAF BAL1 as compared to WAF BAL10 exposed larvae (2.19 (Light On (1)) and 2.05-fold (Light On (2)) higher, R-ANOVA, p=0.002). During sudden darkness period, no significant differences were observed between different concentrations of WAF BAL (ANOVA, p=0.85). For WAF HFO, the similar response patterns during the three light/dark periods were observed only in larvae exposed to the highest concentration (Fig. 31B). For the three others concentrations (Control, HFO10 and HFO50), a significant decrease of basal activity was observed during the Light On (2) period (R-ANOVA, p<0.001). Larvae exposed to the highest concentration of WAF HFO showed spend lower time swimming than larvae exposed to others WAF HFO concentrations during both light periods (ANOVA, p<0.001).

No significant differences were observed in heartbeat of 120 hpf larvae exposed to different concentrations of WAF BAL (Fig. 32). However, a significant decreasing heartbeat was measured in larvae exposed to the highest concentration of WAF HFO compared to others concentrations (KW, p<0.05).
A



Figure 31. PMR measured in 120 hpf zebrafish larvae after exposure to (A) WAF BAL and (B) WAF HFO. Means ± SEM distances moved of larvae were measured in each 5-min periods of light/dark challenge. Lower and upper cases denote significant differences between WAF concentrations and light/dark periods (Light On (1), Dark and Light On (2)) respectively (R-ANOVA, p<0.05).



Figure 32. Heartbeat measured in 120 hpf zebrafish larvae after exposure to both WAFs BAL and HFO. Values are expressed in response factor compared to respective Control larvae. No significant differences were observed after WAF BAL exposure (N-ANOVA, p>0.05). Asterisks denote significant differences with Control in WAF HFO exposure (KW, *** p<0.001). Dark traits denote significant differences between WAF concentrations.

3.4. Molecular analysis

The EROD modulations in larvae exposed to both WAFs are shown in Fig. 33. A significant induction over Control was observed at the highest concentration of WAF BAL (N-ANOVA, p<0.001). This induction was 2.6-fold higher as compared to the Control group. Similarly, an increase of 2.1 and 3.4-fold of the EROD activity was detected for the larvae exposed to the highest concentration of WAF BAL, as compared to BAL1 and BAL10 concentrations respectively (N-ANOVA, p<0.001). No significant differences of EROD activity were however recorded between Control, BAL1 and BAL10 concentrations. Furthermore, significant inductions were observed from 4.1, 5.5 and 7.8-fold compared to Control values for WAF HFO10, HFO50 and HFO100 concentrations, respectively (KW, p<0.001). EROD activity of larvae exposed to the highest WAF HFO concentration was 1.9-fold higher than EROD activity of HFO10 larvae (KW, p<0.001).

At 24 hpf, comet cells counts were significantly lower in larvae exposed at the highest concentration of WAF BAL as compared to the Control group (N-ANOVA, p=0.001) and lowest WAF concentration (N-ANOVA, p=0.03) (Fig. 34A). Nonetheless, DNA damages ranged close the background level. Thus, no significant differences in levels of DNA strand breaks were observed between Control, BAL1 and BAL10 concentrations. For the WAF

HFO, the levels of DNA strand breaks were not significantly different from the Control whatever the exposure concentrations (Fig. 34B).



Figure 33. *In vivo* measurement of EROD activity in WAFs-exposed larvae at the exposure end. Values are expressed in response factor compared to respective Control larvae. Asterisks denote significant differences with respective Control and Dark traits significant differences between WAF concentrations (N-ANOVA, * p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001).



Figure 34. DNA strand breaks (% tail DNA) measured in 24 hpf zebrafish embryos exposed to (A) WAF BAL and (B) WAF HFO. Values are means \pm 95 % confidence interval. Letters denote significant differences between WAF BAL concentrations (N-ANOVA, p<0.05, n=3 samples/300 nuclei).

3.5. Gene expressions

Relative expressions of target genes compared to respective Control are presented in Table 25. Data obtained for WAF BAL and WAF HFO were normalized to four housekeeping genes, eukaryotic elongation factor 1 (*eef1*), beta-actin (β *actin*), glucose-6-phosphate dehydrogenase (*g6pd*), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*).

Regarding genes involved in the detoxification processes, cytochrome P4501A (*cyp1a*) was 1.27 and 3.99-fold up-regulated for the two highest WAF BAL concentrations (p=0.004 and 0.002, respectively). *Cyp1a* was up-regulated from 2.04 to 8.31-fold in WAF HFO exposure (p=0.004; 0.002 and 0.002, respectively). No significant expression change was

revealed for the aryl hydrocarbon receptor 2 (ahr2) except an increasing expression for the lowest WAF HFO concentration (p=0.03) compared to control expression.

Concerning antioxidant defense, genes encoding for glutathione peroxidase 4 (gpx4), Cu/Zn-superoxide dismutase (sod(Cu/Zn)) and Mn-superoxide dismutase (sod(Mn)) were upregulated in WAF BAL exposures. Gpx4 expression was significantly increased in BAL10 and BAL100 WAF BAL. Sod(Cu/Zn) expression ranged 1.12 to 1.24 fold of Control expression (p<0.05). An increasing expression of the antioxidant enzyme Sod(Mn) was revealed only at the highest WAF BAL concentration (p=0.02). No significant change in catalase (cat) mRNA levels was observed in larvae exposed to WAF BAL. For WAF HFO exposure, gpx4 expression was significantly up-regulated at the highest concentration (p=0.03). In contrast to WAF BAL exposure, a significant increase in cat-mRNA levels was observed in larvae exposed to WAF HFO. Expression levels ranged from 1.25 to 1.42 fold Control expression. Sod(Cu/Zn) levels were significantly up-regulated in the two highest concentration (p=0.046 and 0.02, respectively). Sod(Mn) was 1.39-fold higher at the highest concentration (p=0.01).

Through both bcl-2-binding component 3 (p53) and bcl-2-associates X protein (*bax*), apoptosis processes were not impacted by both WAF exposures, except for p53 which was up-regulated at the highest WAF BAL concentration (p=0.003).

3.6. PAH-metabolites analysis

Quantification of hydroxylated PAH-metabolites (OHPAH) was reported in Fig. 35. In the Control group, OHPAH concentrations were $56.4 \pm 22.7 \text{ ng.g}^{-1}$ larvae for WAF BAL and $72.2 \pm 21.3 \text{ ng.g}^{-1}$ larvae for WAF HFO. 3-OHFluo was not detected in larvae for both WAF. 1-OHChrys and Σ OHBaP were only detected in WAF HFO which tended to be increased with exposure concentrations. The level of OHPyr was 2.4-fold increased at the highest concentration of WAF HFO compared to the Control condition (KW, P=0.02) Despite the production of metabolites (OHNaph, 2-OHBi, OHPhe and 1-OHPyr) results were not statistically different between tested concentrations for each measured-OHPAH in WAF BAL (KW, P>0.05).

	,	WAF Brut Arabian Light	Oil		WAF Heavy Erika Fuel Oil		
	1 %	10 %	100 %	10 %	50 %	100 %	
Housekeeping genes							
eef1	1.082	1.046	1.062	0.923	1.073	0.958	
βactin	0.934	0.943	0.926	0.947	0.917	1.043	
g6pd	0.99	1.014	1.017	1.088	0.917	0.811	
gapdh	1.086	1.266	1.165*	1.052	1.109	1.234	
Detoxification							
cyp1a	1.166 (0.993-1.443)	1.266 (1.041-1.535)**	3.994 (3.492-4.678)**	2.041 (1.176-6.440)**	4.546 (2.370-14.780)**	8.308 (4.242-24.222)**	
ahr2	1.073 (0.950-1.187)	0.944 (0.879-1.026)	1.053 (0.913-1.196)	1.826 (1.041-4.060)*	1.298 (0.644-3.656)	1.275 (0.773-3.364)	
Oxidative stress							
gpx4a	1.081 (0.975-1.257)	1.257 (1.076-1.450)**	1.294 (1.107-1.508)*	1.242 (0.853-2.040)	1.374 (0.924-2.287)	1.609 (1.029-2.545)*	
cat	0.978 (0.839-1.125)	0.988 (0.877-1.146)	1.126 (0.973-1.291)	1.362 (1.113-1.614)**	1.420 (1.217-1.649)***	1.252 (1.022-1.474)*	
sod(Cu/Zn)	1.138 (1.023-1.258)*	1.183 (1.064-1.323)*	1.239 (1.101-1.410)*	1.204 (0.826-1.663)	1.388 (0.985-1.937)*	1.626 (1.038-2.575)*	
sod(Mn)	1.058 (0.979-1.169)	1.113 (1.020-1.226)	1.191 (1.088-1.312)*	1.088 (0.932-1.294)	1.003 (0.839-1.261)	1.385 (1.106-1.932)*	
Apoptosis							
p53	1.083 (0.999-1.181)	1.074 (0.952-1.220)	1.142 (1.069-1.210)**	0.863 (0.568-1.277)	1.075 (0.716-1.574)	1.236 (0.781-1.846)	
bax	0.979 (0.932-1.023)	0.985 (0.932-1.106)	1.025 (0.979-1.076)	0.959 (0.808-1.104)	0.963 (0.881-1.060)	1.036 (0.873-1.252)	
Asterisks denote significant changes from respective controls (* p<0.05, ** p<0.01 and *** p<0.001).							

Table 25. Relative mRNA expression (Standard Error) of target genes in zebrafish larvae after 96 hours of WAFs exposures.



Figure 35. Concentrations of PAH-metabolites measured in larvae at the end of exposure (96 hpf) for (A) WAF BAL and (B) WAF HFO. Values are means \pm SEM. nd : no detected. OHNaph: hydroxynaphthalenes; 2-OHBi: 2-hydroxybiphenyl, OHPhe: hydroxyphenanthrenes, 3-OHFluo: 3-hydroxyfluoranthene, 1-OHPyr: 1-hydroxypyrene, 1-OHChrys: 1-hydroxychrysene, OHBaP: hydroxybenzo[a]pyrene.

4. Discussion

4.1. Chemical assessment of Water-Accommodated Fractions

In the context of hazard risk assessment, the use of dissolved fraction or WAF appeared suitable to evaluate the toxicity of petroleum compounds released into the environment through an oil spill (Martinez-Gomez et al., 2010). In our study, concentrations of PAHs in the WAF decreased significantly during each 24 h period after incubation with embryos at 28 °C (results not shown). For this reason, the solution renewal was performed every day all along the exposure period with the same WAF solution stored at 4 °C. The stock concentration remained stable during the 96 h exposure period, which validated the experimental protocol. The decrease of PAH concentrations has also been observed by Couillard et al. (2005) suggesting a possible degradation, volatilization and/or uptake of compounds by fish larvae. Our results suggest that the high temperature of incubation increases the loss of the dissolved fraction.

Furthermore, the concentrations used in the present study were chosen to cover a wide range of PAH concentrations found after different oil spills in environment. Indeed our concentrations for WAF BAL ranged from 262 ± 95 to 7566 ± 383 ng.L⁻¹ (Σ TPAHs) and for WAF HFO ranged from 1477 ± 354 to 12047 ± 1989 ng.L⁻¹. Law (1978) has recorded a concentration ranged from 2.2 to 200 µg.L⁻¹ in water sampled at 1 m depth after the *Amoco Cadiz* oil spill. This author has also reported a concentration of aromatic hydrocarbons to 1700 ng.L⁻¹ after the *Ekofisk Bravo* blow-out in 1977 (Law, 1978b). After the *Prestige* oil spill in 2002, PAH concentrations in seawater ranged up to 28.8 µg.L⁻¹ (A Bado-Nilles et al., 2009; González et al., 2006). Equally, the concentrations reported following *Exxon Valdez* and *Erika* spills were respectively recorded at 600 µg.L⁻¹ and from 23.5 to 54.9 ng.L⁻¹ in coastal waters (Boehm et al., 2007; Tronczynski et al., 2004).

Then, the compositions that we reported in dissolved fractions are in agreement with the specific characteristic of *Brut Arabian Light* and heavy *Erika* fuel oils reported in literature (Geffard et al., 2004; Saeed and Al-Mutairi, 2000; Tronczynski et al., 2004). Indeed, the compositional pattern of PAHs from *Erika* fuel oil included mainly alkylated compounds of naphtalene, phenanthrene, pyrene and chrysene and the presence most important of HMW PAHs compared to the BAL oil. In contrast, the BAL oil is characterized by a highest

concentration of sulfuretted PAHs and its homolog compounds and a major part of LMW PAHs. Therefore, we suggested that the bioavailability and toxicity of spilled-petroleum related compounds are closely associated to their aromatic and intrinsic properties.

4.2. Teratogenic assessment

The WAF BAL did not display lethal effect or developmental disruptions in zebrafish embryo-larval stage whatever the tested concentration. However, the WAF from Erika oil spills (HFO) was acutely toxic for larvae exposed at the highest concentration $(\Sigma TPAHs = 12047 \pm 1989 \text{ ng.L}^{-1})$. This lethal effect did not occur during 96 hours exposure period but only at 48 hours post-exposure, while larvae were rinsed and transferred in clean water after exposure. This result showed that a direct embryonic exposure may have important consequences on larval survival in detriment to the conventional and regulated period of exposure using fish bioassays. Consequently, lethal effect in 96-h test may be underestimated. This lower late mortality was equally coupled to an earlier reduction of hatching time and success, which induced larvae smaller than reference larvae. Furthermore, the lethal body burden might be explained by the high incidence and severity of different morphological abnormalities observed in these larvae. Indeed, 40.0 % from 91.1 % of abnormal larvae were severely affected, which presented mainly edemas (41.6 %), followed of cardiovascular (19.4 %) and craniofacial (16.5 %) disruptions. These detrimental effects were more important as larvae were significantly smaller. We equally noted that even if no mortality or hatching delay were observed for the lowest concentrations of WAF HFO, the incidence of morphological impairments appeared to be dose-dependent (WAF HFO10: 1.8 % at Σ TPAH=1476 ± 354 ng.L⁻¹; WAF HFO50: 22.0 % at Σ TPAH=5371 ± 976 ng.L⁻¹, WAF HFO100: 91.1 % at Σ TPAH=12047 \pm 1989 ng.L⁻¹). Our toxicological results are consistent with previous studies reporting acute and/or developmental effects of PAH mixtures on fish early life stage (Carls and Thedinga, 2010; Hose et al., 1996; Kammann et al., 2004; Kocan et al., 1996; Marty et al., 1997; Tilseth et al., 1984). However, a direct comparison is difficult due to different composition (mixture or oil), concentrations and exposure times used in these studies. Carls et al. (1999) have noted mortalities and sublethal morphological effects in embryos of Pacific herring (Clupea pallasi) exposed to low concentrations (STPAH=0.4-0.7 ppb or $\mu g.L^{-1}$) of weathered Alaska North Slope crude oil. Similar results were observed in pink salmon embryos (Oncorhynchus gorbuscha) exposed to similar conditions observed after the Exxon Valdez oil spill (Heintz et al., 2000, 1999). Indeed, a survival decreasing in salmon was recorded from 5.4 ppb (Σ TPAH) exposure and a decrease of growth (until 4-6 months post-exposure) from 18 ppb. While these effects were observed at lower concentrations than those in our study, the exposure time in herring and salmon were longer than the zebrafish assay. Furthermore, a decline (ranged from 40 to 70 %) of hatching rate in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) was reported after the exposure to high concentrations (100-200 μ g.L⁻¹) of complex environmental mixtures of unsubstituted PAHs (benzo[a]anthracene + dibenzothiophene + phenanthrene) or associated-dimethylated PAHs (Rhodes et al., 2005). Furthermore, these authors have shown developmental abnormalities which are induced mainly by unsubstituted PAH whereas dimethylated compounds exhibit a greater reduction in hatching success of medaka embryos. Lethal and sublethal body burdens observed might be associated to a reduction of the use of nutritional reserves, therefore of the energy required for optimal functioning of physiological mechanisms (Billiard et al., 1999; Carls and Thedinga, 2010). This one of the reasons the survival monitoring must be prolonged after exposure period in order to assess the ability of starved larvae to draw on their reserves and to survive (Örn et al., 1998).

4.3. Behavioral toxicity assessment

Based on motor responses (perception and reaction) to stimuli closely associated to the swimming activity, the PMR of larval zebrafish were analyzed in order to assess the developmental neurotoxicity of spilled-petroleum related compounds. Whatever the fraction considered, PMR patterns during the challenge were consistent with those found in the literature, dissociating three swimming activity phases: i) basal swimming activity phase (Light On(1)), ii) challenge phase or stress phase (Light Off) inducing an increasing swimming activity and iii) the recovery phase which the swimming activity turn on again to basal level in new light phase (Kokel et al., 2010; MacPhail et al., 2009; Padilla et al., 2011). Furthermore, the WAF BAL did not induce any swimming activity change in response of a second stress. However, an interesting response were shown in larvae exposed the highest concentration of WAF HFO. Indeed, regarding their basal level, larvae have swum on average 8.3-fold less of distance than in other exposure conditions (HFO10, HFO50) or unexposed larvae. However, despite an important inter-individual variability, these larvae have the ability to react to a second stress (Light Off) at similar level activity than the others larvae in terms of

distance moved (distance moved was 8.3-fold greater against on average 1.3-fold for Control, HFO10 and HFO50 larvae) and in terms of swimming speed (results not shown), and then to return to a basal level when the light switch on again. This important reduction of swimming activity was closely associated to their morphological impairments previously demonstrated. Indeed, mildly to severely affected-larvae provided a minimum of vital swimming to their survival, but in case of sudden stress (e.g. predation), they are able to rapidly react. However, as previously observed their ability to survive was limited. Information on fish PMR following exposure to pollutants is limited to a few studies (Péan et al., 2013; Usenko et al., 2011) and to the best of our knowledge, no data about the impact of PAH mixtures is already available in the literature on this parameter, limiting comparisons. In zebrafish and medaka exposed to PAH-contaminated sediments, modulations in PMR were recorded dependent to the exposed-compound. Fluoranthene (10 μ g.g⁻¹, 3-benzenic rings PAH) led to a reduction of distance moved in larval zebrafish whereas the benzo[a]pyrene (10 μ g.g⁻¹, 5-benzenic rings PAH) increased this swimming activity in Japanese medaka (Perrichon et al., submitted). Using similar approach, Le Bihanic et al., (submitted) have equally reported a reduction of swimming activity in Japanese medaka after exposure to benzo[a]anthracene (4-benzenic rings PAH). Recently, our works have shown a potential modulation of the PMR in first offspring generation of zebrafish exposed to aromatic fraction spiked-food (Perrichon et al., in preparation). Indeed, aromatic extract from BAL oil (Σ TPAH=2572 ± 96 ng.g⁻¹) did not display any PMR variation in offspring larvae whereas the aromatic extract of Erika fuel oil (HFO, Σ TPAH=1633 ± 71 ng.g⁻¹) induced a significant reduction of this PMR. A third aromatic extract from pyrolytic origin were tested, which led to a high stress level in offspring larvae from genitors exposed to 3-fold environmental concentration equivalent to $\Sigma TPAH=$ 18151 ± 4983 ng.g⁻¹. Through the PMR analysis, the both WAF BAL and HFO did not exhibit developmental neurotoxicity in larvae exposed whatever the concentration tested. We equally noted that these behavioral analyses performed did not assess the swimming performance (strict sense) of larvae but aimed to only test their ability to rapidly react to a second stress, which could be a benefit to escape to a predator, obtain food or better habitat in case of chemical compound exposure. The behavioral consequences observed can be directly associated to a body burden in terms of morphology or equally representative of physiological impairments.

4.4. Cardiotoxicity assessment

Once more, BAL fraction did not display any cardiac alterations whatever the tested concentration. However, the lethal and sublethal effects previously observed in larvae exposed to WAF HFO50 and HFO100 could be the direct consequences of mechanisms alterations involved in energetic metabolism by petroleum compounds (Billiard et al., 1999; Rhodes et al., 2005). Indeed, we observed defects in heartbeat in 120 hpf larvae exposed to the highest concentration of WAF HFO. The observed bradycardia is consistent with direct effect observed on cardiac morphogenesis. Among the abnormal larvae recorded in the present study, a major part of malformations were indeed pericardial and cardiovascular natures (e.g. anemia, hemorrhages, peripheral vascular defects, structure defects of atrium and ventricle). However, any difference in heart rate was recorded in larvae exposed to WAF HFO50, while 22.0 % of larvae were deformed. In addition, recent studies have demonstrated the cardiotoxic action of PAHs in fish early life stages, which have reported bradycardia, irregular arrhythmia and morphogenesis disturbances (González-Doncel et al., 2008; Hicken et al., 2011; Incardona et al., 2011, 2010, 2009, 2006, 2004; Scott et al., 2011). Furthermore the abundance of parent tricyclic PAHs and their alkylated homologs in weathered crude oil or PAH mixtures will be the origin of cardiac dysfunction in zebrafish embryos (Incardona et al., 2005, 2004). Heartbeat was also decreased in herring and zebrafish embryos following respectively WSF exposure of Alaska crude oil n°2 (Σ TPAH=9.3 µg.mL⁻¹; Middaugh et al., 1998, 1996) and after sediment eluates/extracts exposure (Strmac et al., 2002). In 2010, Claireaux and Davoodi have shown a reduction of cardiac output (heart rate and stroke volume) in oil-exposed common sole (Solea solea). Reduced contraction velocity has also been reported in golden grey mullets (Liza aurata) following a WSF exposure of crude oil (Milinkovitch et al., 2013a, 2012). Even though the direct comparison with data from the literature is limited because of large range of exposure methods, species or concentrations used, our results are consistent with those reported, showing that a disruption in physiological mechanisms may lead to important consequences in survival in later developmental stages and consequently might be harmful for fish recruitment.

4.5. Genotoxicity assessment

Surprisingly, no significant differences in DNA damages levels were observed between both the WAFs exposure in 24 hpf embryos despite physiological and developmental impairments observed in 96 hpf larvae. Indeed, some PAHs and their metabolites have the ability to interact with DNA molecule inducing different structural DNA lesions such as chromosomal modifications, cross-linkages, strand breaks or DNA adducts (Kosmehl et al., 2008; Nogueira et al., 2009; Xue and Warshawsky, 2005). In case of non-reparation, these DNA damages, may affect development, growth dynamic, therefore organism's survival (Lawrence and Hemingway, 2003; Xue and Warshawsky, 2005). The early analysis (24 hpf) of these damages may be an explanation to these lack of significant results. Recently, Le Dû-Lacoste et al. (2013) have indeed demonstrated that genotoxic responses of turbot exposed to PAH mixtures (Σ TPAH=6602-69285 ng.L⁻¹) extracted from *Erika* fuel oil was only significant after four days of exposure. A time to onset toxic mechanisms (enzymatic activation and metabolic system) would be necessary to reveal a positive response in the comet assay (Kammann et al., 2004; Le Dû-Lacoste et al., 2013). Consequently, we cannot correctly conclude about genotoxic effects on zebrafish exposed to both oil fractions (BAL, HFO). Furthermore, a significant increase in the level of DNA damages was shown for turbot (Scophthalmus maximus) exposed during 4, 7 and 21 days to contaminated sediment (Kilemade et al., 2004). A high level of micronucleated erythrocytes were also assessed in neotropical fish (Prochilodus lineatus) exposed to diesel WSF under acute and subchronic conditions (Vanzella et al., 2007). A stable increase in level of DNA adducts was observed in Atlantic cod (Gadus morhua) following 30 days of North Sea crude oil exposure $(\Sigma TPAH=7.81 \ \mu g.L^{-1}, Aas et al., 2000).$

4.6. Detoxification and antioxidant defenses assessment

The induction of cytochrome P450 and its catalytic activity involved in the phase I detoxification have been currently used in environmental biomonitoring as sensitive biomarkers of PAHs exposure (van der Oost et al., 2003). An increase of *cyp1a* mRNA levels was observed in larvae exposed to both WAF BAL10 and WAFBAL100. These activation was not sufficiently important to induce a significant induction of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in WAF BAL10 whereas EROD was increased in WAF BAL100

 $(\Sigma TPAH=7566 \pm 383 \text{ ng}.\text{L}^{-1})$. In the same way, EROD activity closely linked *cvp1a* activation was increased linearly with the concentration of WAF HFO. Our finding results reveal that even though any or few morphological, behavioral or physiological alterations were not observed in WAF BAL10-100 and WAF HFO10-50, defense mechanisms are well-developed to prevent potential damages of petroleum compounds, which are well bioavailable to the fish. However, these inductions were obviously higher in WAF HFO than BAL probably due to the greater presence of HMW PAH such as pyrene, chrysene and benzo[a]pyrene which are known as potent cypla inducer (Barron et al., 1999, 2004). EROD activity was shown increased in rainbow trout (Oncorhyncus mykiss) exposed to mixtures of PAHs (Basu et al., 2001). An induction of EROD was also observed in several species Atlantic cod (Gadus morhua) after 24 h exposure to crude oil (Abrahamson et al., 2008) and in juvenile salmons (Salmo salar) exposed to petroleum compounds during 4 and 8 days (Gagnon and Holdway, 2000). Our results are consistent with those of Kerambrun et al. (2012) and Gagnon and Holdway (2000) who reported the ability of LMW PAHs in BAL oil fraction to induce EROD activity despite they are potentially no inducer of this activity. Furthermore, the increase of these detoxification systems could be enhancing by the production of ROS (reactive oxygen species) or reactive PAHs metabolites (Basu et al., 2001; van der Oost et al., 2003). Indeed, when the production of ROS exceeds the antioxidant defense of an organism, ROS can interact deleteriously with cellular components (DNA, proteins, membrane lipids) causing oxidative stress and cell death (Di Giulio and Meyer, 2008).

In the present study, the activation of genes involved in antioxidant defenses (*gpx, cat, sod*) increased with the WAF concentrations of *Brut Arabian Light* and heavy *Erika* fuel oils strongly suggesting they produce an oxidative stress. This oxidative stress appears also related with induction of enzymatic systems of detoxification. The antioxidant defenses increasing could be play a protective role to the fish from petroleum compounds, to prevent adverse effects in physiological and/or morphological processes, while an evidence of compounds bioavailability was shown by EROD and *cyp1a* inductions. However, while an expression of antioxidant genes, their activation does not seem stabilize the prooxidant-antioxidant system in WAF HFO50 and HFO100, which led to morphological damages and later lethal effects. Several studies have examined changes in oxidative stress in response to PAHs exposures in aquatic organisms. However, a major part of them concerned protein activity and not mRNA expression response and focused only the exposure to single PAH compounds (Ferreira et al., 2005; Oliveira et al., 2008; Sun et al., 2006). Furthermore, modulation of antioxidant defenses appears to be variable markers and species specific. Thus, phenanthrene (3-benzenic rings)

PAHs) induced an oxidative stress in golden grey mullet (*Liza aurata*) and in goldfish (*Carassius auratus*) (Oliveira et al., 2008; Sun et al., 2006). However, the concentrations used in these studies were relatively high. An increase of catalase activity was reported in the liver of the African catfish (*Clarias gariepinus*) exposed for 196 h to crude oil (Achuba and Osakwe, 2004). In contrast, antioxidant enzymes activities were modified in golden grey exposed to chemically dispersed oil (Milinkovitch et al., 2011a, 2011b). (Kerambrun et al. (2012) have also reported the lack of modulation of the catalase activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to acute concentrations of crude oil. Throughout the literature, these antioxidant defenses appear less sensitive to react to pollutants exposure than trigger detoxification, biotransformation processes.

Furthermore, the activation of detoxification systems and the potential production of ROS could be due to the production of reactive PAH metabolites, which are generally more toxic than their parent PAHs. While the results were not statistically different for a major part of PAH metabolites, between WAF concentrations due to high samples variability (Fig. 6), a high proportion of OHPyr, OHChrys and OHBaP were found in larvae exposed to HFO. Even though, we cannot directly associate these compounds to the adverse effects observed in the present study, they are known to induce physiological (e.g. cardiac dysfunction) and morphological (e.g. development abnormalities) impairments (Incardona et al., 2009, 2005, 2004). Furthermore, these metabolites (mainly OHPyr) are currently observed as predominant compounds metabolized by fish after PAHs exposure (Brinkmann et al., 2010; Le Dû-Lacoste et al., 2013). In addition, in lesser concentrations OHBaP and OHChrys were found in HFO larvae. However, OHBaP are known to be a genotoxic metabolite, which could be at the origin cellular damages causing adverse reaction cascade inducing later fish mortality (Le Dû-Lacoste et al., 2013). While the OHChrys were also present in HFO larvae as well as parent and alkyl homologues in water, these compounds are not known to alter embryonic development (Incardona et al., 2009, 2004) but are high Cypla-inducing compounds (Barron et al., 2004).

Considering the similar range of concentrations, the WAF HFO was more toxic than WAF BAL causing morphological, behavioral, physiological, molecular alterations which lead acute lethal for the highest tested concentration. However, the observed effects cannot be related directly with specific compounds. Several studies have reported that alkylated compounds play an important role in toxicity of oils (Fallahtafti et al., 2012; Knecht et al.,

2013; Turcotte et al., 2011). While an important proportion of alkyl PAHs (mainly MNaph and MPhe) are present, the effects probably results of a synergetic combination of compounds, which generate toxicity through different pathway dependent or independent of aryl hydrocarbon receptor (*ahr2* was not induced in our study). The narcotic action of LMW PAHs (mainly by naphthalene) might play an important role in the observed developmental toxicity, whereas the HMW PAHs (e.g. pyrene, benzo[a]pyrene and/or chrysene) might modulate the enzymatic catalytic activities. Further investigation of alkylPAHs should be then performed to elucidate their specific impact on fish early life stages.

Through the present study, the joint use of zebrafish embryo-larval assay with a multiscale approach using conventional markers of bioassays and environmental biomonitoring markers provide to be suitable in toxicological risk assessment of spilled-petroleum related compounds. The use of multiscale analysis should be systematically integrated in toxicity testing using fish *in vitro* bioassays. Furthermore, we demonstrated that the use of markers of short-term and predictive long-term effects in conventional time exposure (96 h-test) was not sufficiently relevant. Thus, the acute toxicity of compounds could be underestimated, hence there is a need to extend the tests post-exposure. The lifecycle of zebrafish being relatively short, the breeding of embryos and larvae exposed to these petroleum compounds could be the subject of further investigations in order to assess later effects on fish reproduction and survival. Research on offspring generations of these exposed fish would be also an interesting investigation perspective at longer-term.

Acknowledgements

Financial support for PhD grant was received by PP from both the Conseil Général de Charente Maritime and the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer). This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR), program "Contaminant, Ecosystème et Santé", in the frame of the ConPhyPoP (2009-002) research project and CPER A2E. This project is co-fincanced by the European Union with the European fund of regional development. Authors acknowledge the CEDRE for providing crude oils and R. Kanan for his recommendation in WAF preparation. D. Leguay is acknowledge for technical support of zebrafish behavioral assays and L. Joassard for help in RT-PCR analyses. This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence continental to coastal ecosystems.



CHAPITRE IV

CONSÉQUENCES D'UNE EXPOSITION TROPHIQUE PARENTALE SUR LA PREMIÈRE GÉNÉRATION DESCENDANTE

RÉSUMÉ DU CHAPITRE IV

Cette dernière étude explore les potentiels effets toxiques d'une exposition par la voie trophique de géniteurs (F₀) sur la première génération de descendance (F₁). Pour cela, la génération parentale de poisson zèbre a été exposée durant l'ensemble du cycle de vie, du stade larvaire 5 jpf (stade d'ouverture de la bouche) au stade adulte (9 mois), à de la nourriture enrobée à trois mélanges de HAP obtenus à partir d'un sédiment provenant de la Seine (extrait pyrolytique, PY), d'un pétrole léger de type Arabian Light (extrait pétrogénique léger, BAL) et d'un fuel lourd de type Erika (extrait pétrogénique lourd, HFO). L'évaluation des effets toxiques de ces trois extraits aromatiques sur la génération parentale (F_0) ont fait l'objet d'autres études au sein du projet ConPhyPoP, dont les effets sur la survie et la croissance sont illustrés en Annexe 2 (Vignet et al., Submitted), et les effets tumorigènes et génotoxiques en Annexe 3 (Larcher et al., Submitted). Après 6 mois d'exposition par la voie trophique des géniteurs (F_0), la première génération de descendants a été obtenue (F_1). Une approche multimarqueur (similaire à celle du précédent chapitre) a été utilisée afin d'évaluer les dommages des trois fractions à différents niveaux d'intégration biologique pour les stades précoces de développement de la génération F₁. Cette étude est présentée sous forme d'un article scientifique préparé pour la revue Science of the Total Environment.

Parental trophic exposure to three aromatic fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons in the zebrafish: consequences for the offspring

Article préparé pour la revue Science of the Total Environment

Prescilla Perrichon^{a,b,*}, Farida Akcha^a, Karyn Le Menach^c, Manon Goubeau^a, Hélène Budzinski^c, Xavier Cousin^{a,d}, Paco Bustamante^b

^a Ifremer, Laboratoire d'Écotoxicologie, L'Houmeau/Nantes, France
^b Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), CNRS-Université de La Rochelle, UMRi 7266,
2 rue Olympe de Gouges, F17042 La Rochelle Cedex 01, France
^c Université de Bordeaux (EPOC, LPTC, UMR CNRS 5805), 351 Cours de la Libération,
F33405 Talence Cedex, France
^d INRA, Laboratoire de Physiologie et Génomique des Poissons, Campus Beaulieu, 35042
Rennes Cedex, France

*Corresponding author: Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), Université de La Rochelle, UMRi 7266, 2 rue Olympe de Gouges, F17042 La Rochelle Cedex 01, France. Tel.: +33 5 46 50 76 32. Fax: +33 5 46 50 76 63

E-mail address: prescilla.perrichon@hotmail.fr (P. Perrichon).

Abstract

Since last decades, PAH emissions due to extensive anthropogenic activities are overgrowing causing an important pollution of aquatic ecosystems. This pollution represents a threat for organisms, among them fish. Consequently, a pre-natal stress can have important repercussions, and may impact survival and population recruitment. To investigate this point, eggs were collected from zebrafish exposed during 6 months by trophic route to three aromatic fractions from two different origins, pyrolytic (PY) and petrogenic (a light and a heavy fraction, BAL and HFO respectively) sources. Chronic dietary exposure of the parents were performed at environmentally relevant concentrations (0.3X, 1X and 3X; 1X represents an environmental concentration measured in France estuary). In order to explore the consequences of parental exposure for the next first generation, different toxic responses were studied in both embryos and larvae using a multiscale approach. Toxic effects were assessed by looking at hatching success, developmental abnormalities, photomotor response and heartbeat. The level of PAH metabolites and EROD activity in fish larvae were measured to assess exposure to PAHs. Egg production of fish exposed to the three aromatic fractions was significantly reduced compared to the Solvent Control, hence little information were available for BAL and HFO offspring. Larvae size providing from PY genitors was found to increase despite a reduced yolk sac compared to Solvent Control larvae. Furthermore, a high level of behavioral stress was observed in larvae originating from parents exposed to three-fold environmental concentration. The cardiac activity was reduced in a concentration dependent manner. No effect was however observed on biotransformation markers (ahr, cyp1a, EROD), nor on the level of DNA damage for all PY, BAL and HFO offspring. The absence of significant differences in metabolite levels may indicate a potential early depuration of transferred-compounds. The disruptions observed at individual level in the first offspring generation may impact on longer-term, survival and recruitment population.

Keywords: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, parental transmission, fish early-life stages, PhotoMotor Response, cardiac performance, genotoxicity.

1. Introduction

In the last decades, increasing industrialization and urbanization led to important chemical pollution of the aquatic environment (Shen et al., 2013). Among organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are ubiquitous and semi-persistent pollutants in the environment (Laflamme and Hites, 1978). They are lipophilic compounds with two or more fused benzene rings. PAHs can be divided in two groups: the Low-Molecular-Weight (LMW) PAHs (PAHs with 2 or 3-benzenic rings) and the High-Molecular-Weight (HMW) PAHs (PAHs presenting more than 3-benzenic rings). PAHs are produced from three pathways: i) pyrolytic processes such as incomplete combustion of organic matter from natural or anthropogenic sources (pyrogenic origin), ii) diagenesis of sedimentary organic matter giving form to fossil fuel (petrogenic origin), iii) natural precursor transformations during early diagenesis processes (diagenetic origin) (Neff, 1979). Although they may be produced naturally, their predominant emission is from anthropogenic sources, including burning of fossil fuel, coal tar, wood, waste incineration, urban runoff, maritime transport discharges and petroleum spills (Neff, 1979). Depending on their origin, PAHs are generally present in complex mixtures that can be characterized by their molecular fingerprint. Indeed, a predominance of HMW compounds associated to the presence of less or non-alkylated PAHs is representative of a pyrolytic mixture. To the opposite, a petrogenic mixture is characterized by a majority of LMW PAHs and the presence of methylated compounds (Abrajano et al., 2003; Sakari, 2012).

Due to their physico-chemical properties, most of the PAHs exhibit hydrophobic and lipophilic properties making them relatively insoluble in water. They have a high capability to adsorb onto suspended particles or non-polar matrices which respectively favors their accumulation in sediments and in lipid tissue of organisms. Fish have the ability to biotransform PAHs to more water-soluble metabolites, hence reducing bioaccumulation and transfer efficiency in higher levels of marine food chains (Meador et al., 1995). Nonetheless, benthic invertebrate prey represent an important pathways of PAHs exposure for demersal fish. Indeed, many invertebrate species such as mollusks can bioaccumulate high PAHs concentrations in their fatty tissues (Peterson et al., 2003; Varanasi et al., 1985) due to lower biotransformation capability (Bustamante et al., 2012; Lee et al., 1972; Palmork and Solbakken, 1981). PAH toxicity in fish can be directly linked to biotransformation by enzymatic systems such as those from cytochrome P450, which metabolize PAHs into

reactive metabolites (Meador et al., 1995; van der Oost et al., 2003). Some of the metabolites produced are more toxic than the parent compounds, presenting for example a high reactivity for the DNA leading to genotoxic effects (Le Dû-Lacoste et al., 2013; Wessel et al., 2012, 2010). However, DNA damages are not necessary linked to an activation of enzymatic systems such as ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity. Taking example of fluoranthene which is not potential inducer of EROD activity, while its metabolites exhibit genotoxic effects (Wessel et al., 2012). Furthermore, PAH metabolization can also lead to the production of reactive oxygen species (ROS) which may induce an oxidative stress (Frenzilli et al., 2009).

In aquatic organisms, exposure to PAHs can thus lead to detrimental defects in a developmental, physiological and behavioral point of view. PAHs impact on the reproductive success is particularly studied due to its consequence on population recruitment.

PAHs can act as endocrine disruptors that interfere and thus lead to adverse reproductive and developmental effects (Cooper and Kavlock, 1997; Hawliczek et al., 2012; P R R Monteiro et al., 2000; Pedro Ribeiro Rocha Monteiro et al., 2000). Previous studies showed a reduction of the plasma level of gonad hormones in fish after PAH exposures (Monteiro et al., 2000a; Thomas and Budiantara, 1995). Thomas and Budiantara (1995) highlighted a blockage of sexual maturation, impairments of ovarian recrudescence and induction of oocyte atresia in female Atlantic croaker (Micropogonias undulatus) following the exposure to water-soluble fractions of diesel fuel and naphthalene. Similarly, a delay in gonad maturation has been reported in female English sole from sites with high concentrations of PAHs (Casillas et al., 1991; Johnson et al., 2002, 1988) as well as in female Atlantic croaker exposed at laboratory to benzo[a]pyrene (Thomas, 1990). An exposure to a PAH-contaminated sediment has been shown to reduce spawning in sole (Johnson et al., 2002). PAHs can hence have an effect on the genitors themselves but also on their offspring. The physiological condition of a female at the time of vitellogenesis was reported as a modulation source on the offspring generation. A prenatal stress (i.e. chemical contamination) could thus affect the optimal development of early life stage in the future generation (Eriksen et al., 2006; Gagliano and McCormick, 2009; Mccormick, 1999). Uptake of pollutants can occur during ovogenesis and consequently accumulate in vitellin reserve of the embryos. Relatively few studies reported to potential parental transmission of PAHs in offspring generation. Following maternal exposure, the transfer of anthracene in the vitellus of fathead minnows eggs has been shown by Tilghman Hall and Oris (1991). More recently, Pollino et al. (2009) demonstrated a positive correlation between the occurrences of abnormal larvae in offspring with naphthalene exposed females rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). The transfer of PAHs to the embryos was associated to mortality, hatching delay and growth alterations (Hose et al., 1981; Nye et al., 2007; Tilghman Hall and Oris, 1991).

The present work aimed to explore the consequences of a parental exposure (F_0) of PAHs for the next first offspring generation (F_1) under chronic dietary exposure conditions. Parents were chronically exposed during its whole lifecycle, through diet to three aromatic fractions from pyrolytic and petrogenic at concentrations relevant in an environmental point of view. This study focused on the early life stages of offsprings. Multiscale approach was undertaken in order to assess a wide range of fish toxic response, using phenotypic markers (hatching success, developmental abnormalities), behavioral (PhotoMotor Responses), physiological (e.g. heartbeat) and cellular/subcellular markers (DNA damages, apoptosis, oxidative stress). In addition to these effects markers, the degree of exposure to PAHs was evaluated with the level of EROD activity, *cyp1a* induction and PAH-metabolites in offspring larvae.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

The *Arabian light* crude oil (BAL 100) and the heavy fuel oil of the *Erika* fuel oils (No. 2) used for this study provided from *Cedre* (Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution, France). PAH spiked-food and chemical analysis were performed with dichloromethane solvent from Acros Organics (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). The ethyl-4-aminobenzoate (benzocaïne) was purchase from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

2.2. Preparation of PAHs-contaminated food

Four sizes of foods were prepared (i.e. $\leq 125 \ \mu m$, 125-315 μm , 315-500 μm , $\geq 500 \ \mu m$) from ground commercial food INICIO Plus 0.5 mm (Biomar, France), in order to adapt the food to the fish morphological during all lifecycle (from larvae to adult stages). Each food lot was contaminated by the PAH aromatic fractions as described here after. The aromatic fractions were a pyrolytic fraction (PY) extracted from sediments collected in the highly polluted site of Oissel (Seine estuary, France) and two petrogenic fractions extracted from Brut Arabian Light oil (BAL) and heavy Erika fuel oil (HFO). Extraction and quantification of these aromatic fractions based on the 16 priority PAHs listed by US-EPA were performed according to procedures as described in Budzinski et al. (1997) and Cachot et al. (2007). PAHs and alkylated PAHs concentrations were reported in Vignet et al. (submitted) and given in Fig. 36 Supplementary data. Dry food was hence spiked with the three PAHs fractions according to Vicquelin et al. (2011). Briefly, the amount of food required for the experiment was mixed to dichloromethane (Solvent Control) and each tested aromatic extract in a roundbottom glass flask. Then, solvent was completely evaporated with a rotary evaporator (RV10 Basic VWR International) equipped with a heating water bath (HB10 Basic, VWR International) at 45 °C and until total evaporation. Finally, spiked-food was stored overnight in darkness at room temperature under a fume hood to ensure complete residual solvent elimination. For each aromatic fraction, three concentrations were prepared: 0.3X, 1X and 3X. The nominal environmental concentration 1X represents the total PAHs concentration measured in mollusks in from the Seine estuary corresponding to 5 μ g PAHs g⁻¹ of dry food. PAHs and alkylated PAHs concentrations measured in contaminated-food were also reported in Vignet et al. (submitted) and given in Table 1 Supplementary data.

2.3. Experimental procedure

2.3.1. Parental dietary exposure (F_0 Generation)

Wild-type zebrafish (TU strain, Tübingen, Germany) were used for experiment. The parental dietary exposure was performed during the whole 9 months of zebrafish lifecycle (larvae, juvenile, and adult). The parental generation was produced from fifty viable eggs per conditions selected from healthy spawning of zebrafish, transferred then into Petri dishes (100 mm) filled with 30 mL of artificial water (0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 5 mM NaCl and 0.17 mM KCl) and incubated at 28 ± 0.5 °C until exposure starting. Maintenance standard conditions of zebrafish were already described in Perrichon et al. (submitted). The trophic exposure was then performed from 5 days post-fertilization (dpf) larvae which corresponds to

the mouth opening stage. The procedure were already described in Vignet et al. (submitted). Briefly, larvae were transferred in 1 L tanks in breeding room and fed *ad libitum* with aromatic fraction-spiked food twice a day. In order to improve growth, larvae were then transferred in 3 and 10 L tanks from 12 dpf and 3 months post-fertilization (mpf) respectively. From this latter stage, diet rations distributed were set at 2 % of the total biomass. During the 9 months of dietary exposure, a distribution of non-contaminated food with living *Artemias sp.* nauplii (INVE, Belgium) was given in supplement once a day in order to . Breeding exposure was performed in a constant aeration and flow water systems with daily water renewal set at 40 % in order to maintain optimal water quality. Water and room temperature were kept at 27 °C with 14 h light/10 h dark photoperiod.

2.3.2. Offspring production (F₁ Generation)

Eggs were obtained according to two distinct methods. Three spawning boxes (1 L, AquaSchwarz, Germany) were placed directly into the breeding tank the evening before spawning day. In addition, random pairwise mating was performed. One male and one female were placed together in a spawning box the evening preceding egg production. With both methods, spawning and fertilization took place within 30 min after the onset of light in the morning. They were alternatively used in order to collect eggs twice a week. Fertilized eggs were selected by microscopic exam and viable eggs were distributed in batches of 30 into plastic Petri dishes (100 mm diameter) filled with 30 mL of artificial water and incubated at 28 ± 0.5 °C until analysis.

analysis



Figure 36 (Supplementary data). A) PAHs and alkylated PAHs concentrations for three aromatics fractions (PY, BAL, HFO) and (B) their relative proportions.

		PY Aromatic Fraction			BAL Aromatic Fraction			HFO Aromatic Fraction					
	Molecular			·							-		
Compounds	Weight	Solvent	0.3 X	1 X	3 X	Solvent	0.3 X	1 X	3 X	Solvent	0.3 X	1 X	3 X
	(g.mol ⁻¹)												
Naphthalene*	128	6 ± 6	15 ± 7	56 ± 14	157 ± 74	3 ± 1	161 ± 21	315 ± 183	1110 ± 472	4 ± 1	37 ± 6	120 ± 16	405 ± 73
1-Methylnaphthalene	142	4 ± 6	8 ± 2	22 ± 5	62 ± 21	2 ± 0	458 ± 19	1147 ± 102	3300 ± 739	2 ± 0	86 ± 8	261 ± 20	854 ± 84
2-Methylnaphthalene	142	8 ± 9	15 ± 3	43 ± 8	116 ± 39	4 ± 1	420 ± 19	1036 ± 96	2982 ± 725	4 ± 1	137 ± 13	396 ± 32	1259 ± 118
\sum Methylnapththalene	142	12 ± 15	23 ± 5	65 ± 13	178 ± 60	5 ± 1	878 ± 38	2183 ± 197	6282 ± 1465	6 ± 2	223 ± 20	657 ± 52	2113 ± 201
Acenaphtylene*	152	1 ± 0	11 ± 2	35 ± 6	114 ± 23	1 ± 0	15 ± 1	46 ± 2	136 ± 19	1 ± 0	3 ± 1	3 ± 1	13 ± 13
Acenaphtene*	154	2 ± 1	14 ± 12	29 ± 7	89 ± 24	23 ± 21	37 ± 26	67 ± 68	90 ± 30	27 ± 26	46 ± 23	74 ± 19	190 ± 17
Fluorene*	166	2 ± 1	14 ± 3	42 ± 8	137 ± 28	2 ± 1	79 ± 1	232 ± 2	677 ± 55	2 ± 1	34 ± 2	99 ± 8	312 ± 25
Phenanthrene*	178	8 ± 4	95 ± 21	291 ± 60	895 ± 213	6 ± 4	178 ± 7	492 ± 10	1438 ± 86	6 ± 3	152 ± 7	418 ± 32	1279 ± 51
1-Methylphenanthrene	192	1 ± 0	12 ± 3	37 ± 11	100 ± 28	1 ± 0	122 ± 4	348 ± 14	956 ± 97	0 ± 0	73 ± 8	227 ± 15	617 ± 71
2-Methylphenanthrene	192	2 ± 0	19 ± 5	60 ± 13	175 ± 41	1 ± 0	121 ± 2	340 ± 16	915 ± 124	1 ± 0	149 ± 11	400 ± 28	1172 ± 166
3-Methylphenanthrene	192	2 ± 1	17 ± 3	47 ± 11	149 ± 31	1 ± 0	114 ± 14	319 ± 38	850 ± 156	1 ± 0	126 ± 24	326 ± 47	934 ± 160
∑Methylphenanthrene	192	7 ± 3	70 ± 15	218 ± 41	668 ± 157	2 ± 2	640 ± 35	1804 ± 67	4957 ± 731	2 ± 2	530 ± 34	1448 ± 144	4122 ± 581
Anthracene*	178	1 ± 0	49 ± 13	159 ± 41	482 ± 165	0 ± 0	2 ± 1	4 ± 1	42 ± 54	0 ± 0	22 ± 1	70 ± 2	220 ± 10
2-Methylanthracene	192	0 ± 0	8 ± 2	25 ± 6	78 ± 18	blq	blq	blq	32 ± 8	blq	blq	blq	409 ± 32
9-Methylphenanthrene +	2 - 102	1 ± 0	14 ± 4	40 ± 12	165 + 56	1 ± 0	282 ± 20	709 ± 42	2226 ± 204	1 ± 0	127 ± 20	260 ± 85	000 ± 206
Methylanthracene	192	1 ± 0	14 ± 4	49 ± 12	103 ± 30	1 ± 0	263 ± 29	190 ± 42	2220 ± 394	1 ± 0	137 ± 20	300 ± 83	990 ± 200
Dibenzo[b,d]thiophene	184	2 ± 3	11 ± 1	34 ± 5	102 ± 26	0 ± 0	443 ± 8	1161 ± 18	3489 ± 208	0 ± 0	54 ± 3	166 ± 11	546 ± 54
2,1-Dibenzonaphthothiophene	234	5 ± 3	52 ± 26	156 ± 70	472 ± 230	0	66 ± 1	194 ± 9	588 ± 30	0	56 ± 4	186 ± 8	573 ± 36
Fluoranthene*	202	3 ± 3	130 ± 28	523 ± 182	1782 ± 353	2 ± 1	2 ± 2	1 ± 1	15 ± 17	2 ± 1	17 ± 1	44 ± 2	145 ± 18
Pyrene*	202	3 ± 3	112 ± 24	447 ± 160	1496 ± 311	2 ± 0	13 ± 2	18 ± 2	73 ± 28	1 ± 0	80 ± 3	227 ± 19	709 ± 64
Benzo[a]anthracene*	228	1 ± 0	171 ± 75	581 ± 221	1671 ± 763	0	4 ± 1	14 ± 2	49 ± 28	0	57 ± 4	172 ± 11	543 ± 29
Chrysene + Triphenylene*	228	1 ± 0	215 ± 91	744 ± 290	2144 ± 1032	blq	30 ± 1	98 ± 4	320 ± 62	blq	108 ± 8	336 ± 21	1073 ± 79
Benzo[b+j+k]fluoranthene*	252	2 ± 1	273 ± 72	868 ± 220	2740 ± 674	2.4	6 ± 0	20 ± 1	66 ± 7	2.4	32 ± 2	110 ± 8	363 ± 18
Benzo[e]pyrene	252	1 ± 0	109 ± 29	346 ± 86	1084 ± 286	blq	17 ± 0	52 ± 1	160 ± 10	blq	56 ± 3	173 ± 11	536 ± 26
Benzo[a]pyrene*	252	1 ± 0	118 ± 33	373 ± 95	1168 ± 346	0 ± 0	blq	4 ± 1	17 ± 3	0 ± 0	blq	108 ± 6	342 ± 10
Indeno[1,2,3-cd]pyrene*	276	0 ± 0	123 ± 41	349 ± 89	1188 ± 265	blq	blq	blq	blq	blq	blq	blq	blq
Benzo[g,h,i]perylene*	276	0 ± 0	87 ± 27	268 ± 67	893 ± 191	0 ± 0	blq	12 ± 0	42 ± 12	0 ± 0	blq	146 ± 10	481 ± 12
Benzo[g,h,i]perylene*	276	1 ± 0	37 ± 9	121 ± 27	390 ± 83	0 ± 0	blq	5 ± 1	13 ± 1	0 ± 0	blq	56 ± 4	172 ± 14
Dibenzo[a,h]+[a,c]anthracene*	278	2 ± 2	32 ± 11	108 ± 43	301 ± 106	0.3	blq	3 ± 1	11 ± 1	0.3	blq	34 ± 2	113 ± 6
Sum of parent PAHs		34 ± 6	1670 ± 448	5532 ± 1383	17305 ± 4798	33 ± 26	1053 ± 63	2739 ± 231	8335 ± 854	39 ± 30	880 ± 28	2558 ± 169	8082 ± 305
Sum of total PAHs	<u>.</u>	55 ± 12	1763 ± 468	5816 ± 1433	18151 ± 4983	40 ± 29	2572 ± 96	6726 ± 278	19574 ± 1945	47 ± 33	1633 ± 71	4663 ± 360	14317 ± 813

Table 26. (Supplementary data) Target compounds $(ng.g^{-1})$ measured in spiked-food with three aromatic fractions (PY, BAL, HFO) during parental exposures. Values are means \pm standard deviation (SD) (N=4-7) and values without SD indicate the compound was identified in one sample.

* Priority contaminants selected by the US Environmental Protection Agency (EPA)

blq : below limit of quantification

2.4. Biological analysis

2.4.1. Hatching and developmental abnormalities

Sublethal endpoints were recorded as described in Lammer et al. (2009) and Perrichon et al. (submitted). Hatching success was daily monitored. Biometric analysis (standard length, whole body and yolk sac surface) and abnormalities were recorded in each Solvent Control and PAH-exposed group. Five categories of abnormalities were scored: 1- Edemas formation (brain, pericardia, yolk sac); 2- Skeletal deformities (scoliosis, lordosis, tail bud deformities); 3- Craniofacial deformities (jaw, development of eyes, head deformities); 4- Cardiac deformities (anemia, hemorrhage, atrium/ventricle size, blood circulation heart position); 5- Yolk sac malabsorption. Moreover, a scoring matrix (score of 0-3) was applied following occurrence and severity of these abnormalities: (0) healthy larvae, (1) one abnormality or mildly-affected larvae, (2) two abnormalities or moderately affected larvae, (3) three abnormalities or more or severely affected larvae. Results were expressed in percentage.

2.4.2. Impact on behavioral: PhotoMotor Response

PhotoMotor Response on 120 hpf larvae were monitored, following the procedure described by Péan et al. (2013) with modifications by Perrichon et al. (submitted). Briefly, locomotor activity of larvae was recorded during a light/dark change challenge in a temperature-controlled box (28 ± 0.5 °C). Recording includes three periods of 5 min: 5 min Light On (1), 5 min Dark (D) and 5 min Light On (2). Video analyses were performed with Ethovision XT 8.5 software (Noldus, The Netherlands). The behavioral performances of larvae were assessed by measuring the swimming distance (cm) during these three periods. This distance is calculated considering the center point of the larvae between two consecutive X-Y coordinates summed over a 5-min periods.

2.4.3. Effects on cardiac activity

Cardiac activity was recorded at 28 ± 0.5 °C on 120 hpf larvae. Larvae were introduced in 1 mm wide lines molded in agarose (2 %), immobilized with 3 % methylcellulose and positioned in a lateral view. An acclimation of 2 hours was performed before analysis in order to stabilize heartbeat. Heart area of each fish was recorded under an inverted microscope (Olympus SZX9, 40x) coupled to a camera (DMK 31AU03, The Imaging Sources, Germany) and to IC Capture 2.2 software (The Imaging Sources, Germany). Larvae were placed under the microscope for two minutes before recording their heartbeat in order to acclimatize them to the light microscope. For each larvae, three successive movies of 30 seconds were acquired. Video analysis was performed in three successive processing steps: i) A video conversion was made in images stack to greyscale using VirtualDub 1.9.11 software (http://www.virtualdub.org/). The amount of 450 images were extracted per 30 seconds of video; ii) An images analysis was made using ImageJ software (Schneider et al., 2012), focusing on two ROIs (Regions Of Interest) manually delimited and corresponding to atrium and ventricle, both cardiac chambers. The integrated analysis of grey intensity was performed for each image in both ROI previously converted in order to calculate the alternate circulation between both chambers; and iii) Calculation of cardiac frequency for both chambers from a Single Spectrum (Fourier) analysis was made on integrate data of grey intensity with Statistica 9.0 software (StatSoft, USA). Cardiac frequencies were then corrected to obtain data expressed in beat.min⁻¹.

2.4.4. EROD activity

EROD activity as indicator of phase I biotransformation activity was determined following procedure described by Perrichon et al. (submitted). To summarize, these activity measurements were performed on 96 hpf larvae which were incubate in 7-ethoxyresorufin for 5 hours. Levels of formed resorufin into gastrointestinal cavity were observed by fluorescence microscopy (excitation/emission, 560 nm/580 nm) and quantified from image analysis software ImageJ (Schneider et al., 2012) coupled with HeatMap Histogram *plugin* (Péan S., http://www.samuelpean.com/heatmap-histogram/). Fluorescence results were expressed in integrated density of pixels (arbitrary unit).

2.4.5. DNA integrity of the offspring

DNA strand break measurements by the alkaline comet assay were performed on 24 hpf embryos. Pools of five dechorionated embryos for four samples per concentration were digested with 1 mg.mL⁻¹ of phosphate-buffered saline 1X/collagenase IV from *Clostridium histolyticum* (PBS 1X, 137 mM NaCl · KCl 2.7 mM · Na₂HPO₄ 10 mM · KH₂PO₄ 1.8 mM,

pH 7.4, Sigma-Aldrich, Germany) solution during 45 minutes at room temperature. Cells suspension was filtered through 48 μm gauze into a 1.5 mL reaction tube in order to separate individual cells from tissue debris. Following a centrifugation for 10 minutes at 2300 rpm at room temperature, cells pellet was resuspended with 30 μl of PBS. The viability of the dissociated embryo cells was evaluated by a trypan bleu exclusion test. Then, the comet assay was performed as described by Akcha et al. (2003). For each samples, two slides were prepared. DNA was stained with 70 μL of GelRedTM solution (1/10000) for one hour at 4 °C in the dark. Slides were analyzed using a fluorescence microscope (Olympus BX60, 400x) coupled to a Luca-S EMCCD camera (AndorTM technology, Northern Ireland) and imaging analysis software (Komet 6.0, AndorTM Technology, Northern Ireland). Genotoxic assessment was assessed by measuring the DNA percentage in the comet tail (50 cells per slides).

2.4.6. Gene expressions

Larvae were sampled at 96 hpf and stored in RNA Later (Sigma-Aldrich) at -20 °C until used. Total RNA were extracted on 20 pooled larvae using Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions with chloroform/ethanol purifications. Total RNA concentration extracted was quantified by spectrophotometry at 260 nm. Furthermore, purity of RNAs was verified by measuring the A260/A230 nm and A260/A280 nm ratios and by electrophoresis on a 1.8 % agarose gel with ethidium bromide staining. To remove the possibility of genomic DNA contamination, RNA sample was digested by RNase-free DNase I (Promega Madison, USA) and then purified.

Then, a reverse transcription of RNA was performed. First-strand cDNA was synthetized from total 1 μ g RNA using reaction mix including 500 ng of oligo(d_T)15, 250 ng of random hexamer primers (Promega, Madison, USA), 10 mM of deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) solutions to a final volume of 10 μ l. The reaction was initiated using M-MLV Reverse Transcriptase 5X (Promega, Madison, USA) following manufacturer's instructions. Reaction was incubated for 1 h at 42 °C in an Eppendorf Mastercycler and inactivated by heating for 15 min at 70°C. The cDNA mixture was stored at – 20°C until a real-time PCR analysis.

PCR primers were designed with Primer3 software (Rozen and Skaletsky, http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/). The accession numbers of the 11 genes used in our study and the corresponding primers are reported in Table 27. Real-time PCR reactions were performed in sterile 96-wells PCR plates with StepOnePlusTM instrument (Applied

Biosystems®, Life Technologies USA) following the manufacturer's instructions. Quantification procedure was based on fluorescence of reaction mixture which related to double-stranded DNA. This reaction mixture included Fast SYBR® Green Master Mix 5X (Applied Biosystems®, USA), 2.4 μ L of primers at 600 nM (Eurofins MWG Operon, Germany), 5.6 μ L of Milli-Q water and 2 μ L of cDNA. Thermal cycling conditions were: enzymatic activation during 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles including denaturation (95 °C, 15 s), annealing (60 °C, 40 s) and synthesis (72 °C, 30 s). Gene's expression levels were quantified from the threshold cycle (CT) number and normalized to four housekeeping genes: *eef1*, $\beta actin$, *b2m*, *gapdh* for samples providing from pyrolytic fraction and *eef1*, $\beta actin$, *gapdh* and *g6pd* from BAL and HFO fractions.

2.4.7. PAH-metabolites analysis in larvae

Larvae were sampled at 120 hpf and stored -80 °C until used. Metabolites were extracted on 50 pooled larvae and three replicates per concentrations. Larvae were manually homogenized in 3-4 mL of sodium acetate buffer (pH 5.0). An enzymatic deconjugation was performed during 16 hours at 37 °C after addition to 20 μ L of beta-glucuronidase enzyme from *Helix pomatia-2* (\geq 100 000 units.mL⁻¹, Sigma-Aldrich, Germany) using method adapted to Mazéas and Budzinski (2005). Prior to PAH-metabolites extraction, internal standards solution was added to samples. Metabolites were extracted by Solid-Phase Extraction (SPE) procedure using octadecyl cartridge (500 mg, 3 cc, Bakerbond C₁₈-SPE) and eluted in 100 % methanol solvent. After re-concentration of organic extracts with gas nitrogen, samples were purified by SPE using amino-column (500 mg, 3 cc, Supelco NH₂-SPE) and eluted with dicholoromethane/methanol solution (80/20, v/v). After another re-concentration step with gas nitrogen, PAH-metabolites (hydroxy-PAH, OH-PAH) extracts were analyzed by Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS) analysis as described in Le Dû-Lacoste et al. (2013). PAHs concentrations are reported as ng OH-PAH.g⁻¹ larvae.

Target gene	Name	Accession Number	Primer $(5' \rightarrow 3')$
gapdh	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	BC083506	GTGGAGTCTACTGGTGTCTTCa/GTGCAGGAGGCATTGCTTACAb
eef1	eukaryotic elongation factor 1	NM_131263.1	CAGCTGATCGTTGGAGTCAAa/TGTATGCGCTGACTTCCTTGb
g6pd	glucose-6-phosphate dehydrogenase	BM_182602	GTCCCGAAAGGCTCCACTCa/CCTCCGCTTTCCTCTCb
b2m	beta-2-microglobulin	BC062841	GGAAAGTCTCCACTCCGAAAGa/GTGAAGGCAACGCTCTTTGTb
βactin	beta-actin	NM_131031	CCCAGACATCAGGGAGTGATa/CACAATACCGTGCTCAATGGb
cyp1A	cytochrome P4501A	BC094977	GACAGGCGCTCCTAAAACAGa/CTGAACGCCAGACTCTTTCCb
ahr2	aryl hydrocarbon receptor 2	NM_131264	GCCTGGGATAAAGGAGGAAGa/CAGCTCCACCTGTCCAAATb
cat	catalase	NM_130912	CGCTTCTGTTTCCGTCTTTCa/CCCTGAGCATTGACCAGTTTb
sod(Cu/Zn)	Cu/Zn-superoxide dismutase	BC055516	GTTTCCACGTCCATGCTTTTa/CGGTCACATTACCCAGGTCTb
sod(Mn)	Mn-superoxide dismutase	CB923500	GGCCAAGGGTGATGTGACa/ACGCTTTATGGCCTCCAACb
gpx4	glutathione peroxidase 4	NM_001007282.1	AGGATCCAAGTGTGGTGGAGa/GGGGTTTCCAAACAAACCTTb
p53	bcl-2-binding component 3	NM_131327.1	GCTTGTCACAGGGGTCATTTa/ACAAAGGTCCCAGTGGAGTGb
Bax	bcl-2-associates X protein	AF231015	GGAGATGAGCTGGATGGAAAa/GAAAAGCGCCACAACTCTTCb

Table 27. Specific primer sequences for the 13 target genes measured by real-time PCR.

Forward primer^a/Reverse primer^b

2.4.8. Statistical analysis

Sampling procedure of chemical and biological analysis was reported in Table 28. Statistical analyses were performed using Statistica 9.0 software (StatSoft, USA). Results are expressed as means ± standard error of means (SEM) corresponding to experimental groups. A logarithm transformation was performed on comet assay data for normalization (Zar, 2010). The assumption of normality (Shapiro-Wilk tests) and homoscedasticity of variance (Levene tests) were verified. Biological data were analyzed by a one-way analysis of variance (ANOVA) in order to assess significant effects between tested concentrations for each treatment (PY, BAL, HFO). When only two concentrations were tested, a student t test was performed. For PAH-metabolites analyses, normality and homoscedasticity were not validated; therefore a non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney test were performed.

Behavioral data for PY treatment were analyzed using a one-way repeated measure ANOVA (R-ANOVA) with exposure concentrations as a dependent factor and light (Light On(1), Light Off and Light On(2)) as a within factor. A post-hoc Newman Keuls test was performed each time a difference was found significant. For behavioral data of BAL and HFO treatments, normality and homoscedasticity were not validated; therefore a non-parametric Mann-Whitney tests were used. In order to test significant differences between three challenge periods, Kruskal-Wallis tests were conducted with multiple pairwise comparisons.

Gene expressions were analyzed with a Relative Expression Software Tool REST-2009© (Qiagen, http://www.REST.de.com). The gene expression level was given in relative expression ratio compared to the control condition.

The significance of the results was ascertained at α =0.05.
				Concentrations				
Sampling point	Endpoints	Treament	Solvent Control	0.3X	1X	3X		
48-96 hpf	Hatching success	PY	296(3)	323(5)	552(5)	20(1)		
		BAL	2216(9)	521(7)	258(7)	nsa		
		HFO	620(6)	596(6)	4(1)	nsa		
96 hpf	Morphological analyses	PY	190(4)	172(5)	175(5)	nsa		
		BAL	75(3)	60(3)	17(1)	nsa		
		HFO	85(4)	85(4)	nsa	nsa		
120 hpf	PMR analyses	PY	140(5)	100(4)	76(2)	39(3)		
		BAL	37(3)	35(3)	nsa	nsa		
		HFO	115(3)	90(3)	nsa	nsa		
120 hpf	Heartbeat	PY	35(3)	52(3)	48(3)	26(1)		
		BAL	21(2)	24(2)	22(2)	nsa		
		HFO	15(2)	23(2)	nsa	nsa		
96 hpf	EROD activity	PY	40(2)	32(2)	40(2)	nsa		
		BAL	58(3)	47(3)	26(3)	nsa		
		HFO	60(2)	34(2)	nsa	nsa		
24 hpf	Comet assay	PY	5(4)*	5(4)*	5(4)*	nsa		
		BAL	5(3)*	5(3)*	5(3)*	nsa		
		HFO	5(3)*	5(3)*	nsa	nsa		
96 hpf	Gene expression (RT-PCR)	PY	20(8)*	20(3)*	20(6)*	20(5)*		
		BAL	20(8)*	20(8)*	20(4)*	nsa		
		HFO	20(8)*	20(8)*	20(4)*	nsa		
120 hpf	PAHs metabolites	PY	50(3)*	50(3)*	50(3)*	50(3)*		
		BAL	50(3)*	50(3)*	nsa	nsa		
		HFO	50(3)*	50(3)*	nsa	nsa		

Table 28. Number of total individuals sampled for different chemical and biological analysis. The number into brackets corresponds to the number of spawning events used as replicates. The Comet assay was realized from one spawning event, the replicate number corresponds to analysis replicates.

* Individuals pooled for analysis; nsa: no sample available.

3. Results and Discussion

Following 6 months of genitor exposure to the three aromatic fractions (PY, BAL and HFO), PAHs-metabolites were detected in whole larvae of the F_0 generation showing a parental transfer has occurred (Vignet et al., submitted). The mean number of spawning events and batch fecundity obtained from these exposed-genitors were also reported by these authors. Genitor's reproduction of 3X concentrations for the three treatments was severely impaired. Similar results were recorded in 1X concentrations for fish exposed to BAL and HFO aromatic fractions. These complex mixtures have direct consequences on eggs production with no eggs or small number eggs obtained for these concentrations. Consequently, analyses on the offspring were not possible in the case of any egg production. For samples with an insufficient number of eggs, statistical analyses have not been performed and thus the results were given on an indicative basis.

3.1. Morphological impairments in offspring larvae (F1 generation)

No hatching delay was observed in offspring larvae whatever the nature and the concentration of the PAH extract tested. Hatching rates in offspring larvae from PY and BAL exposed genitors were not significantly different whatever the tested-concentrations (Fig. 37A, 37B) (P>0.05). Statistical analyses revealed a decrease in the hatching rate (2.0-fold) in larvae from HFO-0.3X genitors compared to the Solvent Control group (P<0.001) at the first hatching day (48 hpf) (Fig. 37C). However, no significant difference was recorded the following days, with hatching rates averaging 100 %. Regarding these last results, it should be noted that this decrease observed at 48 hpf, did not probably lead to the PAHs parental transmission but only to the hatching process unsynchronization in zebrafish (Kimmel et al., 1995). Only one spawning was obtained from HFO-1X exposed-genitors, consequently statistical analysis was not possible. Data are thus represented on an indicative basis. Therefore, our results did not showed any alteration of hatching success in the first generation offspring from exposed-genitors to three PAHs complex mixtures. In spite of the fact that relatively few studies reported results about PAHs transmission to offspring generation, Hose et al. (1981) have however demonstrated a reduction of hatching success in offspring eggs after BaP injection in sexually mature flatfish gonad. Similarly, Hall and Oris (1991) have reported that maternally transferred anthracene reduced hatching success in offspring eggs of fathead minnows (*Pimephales promelas*). In addition, Nagler and Cyr (1997) have proved a significant decline in number of hatched larvae because of sperm quality alteration from male American plaice (*Hippoglossoides platessoides*) exposed to contaminated sediment.



Figure 37. Hatching kinetic in 120 hpf offspring larvae originating from (A) PY, (B) BAL and (C) HFO-exposed genitors. Values are means \pm SEM, nd = no data available. Letters denote significant differences between concentrations at different hatching times (P<0.05).

Biometric measurements in offspring larvae originating from PY, BAL and HFO fractions-exposed genitors are presented in Table 2. Offspring larvae from PY-0.3X treatment were slightly longer than Solvent Control and PY-1X larvae (P<0.001 both). Yolk sac surface and ratio yolk sac/whole body surfaces of larvae from 0.3X and 1X concentrations was slightly reduced compared to Solvent Control larvae (P<0.001 both). Larvae originating from

HFO-0.3X genitors were slightly longer than Solvent Control larvae (P<0.001). No significant difference in yolk sac surface, in ratio yolk sac/whole body surfaces were detected in these offspring larvae (P>0.05). In addition, Table 2 gives a summary of abnormal larvae proportions and abnormalities details and their associated-severity in larvae. No significant morphological abnormalities were recorded between tested-concentrations compared to Solvent Control whatever the parental treatment (P>0.05). Abnormal individuals (and mainly mild-affected) ranged from 3.34 to 11.1 % for PY offspring larvae, from 21.9 to 25.9 % for BAL offspring larvae and from 18.0 to 19.8 % for HFO offspring larvae. Taken together, these results showed that PAHs transmitted from the genitors induced some biometric impairment. However, the toxic action of PAHs transmitted following these treatments will be not sufficiently important to induce edemas, skeletal, craniofacial deformations in offspring larvae. These results are in accordance with those of Nye et al. (2007) who demonstrated that offspring larvae from contaminant-exposed mothers were longer with smaller yolk sacs than larvae produced by unexposed mothers. From those results, two hypothesis were proposed to explain these differences in size : i) spawning event from contaminant-exposed mothers took place earlier or ii) a faster development in offspring embryos which will consume more yolk reserves compared to reference embryos. In the present study, development of offspring embryos was assessed during 96 hpf, from 30 min after spawning and no growth delay were recorded whatever the parental treatment considered. In addition, a greater number of hatched larvae would be then observed earlier. Therefore, the first hypothesis is unlikely. Thus, a greater consumption of nutritional reserves in offspring larvae from exposed-genitors is possible to offset potential physiological failure before hatching leading to a faster development, which would explain longer larvae at 96 hpf. Survival time in starved offspring larvae during 15 dpf was not assessed in the present study, but this parameter will be determinant to assess this potential consumption of reserves, therefore the resistance to starvation. A reduced resistance ability of larvae to starvation could lead to a decline of fish population.

		PY			BAL		H	IFO
	Solvent	0.3 X	1 X	Solvent	0.3 X	1 X	Solvent	0.3 X
	N=4; n=190	N=5; n=172	N=5; n=175	N=3; n=75	N=3; n=60	N=1; n=17	N=4; n=85	N=4; n=85
Standard length (mm)	3.58 ± 0.009^a	3.63 ± 0.009^{b}	3.57 ± 0.012^a	3.55 ± 0.018^a	3.57 ± 0.022^a	3.61	3.48 ± 0.023^a	3.59 ± 0.014^{b}
Yolk sac surface (mm ²)	0.26 ± 0.002^a	0.24 ± 0.002^{b}	$0.25 \pm 0.002^{\circ}$	0.27 ± 0.0026^{a}	0.27 ± 0.006^{a}	0.32	$0.28\pm0.005^{\mathrm{a}}$	0.29 ± 0.003^a
Ratio Yolk sac/Whole larval surfaces	0.229 ± 0.001^{a}	0.213 ± 0.001^{b}	$0.216 \pm 0.002^{\circ}$	0.224 ± 0.004^{a}	0.224 ± 0.005^{a}	0.265	0.241 ± 0.004^{a}	0.236 ± 0.002^{a}
Abnormal individuals (%)	6.34 ± 1.58^{a}	11.1 ± 2.20^{a}	$8.48\pm3.03^{\mathrm{a}}$	21.9 ± 2.01^{a}	25.9 ± 2.26^{a}	0.00	$19.8 \pm 5.13^{ m a}$	18.0 ± 3.50^{a}
Severity of abnormality (Scoring/3) (%):								
No affected (Score 0)	93.7 ± 1.58	88.9 ± 2.20	91.5 ± 3.03	78.1 ± 2.01	74.1 ± 2.26	100.0	80.3 ± 5.13	81.0 ± 4.25
Mild (Score 1)	5.24 ± 1.63	9.12 ± 2.07	5.28 ± 2.04	18.9 ± 0.86	17.4 ± 1.00	0.00	14.8 ± 3.88	19.0 ± 4.25
Moderate (Score 2)	1.10 ± 0.55	1.35 ± 0.72	2.90 ± 1.04	3.00 ± 1.15	6.15 ± 1.48	0.00	2.50 ± 1.25	0.00 ± 0.00
Severe (Score 3 or more)	0.00 ± 0.00	0.67 ± 0.48	0.30 ± 0.21	0.00 ± 0.00	2.30 ± 1.80	0.00	2.50 ± 1.30	0.00 ± 0.00
Abnormalities among abnorma individuals (%):	ıl							
Edemas	2.19 ± 1.09	1.10 ± 0.59	0.94 ± 0.67	8.67 ± 1.47	6.87 ± 2.65	0.00	14.4 ± 6.41	10.3 ± 5.14
Axial Skeleton	1.46 ± 1.10	8.47 ± 1.74	4.58 ± 1.80	7.29 ± 0.40	12.3 ± 6.81	0.00	1.44 ± 0.72	7.72 ± 2.39
Craniofacial	2.09 ± 0.73	0.79 ± 0.57	2.21 ± 0.92	2.50 ± 0.96	1.15 ± 0.88	0.00	1.44 ± 0.72	0.00 ± 0.00
Cardiovascular	0.00 ± 0.00	0.80 ± 0.40	0.40 ± 0.03	0.00 ± 0.00	2.30 ± 1.77	0.00	1.00 ± 0.75	0.00 ± 0.00
Yolk sac Malabsorption	0.60 ± 0.30	0.00 ± 0.00	0.37 ± 0.27	3.43 ± 2.64	3.24 ± 1.83	0.00	1.50 ± 1.13	0.00 ± 0.00

Table 29. Developmental endpoints for assessing toxicity and teratogenicity of three aromatic fractions (PY, BAL, HFO) on 96 hpf offspring larvae from contaminated-genitors. Biometric values are means \pm SEM.

Letters denote significant differences between experimental group (P<0.05).

3.2. Behavioral disruptions in offspring larvae (F1 generation)

Behavioral responses were analyzed in order to assess the potential developmental neurotoxic effects of parental transmission. These responses were currently used to assess the toxicity of various compounds through the analysis of swimming capacity, stress-regulating systems and motor responses (perception and reaction) to stimuli (Champagne et al., 2010; Drapeau et al., 2002; de Esch et al., 2012; Linney et al., 2004). Figure 38 presents the measurements of distance moved per 5-min intervals in offspring larvae from PY, BAL and HFO-exposed genitors following light/dark challenge. Whatever the tested-aromatic fraction, response patterns of offspring larvae were similar, dissociating three swimming activity phases as reported in literature: i) basal swimming activity phase (Light On(1)), ii) challenge phase (Light Off) leading to an increasing swimming activity and iii) the recovery phase (Light On(2)) when light turned on again, where swimming activity was comparable to the one observed in the basal phase (Kokel et al., 2010; MacPhail et al., 2009; Padilla et al., 2011). The swimming activity of larvae from PY-3X genitors was significantly higher than the others concentrations during both light periods (P<0.05) (Fig. 38A). Our results clearly demonstrated hyperactivity for 3X offspring larvae from PY-exposed genitors during all behavioral challenge. The ability of these larvae to swim a greater distance could be due to longer size and/or a possible neurotoxic stimulation of transferred-pyrolytic mixture. The distinct lack of morphological data for this condition did not support the first hypothesis. Furthermore, results obtained in PY-0.3X offspring larvae did not reflect these findings. While these larvae had a high swimming activity, these results show firstly a high level of basis stress, a least tolerance in stress period and a least stress recovery. Regarding offspring larvae from BAL-0.3X genitors (Fig. 38B), while no significant difference was observed in basal swimming activity phase, their PMR pattern tended to be similar that PMR pattern in PY-3X larvae (P>0.05). Indeed, these larvae showed a significant increase of distance moved during recovery phase (Light On(2), P=0.01). Furthermore, this BAL fraction was early neurotoxic for offspring larvae than PY fraction effect (from 0.3-fold environmental concentration against 3-fold for PY fractions). Regarding HFO treatment (Fig. 38C), PMR of 0.3X offspring larvae was significantly reduced during all light/dark challenge compared to Solvent Control larvae (Light On(1): P<0.001, Light Off: P=0.002, Light On(2): P<0.001). Their behavioral responses were in total opposition with those of PY and BAL larvae, where 0.3X offspring larvae displayed a significant early hypoactivity whatever swimming activity

phase. No data were available for 1X and 3X concentrations in both BAL and HFO offspring larvae. According to current understandings, that is the first study of behavioral assessing of complex PAHs mixtures in the offspring of contaminated fish and relatively few studies dealt with the impact of organic pollutant on the fish PMR. Therefore, we can directly compare effects with those reported in literature. However, using similar approach, Péan et al. (2013) have reported a stimulation of this PMR in offspring zebrafish larvae originating from fish contaminated to polychlorinated biphenyls. Their results proved that a potential transmission of organic pollutants may alter neurotoxic development of offspring. Recently, our previous studies have reported a reduction of basal swimming activity and response to light stress in ELS of zebrafish and an increase in Japanese medaka following sediment contact exposures with two unique PAH, fluoranthene (3-benzenic rings PAH) and benzo[a]pyrene (5-benzenic rings PAH) respectively (Perrichon et al., submitted). A reduction of swimming activity behavioral pattern was equally recorded in Japanese medaka after exposure to benzo[a]anthracene (4-benzenic rings) (Le Bihanic et al., submitted). The present study demonstrated a parental influence in neurotoxic behavior of their offspring of which their visual acuity, their hunting behavior or their escape response to predation could be really reduced (Gonçalves et al., 2008).



Figure 38. Behavioral performance in 120 hpf offspring larvae originating from (A) PY, (B) BAL and (C) HFO-exposed genitors following light/dark challenge. Values are means distance moved \pm SEM per 5-min intervals, nd = no data available. Lower and upper cases denote significant differences between concentrations and light/dark phases (Light On (1), Dark and Light On (2)) respectively.

3.3. Physiological disruptions in offspring larvae (F1 generation)

Behavior impairments observed previously may be caused by physiological alterations. Therefore, cardiac activity in 120 hpf offspring larvae from genitors exposed to three aromatic fractions was measured and represented in Fig. 39. While any morphological abnormalities (edemas, anemia, hemorrhages) were observed, a decrease of the cardiac activity was observed to be concentration dependent in larvae originating from PY genitors, with respectively 159, 165 and 148 heartbeats.min⁻¹ for 0.3X, 1X and 3X concentrations (P=0.01, P=0.03 and P<0.001). In contrast, heartbeat was not significantly different compared to Solvent Control respective in offspring larvae from BAL and HFO genitors. No data available for HFO-1X and BAL/HFO-3X. Cardiac frequencies recorded in Solvent Control larvae were consistent with those reported in literature at this development stage (Barrionuevo and Burggren, 2013).

Numerous studies have documented cardiac defects following PAHs exposure. The toxic action of unique predominant PAHs (from 3 to 5-benzenic rings PAHs) in cardiovascular system of zebrafish leading to mainly pericardial edema, blockage of blood circulation and bradycardia (Incardona et al., 2011, 2009, 2004). Reduction of heart rate have equally been reported in herring embryos and zebrafish embryos after respectively watersoluble fraction exposure of Alaska crude oil (Middaugh et al., 1998, 1996) and after sediment eluates/extracts exposure (Strmac et al., 2002). Recently, Milinkovitch et al. (2013; 2012) have recorded cardiac impairments in terms of contraction velocity and not contraction force following a water-soluble fraction exposure of crude oil in golden grey mullets (Liza aurata). These physiological responses (bradycardia) observed in PY offspring larvae could indicate metabolic disruptions (e.g. respiratory distress) and thus alter the fish fitness and survival (Claireaux et al., 2005). Our results are in agreement with those obtained by Lucas et al. (submitted) who assessed aerobic metabolic performance in offspring fish from PY-3X genitors. These authors have recorded a decrease of active metabolic rate in 2 months-old fish originating from exposed-genitors, reflecting thus earlier cardio-respiratory impairments. Taken together, the present results are in agreement with those of Davoodi and Claireaux (2007) who demonstrated that cardiac defects observed in sole (Solea solea) exposed to petroleum hydrocarbons induced a AMR reduced. A lack of data in others biological parameter did not allow to specifically conclude on potential PAHs transmission and toxicity effects in offspring for BAL and HFO treatments.



Figure 39. Cardiac activity in 120 hpf offspring larvae from PY, BAL, HFOexposed genitors. Values are means \pm SEM, nd = no data available. Letters denote significant differences between concentrations (P<0.05).

3.4. Genotoxic effects in offspring larvae (F₁ generation)

Genotoxic effects on offspring embryos and larvae following PAH exposure of genitors were investigated through the analysis of detoxification, oxidative processes and DNA damages. Whatever the tested-fractions (PY, BAL or HFO), no significant differences in levels of EROD activity were observed in 96 hpf offspring larvae as compared to Solvent Control respective (P>0.05) (Fig. 40). Similarly, comet assay did not reveal any significant differences (P>0.05) in the levels of DNA strand breaks measured earlier in 24 hpf offspring embryos from contaminated-genitors, whatever the tested-concentrations for PY, BAL and HFO fractions (Fig. 41). Unfortunately, no data were available for all 3X concentrations and HFO-1X. Furthermore, relative expressions of target genes compared to respective Solvent Control are presented in Table 30. Data obtained in larvae offspring were normalized to five housekeeping genes: *eef1*, *βactin*, *b2m*, *gapdh* and *g6pd*. No data were available for BAL-3X and HFO-3X. Regarding offspring larvae from genitors exposed to PY aromatic fraction, no significant expression change was revealed between all concentrations for genes involved in the detoxification (cyp1a, ahr2), antioxidant defense (gpx4a, cat, sod(Cu/Zn), sod(Mn)) and the apoptosis processes (p53, bax). Similarly, no significant differences in terms of detoxification (cyp1a, ahr2) processes were found 0.3X and 1X concentrations for BAL and

HFO compared to their respective Solvent Control (P>0.05). With regards to Sod(Mn), expression levels were 1.30-fold up-regulated in larvae offspring from BAL-1X genitors (P=0.006). Expression of gene encoding for gpx4 was 0.59-fold repressed in offspring larvae from HFO-1X genitors (P=0.018). The expression levels of others genes encoding for antioxidant defenses were not significantly different compared to Solvent Control. However, apoptosis processes appeared impacted in offspring larvae from BAL-0.3X genitors, with expression levels to 1.47-fold and 1.30-fold higher than Solvent Control for p53 and bax respectively (P=0.03 for both conditions). In contrast, no significant change in both genes was observed in 1 X offspring larvae. For offspring larvae from HFO-1X genitors, p53 levels was significantly up-regulated (P=0.03).



Figure 40. In vivo EROD activity in 96 hpf offspring larvae originating from PY, BAL and HFOexposed genitors. Values are expressed in response factor compared to respective Solvent Control, nd = no data available. No significant difference was observed (P>0.05).



Figure 41. DNA strand breaks levels in 24 hpf offspring embryos originating from (A) PY, (B) BAL and (C) HFO exposed genitors. Boxes denote SEM and vertical bars denote 95 % confidence interval, nd = no data available. No significant difference was observed (P>0.05).

	РҮ			E	BAL	HFO		
	0.3 X	1 X	3 X	0.3 X	1 X	0.3 X	1 X	
	N=3	N=6	N=5	N=	N=	N=	N=	
Housekeeping ge	enes							
eef1	1,122	1,038	1,039	0,912	0,879	0,905	0,944	
bactin	0,699	0,435	0,369	1,139	1,193	1,211	1,390	
b2m	0,727	0,875	0,952	nd	nd	nd	nd	
gapdh	1,225	1,101	1,011	1,044	0,839	0,869	0,869	
g6pd	nd	nd	nd	0,922	1,135	1,051	0,877	
Detoxification								
cyp1A	1,211 (0.829-1.846)	1,057 (0.720-1.465)	0,722 (0.471-1.062)	1,013 (0.735-1.311)	1,123 (0.804-1.687)	1,058 (0.749-1.858)	1,142 (0.909-1.486)	
ahr2	1,075 (0.911-1.240)	0,790 (0.663-0.929)	0,790 (0.689-1.012)	0,984 (0.740-1.326)	0,818 (0.511-1.321)	0,965 (0.781-1.244)	1,064 (0.990-1.170)	
Oxidative stress								
gpx4a	1,051 (0.881-1.218)	0,828 (0.683-1.034)*	0,895 (0.726-1.183)	1,147 (0.790-1.608)	1,329 (0.995-1.813)	1,075 (0.723-1.384)	0,588 (0.420-0.758)*	
cat	1,068 (0.833-1.321)	0,901 (0.750-1.064)	0,909 (0.746-1.122)	0,992 (0.893-1.120)	1,074 (0.893-1.216)	1,174 (0.867-1.616)	1,067 (0.908-1.266)	
sod(Cu/Zn)	1,149 (1.072-1.344)	0,937 (0.774-1.095)	0,982 (0.756-1.437)	1,132 (0.931-1.308)	1,072 (0.832-1.331)	1,328 (0.968-1.831)	0,845 (0.747-1.980)	
sod(Mn)	1,203 (1.010-1.429)	0,921 (0.745-1.164)	0,944 (0.706-1.336)	1,142 (0.991-1.294)	1,303 (1.126-1.551)**	1,292 (1.011-1.574)	1,146 (1.030-1.303)	
Apoptosis								
p53	1,034 (0.836-1.373)	0,765 (0.622-1.035)*	0,924 (0.547-1.447)	1,468 (1.036-2.027)*	1,371 (0.979-1.796)	1,607 (1.177-2.290)	1,665 (1.157-2.246)*	
bax	1,142 (0.906-1.441)	0,972 (0.761-1.206)	0,999 (0.815-1.321)	1,302 (1.075-1.613)*	1,303 (1.013-1.694)	1,384 (1.106-1.790)	1,421 (1.121-1.796)	
A	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		*	1 1				

Table 30. Relative mRNA expression (Standard Error) of target genes in 96 hpf larvae offspring from parental contamination to three aromatic fractions (PY, BAL, HFO).

Asterisks denote significant changes from respective controls (* p<0.05, ** p<0.01). nd : no data available

Taken together, these results showed no evidence of repairable or unrepairable DNA damage or potential activation of detoxification processes (ahr2, cyp1a, EROD) despite parental exposures to PAHs that are potential inducers of these activities. During a transgenerational study, Meyer et al. (2002) have also demonstrated that the first generation of killifish embryos, providing from parents exposed to PAH contaminated-sediment was refractory to *cyp1a* induction. Furthermore, fish have a high ability to biotransform PAHs, and are therefore able to eliminate a great part of these compounds (Aas et al., 2000; Budzinski et al., 2004; Jonsson et al., 2004). PAH-metabolites (OH-PAH) concentrations were then measured in offspring larvae in order to identify a parental contamination transmission. The hydroxynaphtalene (OH-N) and dihydroxybiphenyl (2-OH-Bi) were predominant metabolites excreted in offspring larvae from PY, BAL and HFO fractions (Table 31). Relatively low level of 1-hydroxypyrene (1-OH-Pyr) metabolite was equally present in larvae. However, metabolites amount were not statistically different between tested concentrations, from each origin fractions (P>0.05) which could explain the inactivation of detoxification and the absence of genotoxic effect and. Furthermore, among these PAHmetabolites measured, none are potentially genotoxic (Le Dû-Lacoste et al., 2013). The absence of detoxification processes activation and the metabolites levels demonstrated that PAHs or mainly its metabolites were not transmitted to the larvae offspring. The observed biological responses will probably due to phenotype genetically or epigenetically-transmitted.

Regarding toxicity associated to the three aromatic fractions, HFO fraction appeared to have a greater toxicity in terms of mortality induced, growth and reproductive disruptions, which induce a significant reduction of eggs production, followed by BAL and PY fractions (Vignet al., *personal communication*). Although HFO and BAL fractions were the most reprotoxic, only a narcotic effect appeared in offspring larvae of HFO-0.3X, which was not closely linked to cardiac activity or genotoxic impairments. Furthermore, the slight induction of p53 and bax involved in pro-apoptotic processes for both fractions, lead us to believe that processes of cellular reparation were induced to offset the potential detrimental effects, which might also explain the absence of genotoxic effects. Finally, regarding biological responses in the PY offspring, the present study showed toxic effects in the first generation of offspring, but we cannot correctly conclude about real nature of parental transmission.

Table 31. Metabolites compounds (ng.g-1) measured in 120 hpf offspring larvae. Concentration values are means \pm SEM (N=2-3) and values without SEM indicate the compound was identified in one sample.

	PY					BAL	HFO	
Metabolites	Solvent	0.3 X	1 X	3 X	Solvent	0.3 X	Solvent	0.3 X
Σ OH-Naphtalenes	22.9 ± 5.51	21.07 ± 1.89	8.47 ± 1.10	31.2 ± 7.5	65.0 ± 13.5	13.0 ± 3.43	87.0 ± 13.5	99.0 ± 13.6
2 OH-Biphenyl	22.7 ± 7.63	8.27 ± 0.92	9.22 ± 1.98	26.37 ± 4.74	14.4 ± 5.16	20.1 ± 4.13	23.1 ± 0.52	15.7
Σ OH-Phenanthrene	1.05	0.54 ± 0.19	blq	blq	0.2	blq	blq	blq
3 OH-Fluoranthene	blq	blq	blq	blq	blq	blq	blq	blq
1 OH-Pyrene	2.23 ± 0.08	3.61 ± 1.23	1.97 ± 0.68	1.65 ± 0.11	2.07 ± 0.40	blq	1.05	1.74 ± 0.34
1 OH-Chrysene	blq	blq	blq	blq	blq	blq	blq	blq
Σ OH-Benzo[a]pyrenes	blq	blq	blq	blq	blq	blq	blq	blq
Σ ΟΗ-ΗΑΡ	48.3 ± 24.2	33.3 ± 4.19	19.7 ± 2.43	59.2 ± 12.2	80.8 ± 15.2	33.1 ± 5.98	102.7 ± 19.5	106.0 ± 17.9

No significant differences between experimental group (P>0.05). Blq : below limit of quantification.

4. Conclusion

While early reproduction alteration leading to a notable lack of eggs under environmentally relevant conditions, our study demonstrated that long-term and chronic dietary exposures of zebrafish to PAHs mixtures (from their first meal) led to impairments in their first offspring generation. Using a multiscale approach of toxicity endpoints, the present study reported some disruptions at individual level in terms of morphology, behavior and physiology which could have adverse consequences on survival and recruitment and therefore on the population. It appears surprising that these effects were not related to bioactivation of processes involved in detoxification, oxidative stress or DNA damage which can be expected to explain a major part of these disruptions. A supplementary focus on underlying mechanisms of lipid peroxidation should be performed in order to identify potential disruptions energetic mechanisms. Similarly, metabolic hormones (e.g. cortisol) should be analyzed in order to validate these biological responses, which are potentially released into nutritive yolk sac during ontogenesis closely associated to female condition. Furthermore, the lack of data and experiments in the literature compels us to be cautious in our conclusions.

Acknowledgments

Financial support for PhD grant was received by PP from both the Conseil Général de Charente Maritime and the Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (Ifremer). This work was supported by the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR), program "Contaminant, Ecosystème et Santé", in the frame of the ConPhyPoP (2009-002) research project and CPER A2E. This project is co-financed by the European Union with the European fund of regional development. Authors acknowledge the CEDRE for providing crude oils necessary to the extraction of aromatic fractions. J. Lucas, L. Lyphout and C. Vignet are acknowledged for help in the zebrafish breeding maintenance, L. Joassard for performing the qPCR analyses and D. Leguay is acknowledged for technical support of zebrafish behavioral assays. This study was conducted under the approval of Animal Care Committee of France under the official licence of Marie-Laure Bégout (17-010).



CONCLUSION GÉNÉRALE PERSPECTIVES

1. Conclusion générale

L'introduction constante de polluants dans l'environnement par les activités anthropiques peut représenter un sérieux risque pour la santé humaine et l'environnement. En effet, la santé et l'équilibre des systèmes naturels sont essentiels au maintien de la vie et au fonctionnement de la société. Au vu de l'importance des ressources naturelles, le besoin de les protéger est devenu alors une véritable préoccupation sociétale. Pour cela, de nombreuses mesures législatives et réglementaires ont été adoptées dans les pays européens et d'autres pays développés (e.g. États-Unis, Chine). Sur le continent nord-américain, l'agence fédérale de la protection environnementale (US-EPA) est en charge d'établir et de développer les pratiques réglementaires d'évaluation des risques environnementaux. En Europe, la responsabilité est donnée au Parlement et au Conseil Européens, pour être ensuite traduite dans le droit des États Membres. Dans un but de protéger la santé humaine et l'environnement, la réglementation REACH demande donc d'identifier de manière précoce les propriétés toxiques intrinsèques de substances chimiques anciennes ou nouvellement mises sur le marché. En parallèle, la DCE, une des plus importantes mesures de la législation européenne, définit une politique communautaire dans le domaine de l'eau, basée sur le concept de bon état des masses d'eau, depuis le milieu continental jusqu'au milieu marin et repose sur une double approche chimique et biologique. Bien que la législation environnementale soit une solution contre la menace de la pollution, elle nécessite d'apporter de nombreuses données toxicologiques sur les substances chimiques rejetées afin d'évaluer au mieux les risques potentiels. Dans ce contexte réglementaire d'évaluation de la qualité environnementale et en réponse à la demande sociétale de protéger les ressources, un effort a été mené dans le développement d'outils visant à évaluer les risques des substances polluantes (tels que les HAP) et réduisant au maximum l'utilisation d'animaux vivants. L'OCDE propose ainsi un certain nombre de tests qui permettent d'évaluer la toxicité aigüe ou chronique des molécules. De par les avantages que confère le modèle poisson zèbre (Danio rerio), l'utilisation de ses embryons et larves est actuellement grandissante dans les tests de toxicité.

Dans ce contexte, les objectifs de cette thèse étaient de développer des tests embryolarvaires afin d'évaluer la toxicité de mélanges de composés hydrophobes, ici, les HAP. Afin d'établir une meilleure compréhension mécanistique des effets toxiques, une approche « multimarqueurs » a été utilisée dans un but d'améliorer la sensibilité, l'applicabilité et la prédictibilité des tests traditionnels basé uniquement sur des critères morphologiques macroscopiques.

1.1. Voies d'exposition : synthèse et pertinence

1.1.1. Mise au point d'un sédiment artificiel

L'objectif premier de l'étude était d'évaluer la toxicité de fractions aromatiques de différentes origines via des expositions par voie sédimentaire. Le principe de la méthode est d'utiliser un sédiment « propre » (dépourvu de contamination) que l'on enrobe avec les composés à tester à l'aide d'un solvant comme vecteur d'enrobage. Le choix du sédiment s'est bien entendu porté, dans un premier temps, vers un sédiment naturel (sédiment Yville, site de référence de l'estuaire de Seine) en raison de sa pertinence écologique. En mars 2010, un sédiment naturel a été prélevé sur le site de référence d'Yville-sur-Seine afin de réaliser ces expérimentations. Le site est connu pour être faiblement contaminé en polluants organiques et métalliques (Cachot et al., 2007, 2006). Cependant, suite de nombreux tests de toxicité évaluant la reproductibilité de toxicité de composés connus, aucune des différentes expositions réalisées en parallèle chez le poisson zèbre et chez le médaka japonais n'a révélé des résultats reproductibles avec les études antérieures menées lors de thèses Daouk (2011) et de Vicquelin (2011). L'unique différence entre ces études était l'année de prélèvement des sédiments. A ce jour, les causes de ces différences et de la non-reproductibilité des tests de toxicité restent en suspens. Y a-t-il eu une modification en amont de l'architecture du sédiment naturel suite à un évènement naturel (e.g. crues) ? Y a-t-il eu une déstructuration et/ou une mauvaise conservation du sédiment suite au nouveau prélèvement ? Des analyses physico-chimiques (e.g. granulométrie, composition en matière organique) de ce sédiment devront être réalisées afin d'élucider les modifications potentielles de la structure du sédiment, lequel joue un important rôle dans l'adsorption de composés hydrophobes tels que les HAP. De plus, les questionnements sur la déstructuration du sédiment après prélèvement ont également été soulevés par plusieurs auteurs, portant un regard critique sur l'influence de la nature du sédiment sur les résultats (Lamberson et al., 1992; Luoma and Ho, 1992).

A ce jour, aucune méthode d'enrobage et/ou aucun test de toxicité par voie sédimentaire utilisant les embryons et les larves de poissons ne sont normalisés par l'OCDE. Dans l'objectif de standardiser un test de toxicité par voie sédimentaire et de remédier à cette variabilité obtenue avec un sédiment naturel, un sédiment artificiel a été créé sur la base des protocoles normalisés pour les tests chironomes OCDE 218. Bien qu'une des grandes limites à un sédiment artificiel soit la difficulté de simuler la complexité que peut représenter un sédiment naturel, ainsi que l'activité biologique associée aux microorganismes qu'il contient, il offre de nombreux avantages permettant de standardiser les tests de toxicité : i) l'absence de contamination intrinsèque, ii) une bonne caractérisation et un bon contrôle de la composition, iii) une composition reproductible et iv) l'absence d'une faune indigène susceptible de modifier les propriétés physico-chimiques du substrat (Allen Burton et al., 1996).

Plusieurs séries d'expériences ont donc été réalisées afin de composer un sédiment artificiel standard nécessaire aux tests de toxicité pour les deux espèces de poissons « modèles » : le poisson zèbre et le médaka japonais. La toxicité du benzo[a]pyrène et du fluoranthène ayant été bien décrite dans la littérature, ces deux HAP ont ainsi servi de base dans la réalisation de ces expérimentations.

Ce que nous pouvons retenir de ces expériences est que :

- La capacité de sorption du HAP est hautement dépendante des caractéristiques physico-chimiques du sédiment ;
- La matière organique apparaît être le principal facteur de modulation de la biodisponibilité des HAP ;
- La biodisponibilité des HAP testés et donc leur toxicité potentielle est directement associée à leur structure aromatique ;
- Les réponses biologiques (et leur intensité) induites par les deux HAP modèles sont différentes chez le médaka japonais et le poisson zèbre ;
- Une des causes de ces différences est une exposition plus longue liée au temps de développement embryonnaire plus important pour le médaka japonais (9-11 jpf) comparé au poisson zèbre (96 hpf) en accord avec les lois bioéthiques ;
- Le poisson zèbre est également plus sensible aux particules fines du sédiment (matière organique, argile) que le médaka japonais ; cette sensibilité peut induire un biais dans l'interprétation des résultats ;
- Les compositions finales déduites de ces expériences, après évaluation des réponses biologiques et en accord avec les propriétés toxiques intrinsèques des HAP testés, sont :

Pour le <u>médaka japonais</u> : 92,5 % de silice (granulométrie = 0,2-0,5 mm) + 5 % d'argile (Kaolinite) + 2,5 % de tourbe blonde de Sphaigne (Le Bihanic et al., Submitted a).

Pour le <u>poisson zèbre</u> : 95 % de silice + 5 % d'argile (Kaolinite)

Dans une problématique de développement d'outils d'évaluation, les résultats de cette thèse suggèrent que les tests embryo-larvaires utilisant le poisson zèbre ne sont pas appropriés pour l'évaluation de la toxicité de composés hydrophobes par voie sédimentaire. La composition du sédiment artificiel déduite suite aux expositions de ce modèle, n'est pas en accord avec l'objectif de reproduire une composition proche de celle présente dans le milieu naturel. En effet, les HAP vont avoir tendance à se fixer préférentiellement sur les particules fines de la matière organique, laquelle va ainsi moduler leur biodisponibilité (Fanget et al., 2002; Guasch et al., 2012). Or dans notre sédiment artificiel, les résultats obtenus préconisent une composition sans matière organique ; on peut donc se demander quelle serait la pertinence (éco)toxicologique d'utiliser une telle composition. De plus, certaines limites sont apparues au cours de ces expositions. Une forte turbidité de l'eau due aux particules sédimentaires, qui ne permet pas de suivre correctement la survie et le développement des larves après éclosion, a ainsi été observée. Le colmatage du chorion des œufs par les particules fines qui y adhèrent rend également le suivi de ces paramètres très difficile (Figure 42). Nous pouvons nous demander également si ce colmatage important ne conduirait pas à perturber les propriétés de diffusion du chorion et n'engendrerait pas une hypoxie à l'intérieur de l'œuf (Hollis et al., 1964; Kemp et al., 2011). Si tel était le cas, une telle hypoxie pourrait être à l'origine (au moins en partie) des retards de développement observés dans les conditions 5 % de tourbe, durant l'exposition au fluoranthène.



Figure 42. Illustration de l'adsorption des particules fines sédimentaires sur le chorion des embryons de poisson zèbre en condition A) 0 % de tourbe et B) 5 % de tourbe

Cependant, ces retards de développement n'ont pas été observés durant l'exposition au benzo[a]pyrène ce qui ne conforte donc pas l'hypothèse de l'effet d'une éventuelle hypoxie. La question de la reproductibilité des expérimentatios est donc posée. Les différentes observations obtenues au cours de cette thèse portent à croire qu'elles ne le sont pas. En effet, si l'on regarde les tests embryo-larvaires chez le poisson zèbre dont les expositions au benzo[a]pyrène et au fluoranthène ont été réalisées successivement à partir d'une même préparation de sédiment, les Contrôles Solvant ne sont pas reproductibles d'une expérience à l'autre. Aucun retard de développement n'a été observé chez les larves Contrôle Solvant durant l'exposition au benzo[a]pyrène contre 2 à 49 % durant l'exposition au fluoranthène. Est-ce dû à une variabilité des pontes obtenues ? Est-ce en raison d'une dégradation potentielle du sédiment ? Des analyses et expositions supplémentaires devront être réalisées afin d'élucider ces biais d'analyses. Par conséquent, nous pouvons nous interroger sur la réelle signification des résultats obtenus. Ces paramètres pouvant influencer fortement les réponses biologiques et compromettre la reproductibilité des tests, ont justifié l'arrêt des expositions embryo-larvaires par voie sédimentaire, et l'évaluation toxique de trois fractions aromatiques d'origine pyrolytique et pétrogénique chez le poisson zèbre n'a donc pas pu être conduite.

1.1.2. Evaluation de la toxicité de WAF de pétrole

Les composés pétroliers peuvent causer de sérieux dommages lorsqu'ils sont déversés dans l'environnement aquatique de manière accidentelle (naufrages de navire-citerne) ou chronique (e.g. opérations de dégazages, activités portuaires). Plusieurs paramètres vont régir la dispersion d'un pétrole une fois déversé : la nature du pétrole et sa viscosité, les conditions météorologiques sur le site du déversement, la hauteur de la colonne d'eau. De par la faible hauteur d'eau des zones côtières, un déversement important peut y engendrer de véritables catastrophes environnementales. La toxicité d'un produit pétrolier est en partie associée à son contenu en hydrocarbures aromatiques. Les composés se retrouvant dans la colonne d'eau vont avoir le potentiel d'induire des effets toxiques sur les organismes aquatiques. Afin d'évaluer le potentiel toxique de composés pétroliers, une approche expérimentale utilisant une solution de WAF a été réalisée afin de simuler la toxicité d'une nappe de pétrole non dispersée. Cette méthode standardisée par Singer et al. (2000) est décrite comme un bon compromis entre le désir de générer des tests de toxicité se rapprochant des conditions environnementales et le besoin d'obtenir des milieux d'expositions reproductibles. Dans le cadre de cette thèse (cf. Chapitre III), cette méthode d'exposition a été couplée avec des tests sur des stades embryo-larvaires de poisson zèbre, afin d'évaluer le degré d'exposition et les effets toxiques résultant de deux fractions dissoutes de produits pétroliers, un pétrole brut Arabian Light (BAL) et un fuel lourd de type Erika (HFO).

Ce que nous pouvons retenir de ces expérimentations est que :

- Chacune des WAF fabriquées est reproductible dans le temps d'un point de vue composition et concentration permettant ainsi des tests de toxicité reproductibles ;
- La composition des WAF issues des deux produits pétroliers est en accord avec leur nature chimique, c'est-à-dire une prédominance de HAP de faible poids moléculaire et de composés aromatiques sulfurés pour les WAF BAL et une prédominance de HAP de haut poids moléculaire, ainsi que des composés méthylés associés pour les WAF HFO. Chaque composition était également dépendante de la concentration testée ;
- La toxicité des composés dissous des WAF est associée aux propriétés intrinsèques des composés présents ;
- Des effets biologiques sont observés à différents niveaux d'intégration biologique. Les réponses induites par ces WAF sur les embryons et larves de poisson zèbre sont

résumées en Figure 43. Aucune réponse toxique n'est observée chez les embryons et larves Contrôle, ce qui valide l'expérience ;

- La toxicité augmente avec la concentration quel que soit le type de WAF exposée.
- Pour des gammes de concentration similaires (BAL 10 % vs HFO 10 % ; BAL 100 % vs HFO 50 %), la fraction dissoute de *l'Erika* est plus toxique que celle de *l'Arabian Light*, entrainant des altérations morphologiques plus importantes.
- Après 96 heures d'exposition, les mécanismes impliqués dans la biotransformation des composés (EROD, *cyp1a*, « métabolites ») ont été activés démontrant ainsi l'exposition des organismes, excepté à la plus faible concentration de WAF BAL (1%);
- Il existe une grande variabilité dans les niveaux de métabolites de HAP mesurés chez les larves (96 hpf) à la fin de l'exposition ;
- L'activation de mécanismes compensatoires antioxydants est observée dès la plus faible concentration de WAF BAL (1%). Ces résultats suggèrent que même si des effets ne sont pas observables sur les paramètres mesurés, des mécanismes sousjacents sont tout de même activés pour compenser des altérations éventuelles à des niveaux d'intégration biologique autres que ceux considérés dans notre étude. Cependant, il est nécessaire de rester prudent sur les affirmations concernant ces expressions de gènes à ces plus faibles concentrations. En effet, la modification de l'expression d'un gène n'entraîne pas nécessairement une perturbation des processus physiologiques associés en raison des nombreux mécanismes de régulation posttranscriptionnels. Il serait donc intéressant de compléter ces résultats avec l'évaluation des niveaux de ROS produits ;
- Aucun effet génotoxique n'a été observé chez les embryons quelle que soit la nature de la WAF après 24 heures d'exposition ;
- Des altérations physiologiques (bradycardies) et comportementales (diminution de l'activité de nage) ont été observées uniquement à la plus forte concentration de WAF HFO. Cette dernière pourrait être réalisée dans le but d'économiser l'énergie allouée à ces activités de nage afin de l'investir pleinement dans d'autres fonctions clés physiologiques altérées (i.e. l'activité cardiaque) nécessaire à leur survie. Cependant, malgré cette baisse d'activité, les larves sont capables de réagir à des niveaux équivalent de ceux des larves Contrôle en cas de second stress, afin de faire face à un éventuel danger (e.g. prédateur) un court instant. Ces modifications physiologiques et comportementales ont également été associées à des malformations d'une proportion

non négligeable, avec 91.1 % d'individus malformés présentant principalement des œdèmes, des malformations craniofaciales et des défauts cardiovasculaires. Cette concentration de WAF HFO 100 % a engendré des effets aigus, provoquant une mortalité précoce des larves comparée aux autres concentrations et au Contrôle, ainsi que des retards d'éclosion. Cette mortalité serait soit associée à une incapacité à puiser dans les réserves nutritionnelles afin de fournir l'énergie nécessaire pour leur survie, soit au contraire, un épuisement précoce des réserves du à un investissement énergétique plus important pour compenser les différentes altérations physiologiques observées. Des individus malformés ont également été observés à la dilution 50 %, lesquels n'ont cependant pas présenté de dysfonctionnements physiologiques et comportementaux pour les paramètres mesurés.



Figure 43. Synthèse des réponses induites par les WAF de pétroles suite à une exposition embryolarvaire de poisson zèbre durant 96 heures. Les réponses sont calculées à partir d'un système de score ou 1 point est accordé pour chaque paramètre mesuré induit, rapportées au nombre total de paramètres mesurés.

Du fait de la reproductibilité des expérimentations, ce mode d'exposition est davantage approprié à l'évaluation de la toxicité contrairement à la voie d'exposition sédimentaire décrite précédemment. En effet, la reproductibilité des expérimentations dans le temps est essentielle afin d'appréhender la réelle signification des effets toxiques observés et de s'affranchir des éventuels biais expérimentaux. Ce type d'exposition permet également de conserver les avantages associés aux stades précoces de développement du poisson zèbre en termes de transparence des chorions permettant le suivi optimal du développement et de la survie des embryons, ce qui n'était pas possible dans le cadre des expositions sédimentaires. D'un point de vue pratique, bien que la préparation des WAF demande une rigueur certaine et des conditions strictes de préparation, la méthode est relativement facile à mettre en place. Le poisson zèbre étant une espèce dulçaquicole, une étape de filtration du milieu n'est pas nécessaire, ce qui rend la préparation rapide (Singer et al., 2000). L'avantage de travailler en eau douce produite artificiellement au laboratoire, permet de s'affranchir des potentielles interactions avec les particules ambiantes. L'utilisation d'eaux douces naturelles ou d'eaux marines (naturelle ou artificielle) peut entraîner un peu plus de biais dans la reproductibilité des compositions exposées, due à l'adsorption potentielle des composés sur les particules ambiantes.

Par ailleurs, une forte dégradation desWAF BAL et HFO a été observé après 24 heures d'exposition dans une enceinte à 28 °C. Cela est probablement dû à l'évaporation importante des composés volatiles ou de faible poids moléculaire. Si la température peut être un facteur très influent, les réponses induites des organismes auraient-elles été similaires dans le cas d'un non renouvellement des milieux d'expositions ? Il serait intéressant de coupler des expérimentations avec des effets changeants de température, lesquels peuvent être tout à fait pertinents écologiquement afin de refléter les variations naturelles de température de l'environnement. Si le poisson zèbre est un modèle biologique adapté pour les tests écotoxicologiques, il ne permet d'envisager que les conditions d'exposition dulçaquicole. Afin d'augmenter la pertinence écologique de ce test, il serait intéressant d'utiliser une espèce modèle telle que le médaka marin, Oryzias melastigma, proche physiologiquement du médaka japonais Oryzias latipes, qui présente l'avantage d'être une espèce euryhaline. Des expositions à la fois en eau douce et en eau de mer pourraient être conduites, afin de tester en parallèle l'effet de facteurs changeants tels que la température, la salinité ou encore le pH. Bien que ces expositions restent dans le cadre expérimentale au laboratoire, elles pourraient augmenter les possibilités d'extrapolation au milieu naturel.

1.1.3. Conséquences d'une exposition parentale sur la première génération de descendance

Dans l'environnement aquatique, l'exposition aux HAP par voie alimentaire peut représenter une importante source de contamination, notamment lorsque les poissons se nourrissent de proies bioaccumulant fortement ces composés. L'objectif de cette étude était d'évaluer les conséquences d'une exposition parentale par la voie trophique (du premier repas jusqu'à la maturité sexuelle) sur la première génération de descendants (F_1). Pour cela, une approche « multimarqueurs » (similaire à celle du précédent chapitre) a été utilisée afin d'appréhender l'éventualité d'une exposition des stades précoces descendants et d'évaluer les dommages à différents niveaux d'intégration biologique.

Ce que nous pouvons retenir de ces analyses :

- De manière générale, la production des œufs issus de poissons contaminés a été vraisemblablement impactée, ce qui a limité les possibilités de réaliser des analyses chez les larves descendantes ;
- Les niveaux des métabolites de HAP dans les larves descendantes à 120 hpf n'ont révélé aucune différence quel que soit le traitement, la concentration ou les Contrôles considérés. De plus, aucun processus de détoxication mesuré n'a été induit (*cyp1a*, *ahr*, EROD) chez les larves 96 hpf, ce qui à première vue suggère que les larves descendantes n'ont pas été exposée à une contamination « suffisamment importante » pour induire ces processus. Cependant, étant la première génération descendante de poissons contaminés, il aurait été probablement plus judicieux de mesurer ces paramètres de manière plus précoce, par exemple directement après la ponte pour avoir une idée réelle des niveaux d'exposition juste après transfert parental. Les embryons étant gardés dans des milieux dépourvus de contamination, une dépuration des embryons a pu se produire garantissant l'absence d'induction des processus de détoxication plus tardif (96 hpf).
- Aucune lésion structurale précoce de l'ADN n'a été enregistrée chez les embryons descendants (24 hpf). De plus, des gènes impliqués dans les processus proapoptotiques semblent être activés chez les larves de 96 hpf, suggérant l'activation de processus de réparation cellulaire. Cependant, ces mesures montrent une variabilité assez importante, non dépendante du traitement, ni de la concentration testée. Des résultats

similaires ont également été obtenus pour les gènes impliqués dans les défenses antioxydantes. Ces résultats pourraient être uniquement dus à la variabilité biologique. Par conséquent, aucune liaison directe avec d'éventuelles altérations physiologiques, comportementales ou morphologiques ne peut être effectuée. Là encore, la question de l'échantillonnage est soulevée. De manière générale, il serait intéressant de réaliser des cinétiques de réponses pour ces marqueurs. Y'a-t-il réellement un transfert des HAP (ou plutôt des métabolites) des parents à la descendance aux concentrations testées engendrant une potentielle toxicité? Y'a-t-il des processus de dépuration mis en place ? Ou tout simplement aucune lésion cellulaire engendrée suite au transfert parental ? Dans ce contexte, l'utilisation de molécules marquées au carbone 14 pourrait permettre de quantifier finement le transfert parental vers la descendance.

L'activité cardiaque des larves descendantes a été diminuée avec l'augmentation de la concentration d'exposition des parents pour l'extrait pyrolytique. Ces bradycardies ont été associées également à une hyperactivité basale pour la plus forte concentration d'exposition (3X-PY). Cependant, lors d'un second stress, les larves descendantes 3X-PY, ne sont pas capables de réagir à des niveaux semblables à ceux des autres larves (variation delta inférieure à celle des autres larves). Les bradycardies importantes observées chez ces larves peuvent être la cause de cette limite de réaction, l'énergie allouée pour compenser les altérations de cette fonction physiologique limiterait ainsi leur capacité de réaction. Cependant, il est là encore nécessaire d'être prudent dans nos conclusions. En effet, avec une diminution d'activité cardiaque, nous aurions plutôt tendance à associer à une diminution de l'activité de nage, cependant les mécanismes sous-jacents modulant ces réponses comportementales sont actuellement peu connus. Une réponse contraire a été enregistrée chez les larves 0,3X provenant de parents exposés à l'extrait aromatique du pétrole lourd de *l'Erika* (HFO), dont les composés ont entrainé un effet inhibiteur sur la PMR (réponse photomotrice) et leur capacité à répondre à un second stress. Ces modifications physiologiques et comportementales pourraient alors réduire la probabilité de larves descendantes issues de parents contaminés à survivre dans le temps. Ces différences observées dans les PMR sont probablement spécifiques de la composition des extraits testés, cependant on ne sait actuellement pas comment les HAP agissent sur le système neurologique et donc moduleraient ces réponses photomotrices. Il serait intéressant de relier cette PMR avec des dosages de neurotransmetteurs (adrénaline, dopamine) et d'hormones stéroïdes (cortisol) par exemple, évaluant ainsi le potentiel inhibiteur ou excitateur des composés exposés ;

- Au niveau morphologique, aucune malformation n'a été observée chez les larves descendantes quels que soient les niveaux d'exposition et le type de fraction aromatique exposée. Des modifications biométriques ont cependant été observées. Une réduction de la surface vitelline a été constatée chez les larves descendantes de parents contaminés à l'extrait pyrolytique dès la concentration 0,3X. Bien que les larves 3X n'aient pas été mesurées faute de production d'œuf chez les parents exposés, cette réduction de la surface vitelline apparait être dose-dépendante et associées aux dysfonctionnements cardiovasculaires. Afin de compenser ces défauts physiologiques, la larve va puiser dans ses réserves afin de maintenir son homéostasie et ainsi d'augmenter ses chances de survie dans le temps (Billiard et al., 1999). Des larves plus grandes ont été observées chez les 0,3X-PY et 0,3X-HFO ; les mécanismes régulant ces modifications biométriques sont actuellement peu connus, et ne seraient pas nécessairement liée à la contamination ;
- A un niveau d'organisation biologique plus élevé, aucune modification dans le succès ou cinétique d'éclosion des larves n'a été observée.

Dans le cadre du projet ConPhyPoP, la survie sur une période de 15 jours des larves descendantes en condition de jeûne a été surveillée, ne révélant aucun effet létal précoce quelles que soit la fraction aromatique et les concentrations considérés (PY-Solvant:3X, BAL-Solvant:0,3X et HFO-Solvant:0,3X) (C. Vignet, Thèse Ifremer, communication personnelle). Ces résultats démontrent que malgré des anomalies cardiaques associés à des réserves vitellines potentiellement réduites (PY-0,3X:1X) et un niveau d'activité de nage plus élevés (PY-3X), les larves seraient capables de puiser dans les réserves vitellines et en avait suffisamment pour maintenir leur survie à court-terme. La survie n'ayant pas été surveillée au-delà de 15 jours, il est difficile de conclure sur l'impact réel à plus long terme des altérations physiologiques, comportementales et morphologiques observées précocement. De plus, des dérèglements dans les processus d'osmorégulation ont été observés chez les larves 7 jpf descendantes PY 0,3X:1X (I. Leguen, partenaire INRA-LPGP, communication personnelle). En effet, malgré l'absence d'altération morphologique branchiale, l'analyse de transcrits en relation avec le maintien de l'homéostasie (balances hydrominérales, transport d'eau, sécrétion de mucus, élimination de l'urée) a montré que ceux-ci sont réduits. Cependant, le faible effectif utilisé lors de ces analyses ne permet pas de conclure de manière catégorique. Quoiqu'il en soit, des analyses complémentaires sur les performances métaboliques aérobies au cours d'un challenge de nage ont mis en évidence une réduction du taux métabolique actif et de la capacité métabolique des juvéniles (2 mois d'âge) issus de parents exposés à la fraction pyrolytique 3X (Lucas et al., *submitted*). Ces altérations peuvent être associées aux anomalies cardiaques et aux réductions des surfaces vitellines observées précocement chez les larves. Ces résultats suggèrent donc une réduction de l'allocation énergétique chez le poisson qui peut directement se répercuter sur des fonctions biologiques demandeuses d'énergie telles que la locomotion, la digestion ou la croissance et ainsi réduire les chances de survie des organismes et impacter à plus long-terme le renouvellement des populations (Davoodi and Claireaux, 2007). Il serait intéressant d'évaluer également les conséquences de ces expositions sur les contenus lipidiques des embryons et des larves de la génération F₁, notamment à travers l'évaluation du ratio TAG/ST (triacylglycérols/stérols) lequel reflète de manière assez directe les réserves nutritionnelles des individus. Ces analyses pourront infirmer ou confirmer les hypothèses précédentes.

Malgré tous les efforts effectués pour vérifier la toxicité des trois extraits aromatiques chez la première génération de descendants, il s'avère qu'aucune conclusion définitive ne peut être tirée de cette étude. Par un manque de données considérable et un échantillonnage assez chaotique, dépendant fortement de la capacité des poissons à pondre, le caractère héréditaire des effets observés ne peut être statué. Des analyses épigénétiques plus poussées devront être entreprises afin d'évaluer les causes de la transmission des effets de la génération parentale à la première génération descendante.

De plus, une incertitude demeure dans cette procédure d'exposition quant à la quantité de nourriture ingérée par chaue individu. Bien que la quantité de nourriture distribuée fût associée à la biomasse des organismes, cette distribution ne permet pas de contrôler la quantité ingérée par les organismes. La récupération des granulés (bien que difficile) pourrait permettre d'apprécier les taux d'ingestion de nourriture des organismes, cependant ce suivi reste extrêmement difficile par les systèmes de renouvellement d'eau régulier qui pourrait engendrer des biais importants de mesure. Une fois de plus, l'utilisation de molécules radiomarquées associés à la nourriture pourrait être conduite afin suivre et quantifier l'ingestion de nourriture par les organismes (Conceição et al., 2007). De plus, les besoins physiologiques de chaque individu étant différents, l'ingestion de nourriture contaminée (ou non) n'est donc pas totalement identique et peut donc induire un biais dans l'accumulation et le taux de métabolisation de ces composés au sein de l'organisme. Des analyses de

métabolites de HAP ont été effectuées chez les parents mais seulement lorsqu'ils étaient au stade larvaire (15 jpf). Celles-ci démontrent une augmentation des concentrations des métabolites avec la concentration d'exposition quel que soit l'extrait aromatique utilisé (Vignet et al., submitted, Annexe 1). Cependant, aucune information n'est donnée sur les niveaux réels des métabolites au sein des adultes reproducteurs. Une augmentation du temps d'exposition. Cependant, les capacités de métabolisation des organismes au stade adulte sont largement plus importantes que celles des larves (Görge and Nagel, 1990). Dans notre étude transgénérationnelle, nous ne pouvons exclure l'idée, que les pontes obtenues proviennent de poissons (au sein d'un même bac) qui ont la capacité de pondre et que les poissons n'ont pas forcément les mêmes niveaux d'exposition et de dommages, qui pourraient donc induire des différences sur les pontes obtenues, malgré le mélange des pontes qui a été réalisée à chaque fois que cela été possible dans le but de minimiser ce possible effet. Enfin, nous n'avons aucune quantification de la dégradation de HAP (ou de métabolites) suite à la ponte (source de dépuration pour les géniteurs ?).

1.2. Outils d'évaluation de la toxicité : pertinence et limites

Les réponses de marqueurs peuvent offrir de véritables signaux d'alarme quant aux effets potentiellement néfastes de composés chimiques à des niveaux d'intégration élevés (populations, communautés, écosystèmes). Pour cela, au cours de ce travail de thèse, une approche chimique a bien entendu été utilisée afin d'évaluer la disponibilité des HAP présents dans les mélanges d'exposition (concentration et nature). Cependant, cette approche seule, ne permet pas d'évaluer les effets toxiques sur les organismes. Pour cela, la toxicité des HAP a pu être appréhendée à partir d'une batterie d'indicateurs d'effets biologiques létaux et sublétaux. Cette approche a été menée en utilisant des outils d'évaluation de la toxicité à différentes échelles biologiques (de la molécule à l'organisme et à la « population ») afin d'appréhender les sites de l'action toxique (à des niveaux fonctionnels et structuraux) des composés testés et d'évaluer au mieux leur caractère prédictif des effets engendrés à des niveaux d'intégration biologique supérieurs (population et communauté).

Les dosages des métabolites des HAP sont des marqueurs tout à fait pertinents pour l'évaluation de la toxicité de composés ou de mélanges. Cet outil procure des informations cruciales sur les niveaux d'expositions des organismes et devrait être utilisé de manière systématique dans les procédures d'évaluations des risques écotoxicologiques. Cependant, une grande variabilité dans les dosages a été enregistrée. En effet, dans le cadre des expositions à l'aide de WAF de produits pétroliers, une tendance à l'augmentation de la concentration en métabolites avec l'augmentation de la concentration d'exposition a bien été observée, mais la variabilité obtenue ne nous permet pas de différencier statistiquement les échantillons. Les causes peuvent être multiples. La variabilité biologique pourrait jouer un rôle important. En effet, bien que les dosages aient été réalisés sur des pools de larves, les capacités de métabolisation sont propres à chaque individu. Y'a-t-il eu également une contamination des échantillons lors du prélèvement ? Les fortes concentrations en naphtalène, composé très volatile, retrouvées notamment dans les échantillons Contrôle soulève cette question. Par ailleurs, en dépit de cette variabilité, une limite importante de ces analyses est leur coût élevé à la fois en termes de temps d'analyse, de matériel technique (appareillage et fonctionnement) et de matériel biologique. Les analyses ont été réalisées sur des pools de 50 larves. Au cours des études antérieures de l'équipe de recherche, les dosages s'effectués sur des pools de 30 larves, mais cet effectif n'était pas suffisamment important pour obtenir une masse suffisante nécessaire pour la quantification des composés, il a donc été augmenté au commencement de cette thèse. La masse de l'échantillon est donc un facteur limitant dans ces analyses, surtout lorsque l'on souhaite les répliquer pour tester la reproductibilité des expositions et minimiser la variabilité biologique. Un inconvénient majeur est le caractère destructif de ces analyses. De manière générale, des efforts devraient entrepris dans l'amélioration de cette méthode afin de réduire la taille de l'échantillon biologique nécessaire aux analyses, d'éviter les potentielles pertes au moment des extractions, de garder voire d'augmenter la sensibilité analytique, et ainsi de minimiser la variabilité de la mesure.

L'approche toxicogénomique utilisant les outils de la biologie moléculaire est de plus en plus utilisée dans l'évaluation des risques environnementaux (Cachot et al., 2007; Costa et al., 2012; Mos et al., 2008; Voelker et al., 2007; Woo et al., 2009). Dans le cadre de cette étude, l'analyse de l'expression de plusieurs gènes s'est avérée sensible à l'exposition de WAF de pétrole. L'utilisation de cette approche renseigne sur les éventuels mécanismes de compensation permettant de restaurer le niveau d'activité des mécanismes cibles impactés par le stress chimique. Les fortes inductions du gène *cyp1a* nous indiquent effectivement que les

organismes ont été exposés et que des mécanismes de biotransformation des composés aromatiques sont mis en place de manière précoce. De la même manière, l'augmentation de l'expression des différents gènes impliqués dans les défenses antioxydantes montre que des dysfonctionnements apparaissent au niveau cellulaire mais ne nous permet pas de conclure sur les éventuels dommages entrainés sur les processus physiologiques. La modulation de ces expressions géniques peut conduire à des acclimatations physiologiques ou à une possibilité de résistance au stress chimique et donc ne pas révéler de dommages à un niveau d'intégration biologique supérieur. Bien que ces marqueurs semblent être sensibles à la contamination, il est nécessaire de rester prudent sur l'extrapolation des conséquences de ces modifications géniques sur les processus physiologiques (liens de causalité non établis). Tout comme les analyses des métabolites des HAP, ces marqueurs moléculaires sont des outils invasifs et coûteux et peuvent être sujets à une forte variabilité de mesure, en raison notamment des différentes étapes d'extraction. Ces méthodes nécessitent d'être constamment améliorées afin de réduire au mieux cette variabilité.

Le test des comètes a été utilisé dans le but d'évaluer le pouvoir génotoxique des HAP. Marqueur précoce et intégratif des dommages primaires de l'ADN, ce test est de plus en plus utilisé dans le domaine de l'écotoxicologie en raison de sa rapidité, de sa sensibilité et de sa facilité d'utilisation (Akcha et al., 2003; Clément et al., 2004; Keiter et al., 2006; Le Dû-Lacoste et al., 2013; Vicquelin et al., 2011; Wessel et al., 2012). Bien que ce soit une méthode invasive, elle est très peu consommatrice de matériel biologique. En effet, le test peut être réalisé avec seulement 5 embryons pour le poisson zèbre. Dans le cadre de cette thèse, aucune altération génotoxique n'a été enregistrée, même en présence de composés potentiellement génotoxiques à de fortes concentrations tels que les métabolites du benzo[a]pyrène (cf. Chapitre III). Les raisons de l'absence de réponses génotoxiques sont ici posées alors que des dommages à l'ADN ont été fréquemment reportés dans la littérature suite à des expositions de HAP chez de nombreuses espèces de poissons. L'analyse très précoce de ce paramètre pourrait être une des raisons à cette absence de réponse. En effet, une période de 24 heures d'exposition n'est peut-être pas suffisante pour activer les mécanismes de biotransformation et ainsi bioactiver les composés progénotoxiques (Kammann et al., 2004; Le Dû-Lacoste et al., 2013; Vicquelin, 2011). S'ajoute à cela, les faibles capacités de métabolisation des embryons comparées à celles des juvéniles ou des adultes. De plus, nous ne pouvons exclure que des mécanismes de réparation des dommages, des systèmes de défense ou encore des systèmes promutagènes soient activés, entrainant ainsi la restauration de l'ADN des lésions.

Dans le cadre des expositions de WAF de pétrole, l'inactivation de l'expression de gènes proapoptotiques couplée à une forte induction du gène *cyp1a* ne permet pas de confirmer ou infirmer ces hypothèses. Il aurait été probablement plus judicieux de mesurer ces dommages à la fin de l'exposition. De plus, il serait intéressant d'évaluer ces dommages à l'ADN sur les 4 jours d'exposition, en couplant ces analyses avec des dosages de métabolites afin de pouvoir suivre l'activation des processus de métabolisation au cours du développement embryo-larvaire du poisson zèbre.

La mesure de l'activité cardiaque par le rythme cardiaque a été utilisée comme marqueur de la cardiotoxicité (Incardona et al., 2009, 2004). Bien que ce marqueur ait fourni des résultats intéressants, il est très sensible aux conditions expérimentales. Malgré des conditions strictes d'analyse (température, lumière, absence de bruit, vibrations des paillasses) et des périodes d'acclimatations avant l'enregistrement du rythme cardiaque, la moindre variation (e.g. 1 °C) peut entraîner de fortes variations de rythme (Barrionuevo and Burggren, 2013). Dans notre étude, même si des variations sont observées d'une fois sur l'autre, les enregistrements pour chaque exposition ont été réalisés dans les mêmes conditions, ce qui ne pose pas de problème pour comparer les différentes concentrations d'une même exposition.

L'évaluation de la réponse photomotrice des larves de poisson zèbre peut fournir des informations cruciales sur le comportement des larves en situation de stress et notamment sur leur capacité à réagir à un second stress. Les altérations du comportement peuvent être associée à des perturbations physiologiques du métabolisme énergétique mais également à des modifications neurologiques, qui peuvent donc compromettre la survie des organismes à plus long terme. C'est un outil qui est de plus en plus utilisé dans le domaine de la pharmacologie afin d'évaluer les propriétés narcotiques de nombreuses substances chimiques. Dans notre étude, cet outil a été appliqué à des composés chimiques environnementaux dont les propriétés neurotoxiques sont peu connues. Les réponses des organismes exposés sont assez variables et traduisent soit une augmentation, soit une diminution de l'activité de nage comparé aux individus Contrôle. Bien que l'interprétation des résultats soit difficile (lien de cause à effet) au vu des modulations des réponses (appropriées ou non), l'exposition aux HAP entraine des réponses différentes par rapport à celles des organismes Contrôle. Cela reflète des perturbations aux niveaux physiologiques et/ou neurologiques des organismes. Cependant, cette approche ne permet pas de mettre en évidence les sites de l'action toxique des HAP. De plus, les réponses observées sont effectives sur des temps très courts de challenge. Suivant leurs capacités d'adaptation, la réaction des larves serait-elle similaire dans
le cas de challenge répliqué ? Malgré son fort intérêt dans l'évaluation de la neurotoxicité de substances chimiques dans le domaine pharmacologique, l'utilisation de cet outil comme marqueur d'évaluation écotoxicologique n'apparait pas approprié dans l'état actuel. Il serait nécessaire avant tout, de réaliser des tests toxicologiques mécanistiques afin d'évaluer les profils de réponses d'un certain nombre de HAP individuels et lié en parallèle avec des dosages moléculaires/biochimiques de neurotransmetteurs avant de pouvoir l'appliquer à des mélanges complexes dont on ne sait finalement que peu de choses. De plus, bien que cet outil soit non invasif et facile à mettre en place, il est très coûteux en termes de matériel technique nécessaire à l'acquisition et l'analyse des vidéos (caméras, filtres, objectifs et logiciel).

D'un point vue phénotypique, la durée du développement embryonnaire, ainsi qu'un large spectre de malformations (e.g. œdèmes, malformations squelettiques, craniofaciales, cardiovasculaires) ont été évalués. Ces marqueurs de toxicité renseignent sur la nature et l'intensité de l'exposition. Ces marqueurs sont tout à fait pertinents dans l'évaluation toxique de composés sur le développement embryo-larvaire. Ils ont l'avantage d'être non invasifs, rapides et peu coûteux. Cependant, ces outils permettent de caractériser les effets morphologiques de manière très grossière. Ils ne sont pas sensibles et ne répondent généralement qu'aux fortes doses d'exposition. Une des limites de cet outil est l'aspect subjectif lié à l'observation des anomalies phénotypiques notamment entre expérimentateurs, qui peut engendrer de la variabilité dans les résultats obtenus, notamment en ce qui concerne les malformations craniofaciales (e.g. mâchoires) et squelettiques. Cette évaluation morphologique « externe » pourrait être complétée par des analyses de la morphologie « interne » qui donneraient des mesures plus fines des anomalies squelettiques, lesquelles ne peuvent être visibles avec l'évaluation précédente. Des anomalies précoces du squelette (axiale et craniofacial) pourraient conduire à une incapacité à respirer (malformations des branchies), se nourrir (malformation de la mâchoire), à nager (malformations des vertèbres), par conséquent à des modifications dans les performances physiologiques, métaboliques, respiratoires, d'osmorégulation et de croissance, et impacter ainsi la survie des organismes. Les anomalies du squelette craniofacial peuvent être évaluées à l'aide de colorations au bleu d'alcyan (marquage des cartilages) et au rouge alizarine (marquage des os). Ces marquages, initialement prévus dans le cadre de cette thèse mais non réalisé, permettent de suivre en détails la chondrification et l'ossification larvaire du squelette craniofacial, mandibulaire et branchial (Figure 44). De la même manière, les structures calciques peuvent être évaluées à l'aide de marquage à la calcéine. Cette méthode présente l'avantage d'être non invasive comparée à la précédente. Ces marquages ont été utilisés dans le cadre du projet ConPhyPoP, afin d'évaluer les éventuelles anomalies chez la génération parentale après exposition à trois extraits aromatiques d'origine pyrolytique et pétrogénique (Vignet et al., submitted, Annexe 2).



Figure 44. Analyse morphologique craniofaciale d'une larve Contrôle 120 hpf révélant la chondrification et l'ossification buccales et pharyngiennes (vue ventrale, x50). Les cartilages sont marqués au bleu d'alcyan et les os au rouge alizarine. Les structures cartilagineuses notées de couleur noire : bb, les cartilages basobranchiaux, bh, les cartilages basohyales ; ca, les capsules auditives; cb, les 5 cartilages cératobranchiaux ; ch, le cartilage cératohyal ; hm, le cartilage hyomandibulaire ; m, les cartilages de Meckel ; pe, les plaques etmoïdes ; pf : cartilages des nageoires pectorales ; pq : les platoquadrate,. Les structures osseuses notées de couleur blanche : cb5, l'os cératobranchial n°5; cl, l'os cleithrum; nc, la notochorde ; op : os de l'opercule ; ps, l'os parasphénoïde.

En parallèle de ces marqueurs phénotypiques, des analyses biométriques ont également été réalisées. Ces biométries ne peuvent être considérées comme un outil pertinent d'évaluation dans le cadre de notre étude. En effet, des modifications de taille ou surface des larves ont été observées, sans que celles-ci soient nécessairement reliées à la concentration « néfaste » pour l'organisme. De plus, les mécanismes de régulation de la taille des organismes sont peu connus, il est difficile d'interpréter les éventuelles augmentations de taille à certaines concentrations et des diminutions à d'autres. Le suivi de l'éclosion des larves n'est pas un marqueur sensible de la contamination, cependant lorsque des perturbations sont observées dans ce processus (e.g. retard ou incapacité d'éclore), ce paramètre procure des informations pertinentes écologiquement. En effet, ces perturbations pourraient impacter de manière importante le renouvellement des populations. De plus, bien que ce critère d'évaluation répond seulement à de fortes doses d'exposition, il est non coûteux, non invasif, particulièrement rapide à enregistrer et peut être utilisé en parallèle du suivi de la survie des individus exposés.

Bien que le suivi de la viabilité soit généralement un outil qui répond à forte dose, il est nécessaire de l'inclure dans tous les tests de toxicité, permettant ainsi de statuer sur le caractère létal du composé ou du mélange considéré. Cependant, il est fortement conseillé de prolonger le suivi de cette viabilité au-delà des temps conventionnel préconisé par l'OCDE et les lois éthiques au risque de sous-estimer la toxicité aigüe du composé ou du mélange testé. De plus, dans le cadre de nos expositions, nous avions choisi de prolonger le suivi de cette viabilité sur une période de 15 jours en condition de jeûne, lequel renseigne sur les capacités des larves exposées à puiser dans leurs réserves énergétiques pour maintenir leur homéostasie et donc leur survie. La période de 15 jours semble plus pertinente que la période de 10 fixées en début de thèse, puisque la mortalité chez les larves Contrôle apparait aux alentours du 12^{ème} jour.

D'une manière générale, cette approche est apparue satisfaisante dans le cadre d'une exposition directe (voie sédimentaire et WAF de pétrole). En ce qui concerne l'étude transgénérationnelle, des marqueurs épigénétiques ciblant les fonctions métabolique énergétique, de croissance ou de reproduction auraient probablement été plus efficace afin d'évaluer au mieux l'impact à plus long terme sur la survie et le recrutement des populations. Les réponses de ces marqueurs précoces offrent des informations cruciales sur les effets potentiellement néfastes de HAP à différents niveaux d'intégration biologique. Cependant, la prédictibilité exacte de l'impact d'une exposition précoce à long terme reste difficile à évaluer.

2. Perspectives

Dans une démarche d'évaluation des risques chimiques, des expositions utilisant des élutriats ou extraits de sédiments, ou de pétroles pourraient être menées. La pertinence environnementale serait maintenue en prenant en compte les matières en suspension et les composés dissous. Ces modes d'exposition permettraient une meilleure standardisation des protocoles de contamination des tests de toxicité embryo-larvaires. Ils permettraient également de s'affranchir dans un premier temps des modifications physico-chimiques des sédiments (comme observé lors de cette thèse) et dans un second temps de s'affranchir d'un biais lié à la sensibilité des embryons aux conditions physiques du sédiment pour lesquelles les effets pourraient être sous ou surestimés.

De plus, il est important de prendre en considération la dynamique temporelle des tests écotoxicologiques. En effet, les marqueurs utilisés actuellement reflètent l'état de santé des organismes mais ne reflètent pas le potentiel d'une population exposée à se maintenir dans le futur. De surcroit, des études transgénérationnelles (jusqu'à la troisième génération) devraient être également entreprises afin d'examiner les effets de la contamination chronique. Il existe actuellement très peu d'informations disponibles sur les effets de HAP sur les générations descendantes de poissons exposés. L'étude de leurs réponses serait alors un bon moyen de prédire les effets d'une pollution au niveau populationnel, et ainsi évaluer le champ de tolérance des réponses biologiques. L'évaluation de l'impact d'une exposition précoce (embryo-larvaire) à des HAP (extraits, élutriats de pétrole ou de sédiment) sur les stades de vie supérieurs et les générations suivantes pourrait ainsi être une perspective de recherche intéressante de l'impact d'une contamination à long terme. En application des Directives Européennes et dans le respect du principe éthique de l'expérimentation animale, l'utilisation conjointe d'une approche « diagnostic » multibiomarqueurs sur les stades embryo-larvaires et d'une approche non invasive (dans la mesure du possible) sur les stades de développement supérieurs pourrait être envisageable. L'approche diagnostic précoce devrait permettre d'évaluer les niveaux de contamination et de dommages de l'organisme exposé, de faire le lien avec l'approche d'évaluation des effets tardifs et ainsi de renforcer la prédiction de ces marqueurs précoces. Des outils sensibles à vocation écologique devront être également utilisés de manière à cibler des processus clés (métabolisme énergétique, croissance/condition, reproduction) reflétant ainsi l'état de santé au niveau individuel. Cette perspective s'inscrit principalement dans une démarche de lien de cause à effet. Cependant, en termes de faisabilité et de coût expérimental, il convient dans ce contexte d'utiliser un poisson modèle à cycle de vie court tel que le poisson zèbre ou encore les killies (*Nothobranchus sp.*) dont les cycles de vie s'effectuent en quelques mois seulement. Bien que ce type d'expérimentation pourrait générer un certain nombre de données (éco)toxicologiques, les capacités d'adaptation naturelle des organismes, ainsi que les fluctuations du milieu environnant ne sont pas prises en compte. Des expérimentations faisant varier ces paramètres environnementaux pourraient permettre d'extrapoler à l'environnement et ainsi appliquer les données à des modèles prédictifs.

Dans une démarche plus mécanistique, la toxicogénomique pourrait être appliquée à ces études multigénérationnelles afin de déterminer les niveaux de transfert d'informations génétiques intracellulaires des organismes exposés aux HAP. L'estimation de ces niveaux de transfert d'information génique peut être réalisée par la mesure du taux d'expression transcriptionnelle de gènes dont le produit est susceptible d'intervenir directement ou indirectement dans des processus de résistance et/ou de détoxication. Cette approche a été utilisée par Isabelle Leguen (LPGP, INRA Rennes), partenaire du projet ConPhyPoP, en vue d'analyser le maintien de l'homéostasie (processus d'osmorégulation) des larves descendantes de poissons contaminés (Chapitre IV). Les résultats ont mis en évidence une diminution potentielle de l'expression de gènes impliqués dans la sécrétion de mucus, l'élimination de l'urée et la détoxication chez les larves issues de parents contaminés à la fraction pyrolytique. Cependant, au vue du nombre limité d'embryons obtenus, les analyses statistiques ne permettent pas de conclure fermement sur l'effet des HAP sur le transfert potentiel chez la descendance.

Dans l'environnement aquatique, les organismes sont soumis à de nombreuses variations naturelles qui ne sont pas pris en compte dans les tests de toxicité traditionnels. En effet, les facteurs abiotiques tels que la température, le pH ou la salinité (pour les espèces marines) peuvent interférer avec les polluants, modifiant ainsi leurs caractéristiques et leur biodisponibilité. Par conséquent, la réponse biologique induite sera plus ou moins affectée par ces modifications. Il serait intéressant de réaliser des études multifactorielles évaluant ainsi les interactions potentielles de facteurs confondants avec les HAP. Dans le cadre de cette thèse, une dégradation rapide de la WAF a été observée au bout de 24 heures. On peut alors se demander si les réponses biologiques observées auraient été similaires sans renouvellement

des milieux d'exposition sur une période d'expérimentation de 96 heures. De plus, dans l'environnement aquatique, les HAP sont très souvent associés à d'autres polluants (e.g. métaux lourds, PCB) qui peuvent interagir de manière synergique ou antagoniste sur les organismes. Il serait également envisageable d'étudier les interactions entre contaminants.

Dans une perspective plus large, l'évaluation des risques (éco)toxicologiques de substances chimiques pourraient être menée sur la base d'un modèle générique bioénergétique de la théorie « Dynamic Energy Budget » (DEB). Ce modèle mathématique (DEB-Tox) pourrait estimer le devenir de composés chimiques au sein d'un organisme exposé, en prenant en considérations leurs effets. Il permet de mettre en relation les taux d'assimilation des composés au sein d'un organisme et l'allocation énergétique afin de maintenir son homéostasie, sa croissance et sa reproduction (Kooijman and Bedaux, 1996). Ces modèles pourraient être utilisés afin d'étudier la dynamique transgénérationnelle des composés chimiques suite à une exposition précoce. Bien que les tests de toxicité soient nécessaires pour alimenter les bases de données, les modèles mathématiques constituent des outils essentiels d'aide la décision et permettront dans un futur proche de réduire également les coûts des analyses d'évaluation des risques (éco)toxicologiques.



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Aas, E., Baussant, T., Balk, L., Liewenborg, B., Andersen, O.K., 2000. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquatic Toxicology* 51, 241–258.
- Abrahamson, A., Brandt, I., Brunström, B., Sundt, R.C., Jørgensen, E.H., 2008. Monitoring contaminants from oil production at sea by measuring gill EROD activity in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Environmental Pollution* 153, 169–175.
- Abrajano, T.A., Yan, B., O'Malley, V., 2003. High molecular weight petrogenic and pyrogenic hydrocarbons in aquatic environments. *Treatise on Geochemistry* 9, 475–509.
- Achuba, F.I., Osakwe, S.A., 2004. Petroleum induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*). Fish Physiology and Biochemistry 29, 97–103.
- Adams, S.M., Shepard, K.L., Greeley, M.S., Jimenez, B.D., Ryon, M.G., Shugart, L.R., McCarthy, J.F., Hinton, D.E., 1989. The use of bioindicators for assessing the effects of pollutant stress on fish. *Marine Environmental Research* 28, 459–464.
- Ahlf, W., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., Ricking, M., 2002. A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality. *Journal of Soils and Sediments* 2, 37–42.
- Akcha, F., Leday, G., Pfohl-Leszkowicz, A., 2004. Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage. *Mutation Research* 552, 197–207.
- Akcha, F., Vincent Hubert, F., Pfhol-Leszkowicz, A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutation Research* 534, 21–32.
- Akkanen, J., Kukkonen, J.V.K., 2003. Measuring the bioavailability of two hydrophobic organic compounds in the presence of dissolved organic matter. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 518–524.
- Akkanen, J., Lyytikäinen, M., Tuikka, A., Kukkonen, J.V.K., 2005. Dissolved organic matter in pore water of freshwater sediments: effects of separation procedure on quantity, quality and functionality. *Chemosphere* 60, 1608–1615.
- Akkanen J., Tuikka A., Kukkonen J.V.K. ,2012. On the borderline of dissolved and particulate organic matter: Partitioning and bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental* Safety 78:91-98.
- Ali, S., Champagne, D.L., Richardson, M.K., 2012. Behavioral profiling of zebrafish embryos exposed to a panel of 60 water-soluble compounds. *Behavioural Brain Research* 228, 272–83.

- Allen Burton, G., Ingersoll, C.G., Burnett, L.C., Henry, M., Hinman, M.L., Klaine, S.J., Landrum, P.F., Ross, P., Tuchman, M., 1996. A comparison of sediment toxicity test methods at three great lake areas of concern. *Journal of Great Lakes Research* 22, 495– 511.
- Amara, R., Meziane, T., Gilliers, C., Hermel, G., Laffargue, P., 2007. Growth and condition indices in juvenile sole *Solea solea* measured to assess the quality of essential fish habitat. *Marine Ecology Progress Series* 351, 201–208.
- Au, D.W.T., Chen, P., Pollino, C., 2004. Cytological changes in association with ethoxyresorufin o-deethylase induction in fish upon dietary exposure to benzo[a]pyrene. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1043–1050.
- Aurand, D. V, Coelho, G.M., 1996. Proceedings of the fourth meeting of the chemical response to oil spills: ecological effects research forum, in: Report No. 96-01, *Ecosystem Management and Associates*. Purcellville, VA, p. 50.

B

- Baek, S.O., Field, R.A., Goldstone, M.E., Kirk, P.W., Lester, J.N., Perry, R., 1991. A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water Air Soil Pollution* 60: 279-300.
- Bado-Nilles, Anne, Quentel, C., Auffret, M., Le Floch, S., Gagnaire, B., Renault, T., Thomas-Guyon, H., 2009. Immune effects of HFO on European sea bass, *Dicentrarchus labrax*, and Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1446–1454.
- 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). *Toxicology in Vitro* 23, 235–241.
- Balls, M., Goldberg, A.N., Fentem, J.H., Broadhead, C.L., Burch, R.L., Festing, M.F.W., Frazier, J.M., Hendriksen, C.F.M., Jennings, M., van der Kamp, M.D.O., Morton, D.B., Rowan, A.N., Russell, C., Russell, W.M.S., Spielmann, H., Stephens, M.L., Stokes, W.S., Straughan, D.W., Yager, J.D., Zurlo, J., van Zutphen, B.F.M., 1995. The three Rs: The way forward. *ATLA* 23:838-866.
- Barjhoux, I., Baudrimont, M., Morin, B., Landi, L., Gonzalez, P., Cachot, J., 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecotoxicology and Environmental Safety 79, 272–282.
- Barrionuevo, W.R., Burggren, W.W., 2013. O2 consumption and heart rate in developing zebrafish (*Danio rerio*): influence of temperature and ambient O2. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 276, 505–513.
- Barron, M., Podrabsky, T., Ogle, S., Ricker, R., 1999. Are aromatic hydrocarbons the primary determinant of petroleum toxicity to aquatic organisms? *Aquatic Toxicology* 46, 253–268.

- Barron, M.G., Carls, M.G., Heintz, R., Rice, S.D., 2004. Evaluation of fish early life-stage toxicity models of chronic embryonic exposures to complex polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Toxicological Sciences* 78, 60–67.
- Barron M.G., Heintz R., Rice S.D., 2004. Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. *Marine Environmental Research* 58 (2-5):95-100
- Bartzke, M., Delov, V., Stahlschmidt-Allner, P., Allner, B., Oehlmann, J., 2010. Integrating the fish embryo toxicity test as triad element for sediment toxicity assessment based on the Water Framework Directive approach. *Journal of Soils Sediments* 10, 389–399.
- Basu, N., Billiard, S., Fragoso, N., Omoike, A., Tabash, S., Brown, S., Hodson, P., 2001. Ethoxyresorufin-O-deethylase induction in trout exposed to mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1244–1251.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1997. Analytical procedure for the analysis of PAHs in biological tissues by gas chromatography coupled to mass spectrometry: application to mussels. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 359, 502–509.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998. Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western mediterranean sea. *Environmental Chemistry* 17, 765–776.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P., 1998. PAHs in Arcachon Bay, France: Origin and biomonitoring with caged organisms. *Marine Pollution Bulletin* 36 (8):577-586.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Michel, X., Bellocq, J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Marine Environmental Research* 47 (5):415-439.
- Behar, F., Leblond, C., Saint-Paul, C., 1989. Analysis of pyrolysis effluents in an open and closed system. *Oil and Gas Science and Technology* 44, 387–411.
- Belanger, S.E., Balon, E.K., Rawlings, J.M., 2010. Saltatory ontogeny of fishes and sensitive early life stages for ecotoxicology tests. *Aquatic Toxicology* 97, 88–95.
- Benlahcen, K.T., Chaoui, A., Budzinski, H., Bellocq, J., Garrigues, P., 1997. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. *Marine Pollution Bulletin* 34 (5):298-305.
- Billiard, S.M., Querbach, K., Hodson, P. V, 1999. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2070–2077.
- Bilotta, J., Saszik, S., Givin, C.M., Hardesty, H.R., Sutherland, S.E., 2002. Effects of embryonic exposure to ethanol on zebrafish visual function. *Neurotoxicology and Teratology* 24, 759–766.

- Bittner, M., Macikova, P., Giesy, J.P., Hilscherova, K., 2011. Enhancement of AhR-mediated activity of selected pollutants and their mixtures after interaction with dissolved organic matter. *Environment International* 37 (5):960-964.
- Black, J.A., Birge, W.J., Westerman, G.A., Francis, P.C., 1983. Comparative aquatic toxicology of aromatic hydrocarbons. *Fundamental and Applied Toxicology* 3, 353–3588.
- Bols, N.C., Schirmer, K., Joyce, E.M., Dixon, D.G., Greenberg, B.M., Whyte, J.J., 1999. Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 118–128.
- Bouloubassi, I., Méjanelle, L., Pete, R., Fillaux, J., Lorre, A., Point, V., 2006. PAH transport by sinking particles in the open Mediterranean Sea: A 1 year sediment trap study. *Marine Pollution Bulletin* 52 (5):560-571.
- Braunbeck, T., Boettcher, M., Hollert, H., Kosmehl, T., Lammer, E., Leist, E., Rudolf, M., Seitz, N., 2005. Towards an alternative for the acute fish LC(50) test in chemical assessment: the fish embryo toxicity test goes multi-species an update. *Altex* 22, 87–102.
- Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Fish Embryo Toxicity assays. Report.
- Brinkmann, M., Hudjetz, S., Cofalla, C., Roger, S., Kammann, U., Giesy, J.P., Hecker, M., Wiseman, S., Zhang, X., Wölz, J., Schüttrumpf, H., Hollert, H., 2010. A combined hydraulic and toxicological approach to assess re-suspended sediments during simulated flood events. Part I–multiple biomarkers in rainbow trout. *Journal of Soils and Sediments* 10, 1347–1361.
- Budzinski, H., Jones, I., Bellocq, J., Picrard, C., Garrigues, P., 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Marine Chemistry* 58, 85–97.
- Budzinski, H., Letellier, 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 Analytical Chemistry* 367, 165–171.
- Budzinski, H., Mazéas, O., Tronczynski, J., Désaunay, Y., Bocquené, G., Claireaux, G., 2004. Link between exposure of fish (*Solea solea*) to PAHs and metabolites : Application to the "Erika " oil spill. *Aquatic Living Resources* 17, 329–334.
- Burgeot, T., Bocquené, G., Pingray, G. Godefroy, D., Legrand, J., Dimeet, J., Marco, F., Vincent, F., Henocque, Y. Jeanneret, H.O., Galgani, F., 1994. Monitoring biological effects of contamination in marine fish along French coasts by measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase activity. *Ecotoxicology Environmental Safety* 29: 131-147.

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

Burton, J.G.A., 2002. Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology* 3, 65–76.

Bustamante, P., Luna-Acosta, A., Clemens, S., Cassi, R., Thomas-Guyon, H., Warnau, M., 2012. Bioaccumulation and metabolisation of (14)C-pyrene by the Pacific oyster *Crassostrea gigas* exposed via seawater. *Chemosphere* 87, 938–944.

<u>C</u>

- Cachot, J., Geffard, O., Augagneur, S., Lacroix, S., Le Menach, K., Peluhet, L., Couteau, J., Denier, X., Devier, M.H., Pottier, D., Budzinski, H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology* 79, 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., Peluhet, L., LeMenach, K., Souissi, S., Budzinski, H., 2009. Tidal influence on the distribution of hydrophobic organic contaminants in the Seine Estuary and biomarker responses on the copepod *Eurytemora affinis*. *Environmental Pollution* 157 (1):64-71
- Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Lardy, S., Augagneur, S., Budzinski, H., 2007. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the watercolumn of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïd, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere* 70 (2):281-287
- Carls, M.G., Rice, S.D., Hose, J.E., 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasi*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 481–493.
- Carls, M.G., Thedinga, J.F., 2010. Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. *Marine Environmental Research* 69, 318–325.
- Carlson, E., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2004. Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. *Toxicology and Applied Pharmacology* 201, 40–52.
- Carlson, E.A., Li, Y., Zelikoff, J.T., 2002. The Japanese medaka (*Oryzias latipes*) model: applicability for investigating the immunosuppressive effects of the aquatic pollutant benzo[a]pyrene (BaP). *Marine Environmental Research* 54, 565–568.
- Carney Almroth, B., 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.

- Carney, S.A., Peterson, R.E., Heideman, W., 2004. Hydrocarbon receptor / aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish. *Molecular Pharmacolgy* 66, 512–521.
- Casillas, E., Misitano, D., Johnson, L.L., Rhodes, L.D., Collier, T.K., Stein, J.E., Mccain, B.B., Varanasi, U., 1991. Inducibility of spawning and reproductive success of female english sole (*Parophrys vetulus*) from urban and nonurban areas of puget sound, Washington. *Marine Environmental Research* 31, 99–122.
- Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., Kawahara, K., Lee, L.E.J., Mothersill, C., Pärt, P., Repetto, G., Sintes, J.R., Rufli, H., Smith, R., Wood, C., Segner, H., 2003. The use of fish cells in ecotoxicology. *Alternatives To Laboratory Animals* 31, 317–351.
- Champagne, D.L., Hoefnagels, C.C.M., de Kloet, R.E., Richardson, M.K., 2010. Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behavioural Brain Research* 214, 332–342.
- Chuang, J.C., Mack, G.A., Kuhlman, M.R., Wilson, N.K., 1991. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives in indoor and outdoor air in an eight-home study. *Atmospheric Environment. Part B. Urban Atmosphere*, 25(3), 369-380.
- Claireaux, G., Davoodi, F., 2010. Effect of exposure to petroleum hydrocarbons upon cardiorespiratory function in the common sole (*Solea solea*). *Aquatic Toxicology* 98, 113–119.
- 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. *The Journal of Experimental Biology* 208, 1775–1784.
- Clément, B., Devaux, a, Perrodin, Y., Danjean, M., Ghidini-Fatus, M., 2004. Assessment of sediment ecotoxicity and genotoxicity in freshwater laboratory microcosms. Ecotoxicology (London, England) 13, 323–33.
- Coelho, G.M., Aurand, D. V, 1997. Proceedings of the sixth meeting of the chemical response to oil spills: ecological effects research forum, in: Report No. 97-01, Ecosystem Management and Associates. Purcellville, VA, p. 69.
- Cole, L.K., Ross, L.S., 2001. Apoptosis in the developing zebrafish embryo. *Developmental Biology* 240, 123–42.
- Conceição, L.E.C., Morais, S., Rønnestad, I., 2007. Tracers in fish larvae nutrition: A review of methods and applications. *Aquaculture* 267, 62–75.
- Cooper, R.L., Kavlock, R.J., 1997. Endocrine disruptors and reproductive development: a weight-of-evidence overview. *Journal of Endocrinology* 152, 159–166.

- Costa, J., Ferreira, M., Rey-Salgueiro, L., Reis-Henriques, M.A., 2011. Comparision of the waterborne and dietary routes of exposure on the effects of Benzo(a)pyrene on biotransformation pathways in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Chemosphere* 84, 1452–1460.
- Costa, J., Reis-Henriques, M.A., Castro, L.F.C., Ferreira, M., 2012. Gene expression analysis of ABC efflux transporters, CYP1A and GSTα in Nile tilapia after exposure to benzo(a)pyrene. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & pharmacology* 155, 469–482.
- Couillard, C.M., Laplatte, B., Pelletier, E., 2009. A fish bioassay to evaluate the toxicity associated with the ingestion of benzo[a]pyrene-contaminated benthic prey. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 772–781.
- Couillard, C.M., Lee, K., Légaré, B., King, T.L., 2005. Effect of dispersant on the composition of the water-accommodated fraction of crude oil and its toxicity to larval marine fish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1496–1504.
- Cowden, J., Padnos, B., Hunter, D., MacPhail, R., Jensen, K., Padilla, S., 2012. Developmental exposure to valproate and ethanol alters locomotor activity and retinotectal projection area in zebrafish embryos. *Reproductive Toxicology* 33, 165–73.

D

- D'Adamo, R., Pelosi, S., Trotta, P., Sansone, G., 1997. Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Marine Chemistry* 56, 45–49.
- Dabestani, R., Ivanov, I.N., 1999. A Compilation of Physical, Spectroscopic and Photophysical Properties of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology* 70, 10–34.
- Daouk, T., 2011. Effets de contaminations d'embryons et d'adultes de poissons zèbres (*Danio rerio*) par des PCB et des HAP. Thèse Université La Rochelle.
- Daouk, T., Larcher, T., Roupsard, F., Lyphout, L., Rigaud, C., Ledevin, M., Loizeau, V., Cousin, X., 2011. Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. *Aquatic Toxicology* 105, 270–278.
- 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.
- De Esch, C., van der Linde, H., Slieker, R., Willemsen, R., Wolterbeek, A., Woutersen, R., De Groot, D., 2012. Locomotor activity assay in zebrafish larvae: influence of age, strain and ethanol. *Neurotoxicology and teratology* 34, 425–433.
- De Luca, G., Furesi, A., Micera, G., Panzanelli, A., Piu, P.C., Pilo, M.I., Spano, N., Sanna, G., 2005. Nature, distribution and origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in

the sediments of Olbia harbor (Northern Sardinia, Italy). *Marine Pollution Bulletin* 50, 1223–1232.

- Depledge, M.H., Aagaard, A., Gyorkost, P., 1995. Assessment of Trace Metal Toxicity Using Molecular, Physiological and Behavioural Biomarkers 31, 19–27.
- Depledge, M.H., Amaral-Mendes, J.J., Daniel, B., Halbrok, R.S., Kloepper-Sams, P., N, M.M., Peakall, D.B., 1993. The conceptual basis of the biomarker approach, in: Biomarkers Research and Application in the Assessment of Environmental Health. pp. 15–30.
- Di Giulio, R.T., Hinton, D.E., 2008. The Toxicology of Fishes, CRC Press, Washington. ed.
- Djomo, J.E., Garrigues, P., Narbonne, J.F., 1996. Uptake and depuration of polycyclic aromatic hydrocarbons from sediment by the zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1177–1181.
- Dong, W., Teraoka, H., Kondo, S., Hiraga, T., 2001. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces apoptosis in the dorsal midbrain of zebrafish embryos by activation of arylhydrocarbon receptor. *Neuroscience Letters* 303, 169–172.
- Dooley, K., Zon, L.I., 2000. Zebrafish: a model system for the study of human disease. *Current opinion in genetics & development* 10, 252–256.
- Döring, U.M., Marschner B., 1998. Water solubility enhancement of benzo(a)pyrene and 2,2',5,5'-terachlorobiphenyl by dissolved organic matter (DOM). *Physics and Chemistry of the Earth* 23 (2):193-197
- Drapeau, P., Saint-Amant, L., Buss, R.R., Chong, M., McDearmid, J.R., Brustein, E., 2002. Development of the locomotor network in zebrafish. *Progress in Neurobiology* 68, 85–111.
- Driscoll, S.B.K., McElroy, A.E., 1997. Elimination of sediment-associated benzo [a] pyrene and its metabolites by polychaete worms exposed to 3-methylcholanthrene. *Aquatic Toxicology* 39, 77–91.
- Driscoll, S.K., McElroy, A.E., 1996. Bioaccumulation and metabolism of benzo[a]pyrene in three species of polychaete worms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 1401–1410.

E

- Eason, C., O'Halloran, K., 2002. Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. Toxicology 181-182, 517–521.
- EC, 2000. Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Parliament* L327, 1–82.

- EC, 2006. Regulation 1907/2006/EC of the European Parliament and of the Council concerning the Registration Evaluation and Authorization of Chemicals (REACh).
- EC, 2010. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. *Official Journal of the European Union* L276:33-79.
- Embry, M.R., Belanger, S.E., Braunbeck, T., Galay-Burgos, M., Halder, M., Hinton, D.E., Léonard, M., Lillicrap, A., Norberg-King, T., Whale, G., 2010. The fish embryo toxicity test as an animal alternative method in hazard and risk assessment and scientific research. *Aquatic Toxicology* 97, 79–87.
- 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, 21–40.
- Eriksen, M.S., Bakken, M., Espmark, a., Braastad, B.O., Salte, R., 2006. Prespawning stress in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: maternal cortisol exposure and hyperthermia during embryonic development affect offspring survival, growth and incidence of malformations. *Journal of Fish Biology* 69, 114–129.

F

- Fadool, J.M., Dowling, J.E., 2008. Zebrafish: a model system for the study of eye genetics. *Progress in Retinal and Eye Research* 27, 89–110.
- Fallahtafti, S., Rantanen, T., Brown, R.S., Snieckus, V., Hodson, P. V, 2012. Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic Toxicology 106-107, 56–64.
- Fanget, B., Devos, O., Naffrechoux, E., 2002. Rôle des acides humiques dans le transfert du pyrène entre les minéraux argileux et l'eau. *Revue des Sciences de l'Eau* 15, 95–108.
- Farrington, J.W., 1991. Biogeochemical processes governing exposure and uptake of organic pollutant compounds in aquatic organisms. Environmental Health Perspectives 90, 75– 84.
- Farrington, J.W., Westall, J., 1986. Organic chemical pollutants in the oceans and groundwater: a review of fundamental chemical properties and biogeochemistry, in: The role of the oceans as a waste disposal option (Ed.), Springer Netherlands, pp. 361–425.
- Farwell, A., Nero, V., Croft, M., Bal, P., Dixon, D.G., 2006. Modified Japanese medaka embryo-larval bioassay for rapid determination of developmental abnormalities. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 600–607.
- Feiler, U., Höss, S., Ahlf, W., Gilberg, D., Hammers-Wirtz, M., Hollert, H., Meller, M., Neumann-Hensel, H., Ottermanns, R., Seiler, T.-B., Spira, D., Heininger, P., 2013. Sediment contact tests as a tool for the assessment of sediment quality in German waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 32, 144–155.

- Ferreira, M., Moradas-Ferreira, P., Reis-Henriques, M. a, 2005. Oxidative stress biomarkers in two resident species, mullet (*Mugil cephalus*) and flounder (*Platichthys flesus*), from a polluted site in River Douro Estuary, Portugal. *Aquatic Toxicology* 71, 39–48.
- Festing, M.F.W., Baumans, V., Combes, R.D., Halder, M., Howard, B.R., Lovell, D.P., Moore, G.J., Overend, P., Wilson, M.S., 1998. Reducing the Use of Laboratory Animals in Biomedical Research : Problems and Possible Solutions. *Alternatives To Laboratory Animals* 26, 283–301.
- Flammarion, P., Garric, J, 1997. Cyprinids EROD activities in low contaminated rivers: a relevant statistical approach to estimate reference levels for EROD biomarker. *Chemosphere*, 35: 2375-2388.
- Flecknell, P.A., 1994. Refinement of animal use assessment and alleviation of pain and distress. *Laboratory Animal* 28:222-231
- Fleisch, V.C., Neuhauss, S.C.F., 2006. Visual behavior in zebrafish. Zebrafish 3, 191-201.
- Forbes, V.E., Palmqvist, A., Bach, L., 2006. The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 272–280.
- Fraysse, B., Mons, R., Garric, J., 2006. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 253–267.
- Freeman, D.J., Cattell, C.R., 1990. Woodburning as a source of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* 24 : 1581-1585.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research* 681, 80–92.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Del Barga, I., Nigro, M., Förlin, L., Bolognesi, C., Sturve, J., 2004. DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Göteborg harbour. *Mutation Research* 552, 187–195.

<u>G</u>

- Gagliano, M., McCormick, M.I., 2009. Hormonally mediated maternal effects shape offspring survival potential in stressful environments. *Oecologia* 160, 657–665.
- Gagnon, M.M., Holdway, D.A., 2000. Environmental contamination and toxicology EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to the Water Accommodated Fraction of crude oil and to chemically dispersed crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 38, 70–77.
- Garrigues, P., Budzinski, H., Manitz, M.P., Wise, S.A., 1995. Pyrolytic and petrogenic inputs in recent sediments: a definitive signature through phenanthrene and chrysene compound distribution. *Polycyclic Aromatic Compounds* 7, 275–284.

- Geffard, O., Budzinski, H., LeMenach, K., 2004. Chemical and ecotoxicological characterization of the "Erika" petroleum : Bio-tests applied to petroleum water-accommodated fractions and natural contaminated samples. *Aquatic Living Resources* 17, 289–296.
- Gerlai, R., 2011. A small fish with a big future: zebrafish in behavioral neuroscience. *Reviews in the Neurosciences* 22, 3–4.
- GESAMP, 1993. Impact of oil and related chemicals on the marine environment, Reports and Studies No. 50. London.
- GESAMP, 2007. Estimates of oil entering the marine environment from sea-based activities, Reports and Studies No. 75. London.
- Gilliers, C., Le Pape, O., Désaunay, Y., Morin, J., Guérault, D., Amara, R., 2006. Are growth and density quantitative indicators of essential fish habitat quality? An application to the common sole *Solea solea* nursery grounds. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 69, 96–106.
- Goksøyr, A., Förlin, L., 1992. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology* 22 : 287-312.
- Gonçalves, R., Scholze, M., Ferreira, A.M., Martins, M., Correia, A.D., 2008. The joint effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on fish behavior. *Environmental Research* 108, 205–213.
- González, J.J., Viñas, L., Franco, M.A., Fumega, J., Soriano, J.A., Grueiro, G., Muniategui, S., López-Mahía, P., Prada, D., Bayona, J.M., Alzaga, R., Albaigés, J., 2006. Spatial and temporal distribution of dissolved/dispersed aromatic hydrocarbons in seawater in the area affected by the Prestige oil spill. *Marine Pollution Bulletin* 53, 250–259.
- González-Doncel, M., González, L., Fernández-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* 87, 280–288.
- González-Doncel, M., San Segundo, L., Sastre, S., Tarazona, J.V., Torija, C.F., 2011. Dynamics of BNF-induced in vivo ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity during embryonic development of medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology* 105, 421–7.
- Görge, G., Nagel, R., 1990. Kinetics and metabolism of 14C-lindane and 14C-atrazine in early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Chemosphere* 21, 1125–1137.
- Gourlay-Francé, C., Delmas, F., Mazzella, N., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. Que sait-on de la biodisponibilité des contaminants dissous dans le milieu aquatique? *Sciences Eaux & Territoires* 1, 6–11.

- Gravato, C., Santos, M. a, 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicology and environmental safety* 51, 115–27.
- Greiner, A.C., Spyckerelle, C. Albrecht, P., Ourisson, G., 1977. Hydrocarbures aromatiques d'origine géologique. V. Dérivés mono- et di- aromatiques du hopane. *Journal Chemical Reearch*, Miniprint, 3829-3871.
- Guasch, H., Ginebreda, A., Geiszinger, A., Akkanen, J., Slootweg, T., Mäenpää, K., Agbo, S., Gallampois, C., Kukkonen, J.V.K., 2012. Bioavailibility of Organic Contaminants in Freshwater Environments. In: Emerging and Priority Pollutants in Rivers, The Handbook of Environmental Chemistry. Springer Berlin Heidelberg. pp. 25–53.
- Guengerich, F.P., 1993. Bioactivation and detoxication of toxic and carcinogenic chemicals. *Drug Metabolism and Disposition*, 21, 1-6.

<u>H</u>

- Haffter, P., Granato, M., Brand, M., Mullins, M.C., Hammerschmidt, M., Kane, D. a, Odenthal, J., van Eeden, F.J., Jiang, Y.J., Heisenberg, C.P., Kelsh, R.N., Furutani-Seiki, M., Vogelsang, E., Beuchle, D., Schach, U., Fabian, C., Nüsslein-Volhard, C., 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio. Development* 123, 1–36.
- Hagger, J.A., Jones, M.B., Leonard, D.R.P., Owen, R., Galloway, T.S., 2006. Biomarkers and integrated environmental risk assessment: are there more questions than answers? *Integrated Environmental Assessment and Management* 2, 312–329.
- Haitzer, M., Höss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C., 1999. Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology* 45, 147–158.
- Halder, M., Léonard, M., Iguchi, T., Oris, J.T., Ryder, K., Belanger, S.E., Braunbeck, T. a, Embry, M.R., Whale, G., Norberg-King, T., Lillicrap, A., 2010. Regulatory aspects on the use of fish embryos in environmental toxicology. *Integrated Environmental* Assessment and Management 6, 484–491.
- Halliwell, B., 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *The FASEB journal*, 1(5), 358-364.
- Harris, J.R.W., Cleary, J.J., Valkirs, A.O., 1996. Particle-Water Partitioning and the Role of Sediments as a Sink and Secondary Source of TBT. In: Champ MA, Seligman PF (eds) Organotin. Springer Netherlands, pp 459-473.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., Tice, R.R., 2003. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18, 45–51.
- Harvey, P.W., Johnson, I., 2002. Approaches to the assessment of toxicity data with endpoints related to endocrine disruption. *Journal of Applied Toxicology* 22, 241–247.

- Hawkins, W.E., Walker, W.W., Overstreet, R.M., Lytle, J.S., 1990. Carcinogenic effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons on the Japanese medaka and guppy in waterborne exposures. *Science of the Total Environment* 94, 155–167.
- Hawkins, W.E., Walker, W.W., Overstreet, R.M., Lytle, T.F., Lytle, J.S., 1988. Dose-related carcinogenic effects of water-borne benzo[a]pyrene on livers of two small fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 16, 219–231.
- Hawliczek, A., Nota, B., Cenijn, P., Kamstra, J., Pieterse, B., Winter, R., Winkens, K., Hollert, H., Segner, H., Legler, J., 2012. Developmental toxicity and endocrine disrupting potency of 4-azapyrene, benzo[b]fluorene and retene in the zebrafish *Danio rerio. Reproductive Toxicology* 33, 213–223.
- Heintz, R.A., Rice, S.D., Wertheimer, A.C., Bradshaw, R.F., Thrower, F.P., Joyce, J.E., Short, J.W., 2000. Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon Oncorhynchus gorbuscha after exposure to crude oil during embryonic development. Marine Ecology Progress Series 208, 205–216.
- Heintz, R.A., Short, J.W., Rice, S.D., 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating dowstream from weathered Exxon Valdez crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 494–503.
- 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, 232–239.
- Hicken, C.E., Linbo, T.L., Baldwin, D.H., Willis, M.L., Myers, M.S., Holland, L., Larsen, M., Stekoll, M.S., Rice, S.D., Collier, T.K., Scholz, N.L., Incardona, J.P., 2011. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America 108, 7086–7090.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicological Sciences* 86, 6–19.
- Hisaoka, K.K., Battle, H.I., 1958. The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan). *Journal of Morphology* 102, 311–327.
- Hoffmann, J.L., Oris, J.T., 2006. Altered gene expression: a mechanism for reproductive toxicity in zebrafish exposed to benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology* 78, 332–40.
- Hollert, H., Dürr, M., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2000. Cytotoxicity of settling particulate matter and sediments of the neckar river (Germany) during a winter flood. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 528–534.
- Hollert, H., Keiter, S., König, N., Rudolf, M., Ulrich, M., Braunbeck, T., 2003. A new sediment contact assay to assess particle-bound pollutants using zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Journal of Soils Sediments* 3, 197–207.

- Hollis, E.H., Boone, J.G., De Rose, C.R., Murphy, G.J., 1964. Literature review of the effects of turbidity and siltation on aquatic life.
- Hornung, M.W., Cook, P.M., Flynn, K.M., Lothenbach, D.B., Johnson, R.D., Nichols J.W., 2004. Use of multi-photon laser-scanning microscopy to describe the distribution of xenobiotic chemicals in fish early life stages. *Aquatic Toxicology* 67 (1):1-11.
- Hose, J.E., Hannah, J.B., DiJulio, D., Landolt, M.L., Miller, B.S., Iwaoka, W.T., Felton, S.P., 1982. Effects of benzo(a)pyrene on early development of flatfish. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 11, 167–171.
- Hose, J.E., Hannah, J.B., Landolt, M.L., Miller, B.S., Felton, S.P., Iwaoka, W.T., 1981. Uptake of benzo[α]pyrene by gonadal tissue of flatfish (family pleuronectidae) and its effects on subsequent egg development. *Journal of Toxicology and Environmental* Health 7, 991–1000.
- Hose, J.E., Mcgurk, M.D., Marty, G.D., Hinton, D.E., Brown, E.D., Baker, T.T., 1996. Sublethal effects of the Exxon Valdez oil spill on herring embryos and larvae: morphological, cytogenetic, and histopathological assessments, 1989 – 1991. Canadian *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 2355–2365.
- Höss, S., Ahlf, W., Fahnenstich, C., Gilberg, D., Hollert, H., Melbye, K., Meller, M., Hammers-Wirtz, M., Heininger, P., Neumann-Hensel, H., Ottermanns, R., Ratte, H.-T., Seiler, T.-B., Spira, D., Weber, J., Feiler, U., 2010. Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination--determination of toxicity thresholds. *Environmental Pollution* 158, 2999–3010.
- Hsu, P., Matthäi, A., Heise, S., Ahlf, W., 2007. Seasonal variation of sediment toxicity in the Rivers Dommel and Elbe. *Environmental Pollution* 148 (3):817-823.
- Hutchinson, T.H., Sobé, J., Kloepper-Sams, P.J., 1998. Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (eat) database III-Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. *Chemosphere* 36, 129–142.
- Hylland, K., 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 69, 109–123.

Ī

- Incardona, J.P., Carls, M.G., Day, H.L., Sloan, C. a, Bolton, J.L., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2009. Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific herring (*Clupea pallasi*) exposed to crude oil during weathering. *Environmental Science and Technology* 43, 201–207.
- Incardona, J.P., Carls, M.G., Teraoka, H., Sloan, C., 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., 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., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2010. Oil spills and fish health: exposing the heart of the matter. *Journal of exposure science & environmental epidemiology* 21, 3–4.
- Incardona, J.P., Day, H.L., Collier, T.K., Scholz, N.L., 2006. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 308–21.
- 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.
- Inzunza, B., Orrego, R., Peñalosa, M., Gavilán, J.F., Barra, R., 2006. Analysis of CYP4501A1, PAHs metabolites in bile, and genotoxic damage in *Oncorhynchus mykiss* exposed to Biobío River sediments, Central Chile. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 65, 242–251.
- Iwamatsu, T., 2004. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. Mechanisms of Development 121 (7-8):605-618

J

- Johnson, L.L., Casillas, E., Collier, T.K., McCain, B.B., Varanasi, U., 1988. Contaminant effects on ovarian development in English sole (*Parophrys vetulus*) from Puget Sound, Washington. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45, 2133–2146.
- Johnson, L.L., Collier, T.K., Stein, J.E., 2002. An analysis in support of sediment quality thresholds for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to protect estuarine fish. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 12, 517–538.
- Jones, K.D., Tiller, C.L., 1999. Effect of solution chemistry on the extent of binding of phenanthrene by a soil humic acid: a comparison of dissolved and clay bound humic. *Environmental Science & Technology* 33, 580–587.
- Jonsson, G., Bechmann, R.K., Bamber, S.D., Baussant, T., 2004. Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 1538–1548.

K

Kammann, U., Biselli, S., Hühnerfuss, H., Reineke, N., Theobald, N., Vobach, M., Wosniok, W., 2004. Genotoxic and teratogenic potential of marine sediment extracts investigated with comet assay and zebrafish test. *Environmental Pollution* 132, 279–287.

- Kanan, R., 2012. Développements méthodologiques pour l'extraction et l'analyse des polluants organiques d'intérêt pour l'environnement marin: Application aux hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse Université Bordeaux 1, France.
- Keiter, S., Rastall, A., Kosmehl, T., Wurm, K., Erdinger, L., Braunbeck, T., Hollert, H., 2006. Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube River. A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environmental Science and Pollution Research* 13, 308–319.
- Keith, L.H., Telliard, W.A., 1979. Priority pollutants. I-a perspective view. *Environmental Science and Technology* 13, 416–423.
- Kemp, P., Sear, D., Collins, A., Naden, P., Jones, I., 2011. The impacts of fine sediment on riverine fish. *Hydrological Processes* 25, 1800–1821.
- Kerambrun, E., Henry, F., Courcot, L., Gevaert, F., Amara, R., 2012a. Biological responses of caged juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophtalmus maximus*) in a polluted harbour. *Ecological Indicators* 19, 161–171.
- Kerambrun, E., Henry, F., Marechal, A., Sanchez, W., Minier, C., Filipuci, I., Amara, R., 2012b. A multibiomarker approach in juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 45–53.
- Kerambrun, E., Henry, F., Perrichon, P., Courcot, L., Meziane, T., Spilmont, N., Amara, R., 2012c. Growth and condition indices of juvenile turbot, *Scophthalmus maximus*, exposed to contaminated sediments: Effects of metallic and organic compounds. *Aquatic Toxicology* 108, 130–140.
- Kerambrun, E., Le Floch, S., Sanchez, W., Thomas Guyon, H., Meziane, T., Henry, F., Amara, R., 2012d. Responses of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*, exposed to acute concentrations of crude oil, as assessed by molecular and physiological biomarkers. *Chemosphere* 87, 692–702.
- Kerambrun, E., Sanchez, W., Henry, F., Amara, R., 2011. Are biochemical biomarker responses related to physiological performance of juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) caged in a polluted harbour? *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* 154, 187–95.
- Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Brain Journal Cancer 26, 239–257.
- Kilemade, M.F., Hartl, M.G.J., Sheehan, D., Mothersill, C., Van Pelt, F.N. a M., O'Halloran, J., O'Brien, N.M., 2004. Genotoxicity of field-collected inter-tidal sediments from Cork Harbor, Ireland, to juvenile turbot (*Scophthalmus maximus L.*) as measured by the Comet assay. *Environmental and molecular mutagenesis* 44, 56–64.
- Kim, I.-Y., Hyun, C.-K., 2006. Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 64, 288–297.

- 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.
- Kimmel, C.B., Law, R.D., 1985a. Cell lineage of zebrafish blastomeres. Part I: Cleavage patterna anc cytoplasmic bridges between cells. *Developmental Biology* 108, 78–85.
- Kimmel, C.B., Law, R.D., 1985b. Cell lineage of zebrafish blastomeres. Part II: Formation of the yolk syncital layer. *Developmental Biology* 108, 86–93.
- Knecht, A.L., Goodale, B.C., Truong, L., Simonich, M.T., Swanson, A.J., Matzke, M.M., Anderson, K. a, Waters, K.M., Tanguay, R.L., 2013. Comparative developmental toxicity of environmentally relevant oxygenated PAHs. *Toxicology and Applied Pharmacology* 271, 266–275.
- Kocan, R.M., Hose, J.E., Brown, E.D., Baker, T.T., 1996. Pacific herring (*Clupea pallasi*) embryo sensitivity to Prudhoe Bay petroleum hydrocarbons: laboratory evaluation and in situ exposure at oiled and unoiled sites in Prince William Sound. Canadian *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 2366–2375.
- Kokel, D., Bryan, J., Laggner, C., White, R., Cheung, C.Y.J., Mateus, R., Healey, D., Kim, S., Werdich, A.A., Haggarty, S.J., Macrae, C.A., Shoichet, B., Peterson, R.T., 2010. Rapid behavior-based identification of neuroactive small molecules in the zebrafish. *Nature Chemical Biology* 6, 231–237.
- Kokel, D., Peterson, R.T., 2011. Using the zebrafish photomotor response for psychotropic drug screening. Methods Cell Biology 105, 517–524.
- Kooijman, S.A.L.M., Bedaux, J.J.M., 1996. The analysis of aquatic toxicity data, VU Univers. ed. HV Amsterdam.
- Kopecka-Pilarczyk, J., Correia, A.D., 2009. Biochemical response in gilthead seabream (*Sparus aurata*) to in vivo exposure to a mix of selected PAHs. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1296–302.
- Kosmehl, T., Hallare, A. V, Braunbeck, T., Hollert, H., 2008. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutation Research* 650, 1–14.
- Kosmehl, T., Hallare, A. V, Reifferscheid, G., Manz, W., Braunbeck, T., Hollert, H., 2006. A novel contact assay for testing genotoxicity of chemicals and whole sediments in zebrafish embryos. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 2097–2106.
- Kosmehl, T., Krebs, F., Manz, W., Braunbeck, T., Hollert, H., 2007. Differentiation between bioavailable and total hazard potential of sediment-induced DNA fragmentation as measured by the comet assay with zebrafish embryos. *Journal of Soils Sediments* 7, 377–387.

Köthe, H., 2003. Existing Sediment Management Guidelines: An Overview What will happen with the sediment / dredged material? *Journal of Soils and Sediments* 3, 139–143.

L

- Laale, H.W., 1977. The biology and use of zebrafish , *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review. *Journal of Fish Biology* 10, 121–173.
- Laflamme, R.E., Hites, R.A., 1978. The global distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in recent sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 42, 289–303.
- Lagadic, L., Caquet, T., Amiard, J.C., 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie: aspects fondamentaux, Paris Mass. ed.
- Lamberson, J.O., DeWitt, T.H., Swartz, R.C., 1992. Assessment to sediment toxicity to marine benthos, in: Sediment Toxicity Assessment. Lewis, Chelsea, MI, USA, pp. 183– 210.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T., 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology*. *Part C, Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* 149, 196–209.
- Landrum, P.F., Lotufo, G.R., Gossiaux, D.C., Gedeon, M.L., Lee, J.-H., 2003. Bioaccumulation and critical body residue of PAHs in the amphipod, *Diporeia spp*: additional evidence to support toxicity additivity for PAH mixtures. *Chemosphere* 51, 481–489.
- Laor, Y., Farmer, W.J., Aochi, Y., Strom, P.F., 1998. Phenanthrene binding and sorption to dissolved and to mineral-associated humic acid. *Water Research* 32, 1923–1931.
- Larcher, T., Perrichon, P., Vignet, C., Ledevin, M., Le Menach, K., Lyphout, L., Landi, L., Clerandeau, C., Le Bihanic, F., Ménard, D., Burgeot, T., Akcha, F., Cachot, J., Cousin, X., Submitted. Carcinogenic but no genotoxic effects detected following chronic trophic exposure of zebrafish to 3 fractions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Environmental Science and Pollution Research*.
- Law, R.J., 1978a. Petroleum hydrocarbon analyses conducted following the wreck of the supertanker Amoco Cadiz. *Marine Pollution Bulletin* 9, 293–296.
- Law, R.J., 1978b. Determination of petroleum hydrocarbons in water, fish and sediments following the Ekofisk blow-out. *Marine Pollution Bulletin* 9, 321–324.
- Lawrence, A., Hemingway, K., 2003. Effects of pollution on fish, molecular effects and population responses. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK.
- Lawrence, C., 2007. The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. Aquaculture 269, 1–20.

- Le Bihanic, F., Perrichon, P., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X., Cachot, J., Submitted. Development of a reference artificial sediment for chemical testing adapted to the MELA sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Le Bihanic, F., Sommard, V., Grasset, J., Berrada, S., Budzinski, H., Cousin, X., Morin, B., Cachot, J., Submitted. Benzo[a]anthracene testing with micronucleus and locomotion assays as new integrative endpoints for the medaka embryo larval assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*.
- Le Dû-Lacoste, M., 2008. Etude des phénomènes de biotransformation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) par les organismes aquatiques (poissons). Relation exposition-genotoxicité. Thèse Université Bordeaux 1, France.
- Le Dû-Lacoste, M., Akcha, F., Dévier, M.-H., Morin, B., Burgeot, T., Budzinski, H., 2013. Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. *Environmental Science and Pollution Research* 20, 690–707.
- Lee, R.F., Anderson, J.W., 2005. Significance of cytochrome P450 system responses and levels of bile fluorescent aromatic compounds in marine wildlife following oil spills. *Marine Pollution Bulletin* 50, 705–723.
- Lee, R.F., Sauerheber, R., Dobbs, G.H., 1972. Uptake, metabolism and discharge of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine fish. *Marine Biology* 17, 201–208.
- Lema, S.C., Schultz, I.R., Scholz, N.L., Incardona, J.P., Swanson, P., 2007. Neural defects and cardiac arrhythmia in fish larvae following embryonic exposure to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE 47). *Aquatic Toxicology* 82, 296–307.
- Li, R., Zuo, Z., Chen, D., He, C., Chen, R., Chen, Y., Wang, C., 2011. Inhibition by polycyclic aromatic hydrocarbons of ATPase activities in *Sebastiscus marmoratus* larvae: relationship with the development of early life stages. *Marine Environmental Research* 71, 86–90.
- Linney, E., Upchurch, L., Donerly, S., 2004. Zebrafish as a neurotoxicological model. *Neurotoxicology and Teratology* 26, 709–718.
- Lockwood, B., Bjerke, S., Kobayashi, K., Guo, S., 2004. Acute effects of alcohol on larval zebrafish: a genetic system for large-scale screening. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 77, 647–654.
- Lucas, J., Bonnieux, A., Lyphout, L., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X., Miramand, P., Lefrançois, C., Submitted. Trophic contamination by pyrolytic aromatic hydrocarbons does not affect aerobic metabolic scope in zebrafish *Danio rerio*. Aquatic Toxicology.
- Lundebye, A.K., Berntssen, M.H.G., Wendelaar Bonga, S.E., Maage, A., 1999. Biochemical and physiological responses in atlantic salmon (*Salmo salar*) following dietary exposure to copper and cadmium. *Marine Pollution Bulletin* 39, 137–144.

- Luoma, S.N., Ho, K., 1992. The appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays, in: The Handbook of Ecotoxicology. pp. 193–226.
- Lyons, B.P., Stentiford, G.D., Green, M., Bignell, J., Bateman, K., Feist, S.W., Goodsir, F., Reynolds, W.J., Thain, J.E., 2004. DNA adduct analysis and histopathological biomarkers in European flounder (*Platichthys flesus*) sampled from UK estuaries. *Mutation Research* 552, 177–186.

M

- Mackay, D., Shiu, W.Y., Ma, K.C., 1992. Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, vol. II. Lewis Publishers, Chelsea, MI. p. 59.
- MacPhail, R.C., Brooks, J., Hunter, D.L., Padnos, B., Irons, T.D., Padilla, S., 2009. Locomotion in larval zebrafish: Influence of time of day, lighting and ethanol. *Neurotoxicology* 30, 52–58.
- Magi, E., Bianco, R., Ianni, C., Di Carro, M., 2002. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the sediments of the Adriatic Sea. *Environmental Pollution* 119, 91–98.
- Mann, M.D., Crouse, D.A., Prentice, E.D., 1991. Appropriate animal numbers in biomedical research in light of animal welfare considerations. *Laboratory Animal Science* 41, 6–14.
- Martinez-Gomez, C., Vethaak, A.D., Hylland, K., Burgeot, T., Köhler, A., Lyons, B.P., Thain, J., Gubbins, M.J., Davies, I.M., 2010. A guide to toxicity assessment and monitoring effects at lower levels of biological organization following marine oil spills in European waters. *Journal of Marine Science* 67, 1105–1118.
- Marty, G.D., Hose, J.E., McGurk, M.D., Brown, E.D., Hinton, D.E., 1997. Histopathology and cytogenetic evaluation of Pacific herring larvae exposed to petroleum hydrocarbons in the laboratory or in Prince William Sound, Alaska, after the <I>Exxon Valdez</I> oil spill. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54, 1846–1857.
- Matson, C.W., Timme-Laragy, A.R., Di Giulio, R.T., 2008. Fluoranthene, but not benzo(a)pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish. *Chemosphere* 74 (1):149-154
- Maximino, C., Herculano, A.M., 2010. A review of monoaminergic neuropsychopharmacology in zebrafish. *Zebrafish* 7, 359–78.
- Mayer, P., Fernqvist, M.M., Christensen, P.S., Karlson, U., Trapp, S., 2007. Enhanced diffusion of polycyclic aromatic hydrocarbons in artificial and natural aqueous solutions. *Environmental Science and Technology* 41, 6148–6155.
- Mazéas, O., Budzinski, H., 2005. Solid-phase extraction and purification for the quantification of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites in fish bile. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383, 985–990.

- Mccormick, M.I., 1999. Experimental test of the effect of maternal hormones on larval quality of a coral reef fish. *Oecologia* 18, 412–422.
- McElroy, A.E., Barron, M.G., Beckvar, N., Driscoll, S.B.K., Meador, J.P., Parkerton, T.F., Preuss, T.G., Steevens, J., 2011. A review of the tissue residue approach for organic and organometallic compounds in aquatic organisms. *Integrated Environmental Assessment and Management* 7, 50–74.
- McElroy, A.E., Bogler, A., Weisbaum, D., Norris, M., Mendelman, L.V., Setlow, R., Winn, R., 2006. Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in λ transgenic medaka embryos exposed to benzo(α)pyrene dosed sediments. *Marine Environmental Research* 62 (Supplement 1):S273-S277
- McGurk, M.D., Brown, E.D., 1996. Egg-larval mortality of Pacific herring in Prince William Sound , Alaska, after the Exxon Valdez oil spill. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55, 2343–2354.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1995. Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 143, 79–165.
- Menzie, C.A., Hoeppner, S.S., Cura, J.J., Freshman, J.S., Lafrey, E.N., 2002. Urban and suburban storm water runoff as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to Massachusetts estuarine and coastal environments 25, 165–176.
- Menzie, C.A., Potocki, B.B., Santodonato, J., 1992. Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. Environmental Science and Technology 26, 1278–1284.
- 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.
- Middaugh, D.P., Chapman, P.J., Shelton, M.E., 1996. Responses of embryonic and larval inland silversides, *Menidia beryllina*, to a water-soluble fraction formed during biodegradation of artificially weathered Alaska North Slope crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 410–419.
- Middaugh, D.P., Shelton, M.E., Mckenney, C.L., Cherr, G., Chapman, P.J., Courtney, L.A., 1998. Preliminary observations on responses of embryonic and larval pacific herring, *Clupea pallasi*, to neutral fraction biodegradation products of weathered Alaska north slope oil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 196, 188–196.
- Milinkovitch, T., Godefroy, J., Théron, M., Thomas-Guyon, H., 2011a. Toxicity of dispersant application: Biomarkers responses in gills of juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Environmental Pollution* 159, 2921–2928.
- Milinkovitch, T., Imbert, N., Sanchez, W., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., 2013a. Toxicological effects of crude oil and oil dispersant: biomarkers in the heart of the

juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88, 1–8.

- 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, 865–71.
- Milinkovitch, T., Ndiaye, A., Sanchez, W., Le Floch, S., Thomas-Guyon, H., 2011b. Liver antioxidant and plasma immune responses in juvenile golden grey mullet (*Liza aurata*) exposed to dispersed crude oil. *Aquatic Toxicology* 101, 155–164.
- Milinkovitch, T., Thomas-Guyon, H., Lefrançois, C., Imbert, N., 2013b. Dispersant use as a response to oil spills: toxicological effects on fish cardiac performance. *Fish Physiology and Biochemistry* 39, 257–262.
- Miller, M.A., Amrhein, J.F., 1995. Maternal transfer of organochlorine compounds in lake superior siscowet (*Salvelinus namaycush siscowet*) to their eggs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 55, 96–103.
- Miller, T.J., Crowder, L.B., Rice, J.A., 1993. Ontogenetic changes in behavioural and histological measures of visual acuity in three species of fish. *Environmental Biology of Fishes* 37, 1–8.
- Monteiro, P R R, Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000. Plasma steroid levels in female flounder (*Platichthys flesus*) after chronic dietary exposure to single polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research* 49, 453–467.
- Monteiro, Pedro Ribeiro Rocha, Reis-Henriques, M.A., Coimbra, J., 2000. Polycyclic aromatic hydrocarbons inhibit in vitro ovarian steroidogenesis in the flounder (*Platichthys flesus L.*). Aquatic Toxicology 48, 549–559.
- Monteverdi, G.H., Di 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 Toxicology and Chemistry* 19, 2512–2518.
- Morin, B., Filatreau, J., Vicquelin, L., Barjhoux, I., Guinel, S., Leray-Forget, J., Cachot, J., 2011. Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 399, 2235–42.
- Morton, D.B., 1995. Advances in refinement in animal experimentation over the past 25 years. *ATLA* 23:812-822.
- Mos, L., Cooper, G. a, Serben, K., Cameron, M., Koop, B.F., 2008. Effects of diesel on survival, growth, and gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fry. *Environmental Science and Technology* 42, 2656–2662.
- Muhling, B.A., Roffer, M.A., Lamkin, J.T., Ingram, G.W., Upton, M.A., Gawlikowski, G., Muller-Karger, F., Habtes, S., Richards, W.J., 2012. Overlap between Atlantic bluefin tuna spawning grounds and observed Deepwater Horizon surface oil in the northern Gulf of Mexico. *Marine Pollution Bulletin* 64, 679–687.

- Myers, M.S., Landahl, J.T., Krahn, M.M., McCain, B.B., 1991. Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. *Environmental Health Perspectives* 90, 7–15.
- Myers, M.S., Stehr, C.M., Olson, O.P., Johnson, L.L., McCain, B.B., Chan, S.-L., Varanasi, U., 1994. Relationship beteen toxicopathic hepatic lesionis and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the Pacific coas. *Environmental Health Perspectives* 102, 200–215.

N

- Nacci, D.E., Kohan, M., Pelletier, M., George, E., 2002. Effects of benzo[a]pyrene exposure on a fish population resistant to the toxic effects of dioxin-like compounds. *Aquatic Toxicology* 57, 203–215.
- Nagel, R., 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio--*a general model in ecotoxicology and toxicology. *Altex* 19, 38–48.
- Nagler, J.J., Cyr, D.G., 1997. Exposure of male american plaice (*Hippoglossoides platessoides*) to contaminated marine sediments decreases the hatching success of their progeny. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1733–1738.
- Nebert, D.W., Dalton, T.P., Okey, A.B., Gonzalez, F.J., 2004. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 23847–23850.
- Neff, J.M., 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological applied. Science Publishers, UK.
- Neff, J.M., 1984. Bioaccumulation of organic micropollutants from sediments and suspended particulates by aquatic animals. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 319, 132–136.
- Neff, J.M., Stout, S.A., Gunster, D.G., 2005. Ecological risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments: identifying sources and ecological hazard. *Integrated Environmental Assessment and Management* 1, 22–33.
- Nia, Y., Garnier, J.M., Rigaud, S., Hanna, K., Ciffroy, P., 2011. Mobility of Cd and Cu in formulated sediments coated with iron hydroxides and/or humic acids: A DGT and DGT-PROFS modeling approach. *Chemosphere* 85 (9):1496-1504.
- Nigro, M., Frenzilli, G., Scarcelli, V., Gorbi, S., Regoli, F., 2002. Induction of DNA strand breakage and apoptosis in the eel *Anguilla anguilla*. *Marine Environmental Research* 54, 517–520.
- Niimi, A.J., Dookhran, G.P., 1989. Dietary absorption efficiencies and elimination rates of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 8, 719–722.

- Nogueira, P., Lourenço, J., Rodriguez, E., Pacheco, M., Santos, C., Rotchell, J.M., Mendo, S., 2009. Transcript profiling and DNA damage in the European eel (*Anguilla anguilla L.*) exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Aquatic toxicology* 94, 123–30.
- Norcross, B.L., Hose, J.E., Frandsen, M., Brown, E.D., 1996. Distribution, abundance, morphological condition, and cytogenetic abnormalities of larval herring in Prince William Sound, Alaska, following the (Exxon Valdez) oil spill. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 53, 2376–2387.
- Noury, P., Geffard, O., Tutundjian, R., Garric, J., Ecotoxicologie, L., 2006. Non destructive in vivo measurement of ethoxyresorufin biotransformation by zebrafish prolarva: development and application. *Environmental Toxicology* 324–331.
- NRC, 2003. Oil in the sea III: Inputs, fates, and effects. National Academies of Sciences, Washington D C.
- 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.

<u>0</u>

- OECD, 1992. Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 203: Fish, acute toxicity test".
- OECD, 1998. Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 212: Fish, Short-term toxicity test on embryo ans sac-fry stages.
- OECD, 2004. Guidelines for the testing of chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 218: Sediment-water chironomid toxicity test using spiked sediment.
- OECD, 2013a. Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 236: Fish, Embryo Aucte Toxicity (FET) Test.
- OECD, 2013b. Guidelines for the testing chemicals, Section 2: Effects on biotic systems, Test No. 210: Fish, ealy-life stage toxicity test.
- 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 Total Environment* 396, 70–78.
- Orger, M.B., Smear, M.C., Anstis, S.M., Baier, H., 2000. Perception of Fourier and non-Fourier motion by larval zebrafish. *Nature Neuroscience* 3, 1128–1133.
- Örn, S., Andersson, P., Förlen, L., Tysklind, M., Norrgren, L., 1998. The impact on reproduction of an orally administered mixture of selected PCBs in zebrafish (*Danio rerio*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 35, 52–57.
- OSPAR, 2004. Guidelines for monitoring the environmental impact of offshore oil and gas activities, Ref. 2004-11E. Oslo and Paris commissions, London.

Otte, J.C., Schmidt, A.D., Hollert, H., Braunbeck, T., 2010. Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 100, 38–50.

<u>P, Q</u>

- Padilla, S., Cowden, J., Hinton, D.E., Yuen, B., Law, S., Kullman, S.W., Johnson, R., Hardman, R.C., Flynn, K., Au, D.W.T., 2009. Use of medaka in toxicity testing., in: Current Protocols in Toxicology. pp. 1–36.
- Padilla, S., Hunter, D.L., Padnos, B., Frady, S., MacPhail, R.C., 2011. Assessing locomotor activity in larval zebrafish: Influence of extrinsic and intrinsic variables. *Neurotoxicology* and *Teratology* 33, 624–630.
- Palmork, K.H., Solbakken, J.E., 1981. Distribution and elimination of [9-14C]Phenanthrene in the Horse mussel (*Modiola modiolus*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 26, 196–201.
- Parichy, D.M., Elizondo, M.R., Mills, M.G., Gordon, T.N., Engeszer, R.E., 2009. Normal table of postembryonic zebrafish development: staging by externally visible anatomy of the living fish. *Developmental Dynamics* 238, 2975–3015.
- Parng, C., Anderson, N., Ton, C., McGrath, P., 2004. Zebrafish apoptosis assays for drug discovery. *Methods in cell biology* 76, 75–85.
- 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, 267–78.
- Péan, S., 2012. Effets des polluants organiques persistants sur le comportement des poissons. Thèse Université La Rochelle, France.
- Péan, S., Daouk, T., Vignet, C., Lyphout, L., Leguay, D., Loizeau, V., Bégout, M.-L., Cousin, X., 2013. Long-term dietary-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring. *Neurotoxicology and Teratology* 39, 45–56.
- Perrichon, P., Le Bihanic, F., Bustamante, P., Le Menach, K., Budzinski, H., Cousin, X., Submitted. Comparative sensitivity of embryo-larval toxicity assay with zebrafish (*Danio rerio*) and Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following sediment contact assay. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Peterson, C.H., Rice, S.D., Short, J.W., Esler, D., Bodkin, J.L., Ballachey, B.E., Irons, D.B., 2003. Long-term ecosystem response to the Exxon Valdez oil spill. Science 302, 2082– 2086.
- Pollino, C.A., Georgiades, E., Holdway, D.A., 2009. Physiological changes in reproductively active rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*) following exposure to naphthalene. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1265–1270.

- Pollino, C.A., Holdway, D.A., 2002. Toxicity testing of crude oil and related compounds using early Life stages of the crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia fluviatilis*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 52, 180–189.
- Priede, I.G., 1983. Heart rate telemetry from fish in the natural environment. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 76, 515-524.
- Pritchard, J.B., 1993. Aquatic toxicology: past, present, and prospects. *Environmental Health Perspectives* 100, 249–257.

R

- Randall, D.J., Connell, D.W., Yang, R., Wu, S.S., 1998. Concentrations of persistent lipophilic compounds in fish are determined by exchange across the gills, not through the food chain. *Chemosphere* 37, 1263–1270.
- Ravindra, K., Wauters, E., Van Grieken, R., 2007. Poster 34 Spatial and temporal variations in articulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) levels over Menen (Belgium) and their relation with air mass trajectories. *Developments in Environmental Science*, 6, 838-841.
- Reynaud, S., Deschaux, P., 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology* 77, 229–38.
- Rhodes, S., Farwell, A., Hewitt, L.M., Mackinnon, M., Dixon, D.G., 2005. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 60, 247– 258.
- Rice, C.A., Myers, M.S., Willis, M.L., French, B.L., Casillas, E., 2000. From sediment bioassay to fish biomarker--connecting the dots using simple trophic relationships. *Marine Environmental Research* 50, 527–33.
- Rice, S.D., Thomas, R.E., Carls, M.G., Heintz, R.A., Alex, C., Murphy, M.L., Short, J.W., Moles, A., Wertheimer, A.C., Michael, L., 2001. Impacts to pink salmon following the Exxon Valdez oil spill: persistence, toxicity, sensitivity, and controversy. *Reviews in Fisheries Science* 9, 165–211.
- Rihel, J., Prober, D., Arvanites, A., Lam, K., Zimmerman, S., Jang, S., Haggarty, S.J., Kokel, D., Rubin, L.L., Peterson, R.T., Schier, A.F., 2010. Zebrafish behavioral profiling links drugs to biological targets and rest/wake regulation. *Science* 327, 348–351.
- Roberts, D.A., 2012. Causes and ecological effects of resuspended contaminated sediments (RCS) in marine environments. *Environment International* 40 (0):230-243.
- Rocha, P.S., Bernecker, C., Strecker, R., Mariani, C.F., Pompêo, M.L.M., Storch, V., Hollert, H., Braunbeck, T., 2011. Sediment-contact fish embryo toxicity assay with Danio rerio to assess particle-bound pollutants in the Tietê River Basin (São Paulo, Brazil). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74 (7):1951-1959.

- Roeser, T., Baier, H., 2003. Visuomotor behaviors in larval zebrafish after GFP-guided laser ablation of the optic tectum. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 3726–34.
- Rooker, J.R., Kitchens, L.L., Dance, M., Wells, R.J.D., Falterman, B., Cornic, M., 2013. Spatial, temporal, and habitat-related variation in abundance of pelagic fishes in the gulf of Mexico: potential implications of the deepwater horizon oil spill. *PloS one* 8, 1–9.

Russell, W.M.S., Burch, R.L., 1959. The Principles of humane experimental technique 1–5.

<u>S</u>

- Saeed, T., Al-Mutairi, M., 2000. Comparative composition of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the sea water-soluble fractions of different Kuwaiti crude oils. *Advances in Environmental Research* 4, 141–145.
- Saint-amant, L., Drapeau, P., 1998. Time course of the development of motor behaviors in the zebrafish embryo. *Journal of Neurobiology* 37, 622–632.
- Sakari, M., 2012. Depositional history of polycyclic aromatic hydrocarbons: reconstruction of petroleum pollution record in peninsular Malaysia, in: Dr. Tomasz Puzyn (Ed.), Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention *Environmental and Analytical Update*.
- Schmeltz, I., Hoffmann, D., 1976. Formation of polynuclear aromatic hydrocrabons from combustion of organic matter. In *Carcinogenesis-A comprehensive survey. Vol. 1. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. Chemistry, Metabolism, and Carcinogenesis.* Raven Press, New York. 225-240.
- Schneider, C. a, Rasband, W.S., Eliceiri, K.W., 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods 9, 671–675.
- Scholz, S., Fischer, S., Gündel, U., Küster, E., Luckenbach, T., Voelker, D., 2008. The zebrafish embryo model in environmental risk assessment-applications beyond acute toxicity testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 394–404.
- Schultz, T.W., 1989. Nonpolar narcosis: a review of the mechanism of action for baseline aquatic toxicity. In: Williams UMCaLR (ed) Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 12th Volume, ASTM STP 1027, vol 12th American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp 104-109.
- Scott, J. a, Incardona, J.P., Pelkki, K., Shepardson, S., Hodson, P. V, 2011. AhR2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene. Aquatic Toxicology 101, 165–174.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., Tao, S., 2013. Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environmental Science and Technology* 47, 6415–6424.
- Sies, H., 1991. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *The American journal of medicine*, 91(3), S31-S38.
- Singer, M.M., Aurand, D., Bragin, G.E., Clark, J.R., Coelho, G.M., Sowby, M.L., 2000. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *Marine Pollution Bulletin* 40, 1007–1016.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental cell research* 175, 184–191.
- Soclo, H.H., Garrigues, P.H., Ewald, M., 2000. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coastal marine sediments : case studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) areas. *Marine Pollution Bulletin* 40, 387–396.
- 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, 13–34.
- Spitsbergen, J., Kent, M., 2003. The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research - Advantages and Current Limitations. *Toxicologic Pathology* 31, 62–87.
- Stegeman, J.J., 1987. Cytochrome P450 isozymes and monoxygenase activity in aquatic animals. *Environmental Health Perspectives* 71, 87-95.
- Strähle, U., Scholz, S., Geisler, R., Greiner, P., Hollert, H., Rastegar, S., Schumacher, A., Selderslaghs, I., Weiss, C., Witters, H., Braunbeck, T., 2012. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments--a commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. *Reproductive Toxicology* 33, 128– 132.
- Strmac, M., Oberemm, A., Braunbeck, T., 2002. Effects of sediment eluates and extracts from differently polluted small rivers on zebrafish embryos and larvae. *Journal of Fish Biology* 61, 24–38.
- Sundberg, H., Hanson, M., Liewenborg, B., Zebühr, Y., Broman, D., Balk, L., 2007. Dredging Associated Effects: Maternally Transferred Pollutants and DNA Adducts in Feral Fish. *Environmental Science and Technology* 41 (8):2972-2977.
- Sun, Y., Yu, H., Zhang, J., Yin, Y., Shi, H., Wang, X., 2006. Bioaccumulation, depuration and oxidative stress in fish *Carassius auratus* under phenanthrene exposure. *Chemosphere* 63, 1319–27.

T

ter Laak, T.L., ter Bekke, M.A., Hermens, J.L.M., 2009. Dissolved organic matter enhances transport of PAHs to aquatic organisms. *Environmental Science and Technology* 43 (19):7212-7217.

- Thomas, P., 1990. Teleost model for studying the effects of chemicals on female reproductive endocrine function. *The Journal of Experimental Zoology Supplement* 4, 126–128.
- Thomas, P., Budiantara, L., 1995. Reproductive life history stages sensitive to oil and naphthalene in Atlantic croaker. *Marine Environmental Research* 39, 147–150.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206–221.
- Tilghman Hall, A., Oris, J.T., 1991. Anthracene reduces reproductive potential and is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. *Aquatic Toxicology* 19, 249–264.
- Tilseth, S., Solberg, T.S., Westrheim, K., 1984. Sublethal effects of the Water-Soluble Fraction of Ekofisk crude oil on the early larval stages of cod (*Gadus morhua L.*). *Marine Environmental Research* 11, 1–16.
- Tronczynski, J., Munschy, C., Héas-Moisan, K., Guiot, N., Truquet, I., Olivier, N., Men, S., Furaut, A., 2004. Contamination of the Bay of Biscay by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) following the T/V "Erika" oil spill. *Aquatic Living Resources* 259, 243–259.
- Tronczynski, J., Munschy, C., Vincent, F., Thouvenin, B., 2003. Les contaminants organiques qui laissent des traces : sources, transport et devenir. *Fascicule Seine Aval* 1–40.
- Turcotte, D., Akhtar, P., Bowerman, M., Kiparissis, Y., Brown, R.S., Hodson, P. V, 2011. Measuring the toxicity of alkyl-phenanthrenes to early life stages of medaka (*Oryzias latipes*) using partition-controlled delivery. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 487–495.
- Tuvikene, A., 1995. Responses of fish to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Annales Zoologici Fennici 32, 295–309.

U, V

- Usenko, C.Y., Robinson, E.M., Usenko, S., Brooks, B.W., Bruce, E.D., 2011. PBDE developmental effects on embryonic zebrafish. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 1865–1872.
- Van der Jagt, K., Munn, S., Torslov, J., de Bruijn, J., 2004. Alternative approaches can reduce the use of test animals under REACH. Addendum to the report of the European Commission: Assessment of additional testing needs under REACH effects of(Q)SARS, risk based testing and voluntary industry initiatives 1–85.
- Van der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13, 57–149.

- Van der Ven, L.T.M., Wester, P.W., Vos, J.G., 2003. Histopathology as a tool for the evaluation of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology* and Chemistry 22, 908–913.
- Van Tiem, L.A., Di Giulio, R.T., 2011. AHR2 knockdown prevents PAH-mediated cardiac toxicity and XRE- and ARE-associated gene induction in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* 254, 280–287.
- Vanzella, T.P., Martinez, C.B.R., Cólus, I.M.S., 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species. *Mutation Research* 631, 36–43.
- Varanasi, U., Reichert, W.L., Stein, J.E., Brown, D.W., Sanborn, H.R., 1985. Bioavailability and biotransformation of aromatic hydrocarbons in benthic organisms exposed to sediment from an urban estuary. *Environmental Science and Technology* 19, 836–841.
- Venkatesan, M.I., 1988. Occurrence and possible sources of perylene in marine sediments a review. *Marine Chemistry* 25, 1–27.
- Vicquelin, 2011. Caractérisation fine de la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques vis-à-vis des embryons et des larves de medaka japonais, Oryzias latipes. Contribution à l'évaluation des risques environnementaux associés à la pollution chimique des sédimen. Thèse University Le Havre, France.
- 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.
- Vignet, C., Le Menach, K., Mazurais, D., Lucas, J., Perrichon, P., Le Bihanic, F., Devier, M.-H., Lyphout, L., Frère, L., Bégout, M.-L., Zambonino-Infante, J.-L., Budzinski, H., Cousin, X., Submitted. Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I: Survival and growth. *Environmental Science and Pollution Research*.
- Voelker, D., Vess, C., Tillmann, M., Nagel, R., Otto, G.W., Geisler, R., Schirmer, K., Scholz, S., 2007. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae. *Aquatic Toxicology* 81, 355–364.

W

- Wakeham, S.G., Schaffner, C., Giger, W., 1980. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Recent lake sediments-I. Compounds having anthropogenic origins. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 44, 403–413.
- Weber, L.P., Kiparissis, Y., Hwang, G.S., Niimi, A.J., Janz, D.M., Metcalfe, C.D., 2002. Increased cellular apoptosis after chronic aqueous exposure to nonylphenol and quercetin in adult medaka (*Oryzias latipes*). *Comparative biochemistry and physiology*. *Toxicology* & pharmacology: CBP 131, 51–9.

- Wessel, N., Ménard, D., Pichavant-Rafini, K., Ollivier, H., Le Goff, J., Burgeot, T., Akcha, F., 2012. Genotoxic and enzymatic effects of fluoranthene in microsomes and freshly isolated hepatocytes from sole (*Solea solea*). *Aquatic Toxicology* 108, 33–41.
- Wessel, N., Ollivier, H., Goff, J. Le, Burgeot, T., 2010a. The toxicity of benzo [a] pyrene on sole (*Solea Solea*) hepatocytes : assessment of genotoxic and enzymatic effects. *Polycyclic Aromatic Compounds* 30, 346–354.
- Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach, K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., 2010b. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). *Marine Environmental Research* 69, S71– S73.
- Willett, K., Steinberg, M., Thomsen, J., Narasimhan, T.R., Safe, S., Mcdonald, S., Beattyt, K., Kennicuttt, 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, 93–103.
- Willett, K.L., Randerath, K., Zhou, G.D., Safe, S.H., 1998. Inhibition of CYP1A1-dependent activity by the polynuclear aromatic hydrocarbon (PAH) fluoranthene. *Biochemical Pharmacology* 55, 831–839.
- Willett, K.L., Wassenberg, D., Lienesch, L., Reichert, W., Di Giulio, R.T., 2001. In vivo and in vitro inhibition of CYP1A-dependent activity in *Fundulus heteroclitus* by the polynuclear aromatic hydrocarbon fluoranthene. *Toxicology and Applied Pharmacology* 177, 264–271.
- Wölz, J., Cofalla, C., Hudjetz, S., Roger, S., Brinkmann, M., Schmidt, B., Schäffer, A., Kammann, U., Lennartz, G., Hecker, M., Schüttrumpf, H., Hollert, H., 2009. In search for the ecological and toxicological relevance of sediment re-mobilisation and transport during flood events. *Journal of Soils Sediments* 9, 1–5.
- Wölz, J., Engwall, M., Maletz, S., Olsman Takner, H., van Bavel, B., Kammann, U., Klempt, M., Weber, R., Braunbeck, T., Hollert, H., 2008. Changes in toxicity and Ah receptor agonist activity of suspended particulate matter during flood events at the rivers Neckar and Rhine a mass balance approach using in vitro methods and chemical analysis. *Environmental Science and Pollution Research* 15 (7):536-553.
- Woo, S., Yum, S., Park, H.-S., Lee, T.-K., Ryu, J.-C., 2009. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Javanese medaka (*Oryzias javanicus*). Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & pharmacology 149, 289–99.

<u>X, Y, Z</u>

Xue, W., Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 206, 73–93.

- Yamashita, M., 2003. Apoptosis in zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 136, 731–742.
- Youngblood, W.W., Blummer, M., 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochimica Cosmochimica Acta*, 39: 1303-1314.
- Zar, J.H., 2010. Biostatistical analysis, 5th ed. Pe. ed. Upper Saddle River, New Jersey.
- Zielke, H., 2011. Time-related alterations and other confounding factors in direct sediment contact tests. Thesis RWTH Aachen.



ANNEXES

ANNEXE 1

Estimation et Coût consolidé de la thèse

	Montants en euros TTC						1	
	Nature de la dépense	Dét	ails	Nombre d'unités	Coûts tot Coût unitaire	Quote-part utilisation Total		Financement
1	Ressources Humaines	Salaire brut	Charges		moyen			
1.1	Doctorant + Encadrants + Techniciens + Stagiaire						0	CG17 + IFREMER + Université La
	• • • • •						400040	Rochelle
_	Sous-total Ressources Humaines						180848	
2	Consommables							
2.1	Pountailes experimentales Petits consommables au quotidien (Boites Petri, cones, parafilm, gants						-	
	masques, tubes eppendorf, cryotubes, pipettes, plaques 48 puits)				9843.58	40%	3937	IFREMER
	Analyses Comportement (Plaques 24 puits Krystal Blanc)			80	18.5		1480	IFREMER
	Analyses Genoloxicite (inities, iames + iamenes, cones, iddes 50 mil + Agarose LMPA, NMPA, solutions)				350	100%	350	IFREMER
	Analyses Chimiques (Tubes SPME 10ml, bécher 150 ml, solutions HAP				450	100%	450	LPTC BORDEAUX
	dedieles, Etranol)							
	Analyses q-PCR (microplaques, films, cones, kit sybr green qlagen, oligos)				5920	100%	5920	IFREMER
	Produits chimiques (Ethanol, methanol, PFA, Trizol, chloroforme,				9464.66	25%	2366	IFREMER
2.2	Fournitures de bureau (cahiers, stylos, calendrier, agenda)						100	IFREMER
2.3	Autres achats (Carboglace, Azote)						500	IFREMER
	Sous-total Consommables						15104	
3	Infrastructures							
2.1*	Coûts de foncitonnement (Entretien, gardiennage, secrétariat, électricité, eau,						404050	
3.1*	documentation)= Total des ressources humaines IFREMER x 63%.						104359	
3.2	Loyers des locaux				0		0	
	Sous-total Infrastructures						104359	
4	Matériel (amortissements)							
4.1	Matériel d'expérimentation							
	Ordinateurs d'analyse			4	800	25%	800	IFREMER
	Microscope électronique + Loupe binoculaire			1	17000	30%	5100	IFREMER
	Set de polansation microscope Illuminateur Fluorescence			1	701.25	15%	105	IFREMER
	Caméra DMK Imaging Source			2	520	35%	364	IFREMER
	Incubateur Spectrophotomètre			2	1500	40%	1200	IFREMER
	Zebrabox + caméra avec objectif			1	870	5%	44	IFREMER
	Cuve électrophorèse + UV			1	1000	2%	20	IFREMER
	a-PCR			1	20000	14%	2800	IFREMER
	GC-MS + Matériel d'analyse + Logiciel			1	100000	3%	3000	LPTC Bordeaux
	Analyse génotoxicité (cuve électrophorése, microscope électronique, fluorescence, caméra, ordinateur)			1	8652.5	5%	433	IFREMER Nantes
	Pipetman			4	230	60%	552	IFREMER
	Matériel d'expérimentation (Elevage, colonnes, aquariums+ entretiens)			1	69283	25%	17321	IFREMER IFREMER + Financement
4.2	Ordinateur de bureau			2		100%	2100	Personnel
4.3	Logiciels de bureau (Microsoft Office)	Ethouision		1	150 6604 E	100%	150	IFREMER
	Eugliciels d'analyse (Rometo, GCHWB, qPCR, Ethowston)	Komet6		1	2400	3%	72	IFREMER Nantes
4.4	Autres achats (disques durs)						500	
	Sous-total Matériel						36575	
5 5 1	Déplacements							
5.1	LPTC Bordeaux	Fabrication sédir	nent + enrobage				1873	IFREMER
5.0	IFREMER Nantes	Analyses ge	enotoxiques				399	IFREMER
5.2	Université d'Aix-La-Chapelle (Allemagne)	Apprentissad	e d'analyses				2400	COST STSM
5.3	Congrès en France							
	Séminaire EXECO, Arcachon Séminaire Paris						181	IFREMER
	Colloque des Doctorants de L'université de La Rochelle						0	Ecole Doctorale
54	Séminaire FREDD, lle d'Oléron						0	IFREMER
5.4	YES Meeting, Cracovie (Pologne)						352	SETAC + IFREMER
	PRIMO17, Faro (Portugal)						770	IFREMER
	Sous-total Déplacements						6067	
6 6 1	Formation	Autres (ti	ansport,					
0.1	Recherche Bibliographique (Endnote), IFREMER Nantes						78	IFREMER
	Expérimentation Animale, Ecole vétérinaire Nantes	69	96	1	2700	100%	3396	IFREMER
L	spécifique)			3	2000		917	Ecole Doctorale
	Techniques d'échantillonnage (Egletons)			1	200	100%	200	Ecole Doctorale
L	NCT			1	800	100%	140	Ecole Doctorale
6.2	Summer School ORQUE Pau			-			328	Ecole Doctorale
0.2	Autres trais (Inscription a runiversite)			3	403	100%	1209 6404	rmancement personnel
7	Sous-total Formation						0401	
7.1*	Affranchissements, Internet, téléphone							
7.2*	Publicité, communication, impressions			-				
7.3*	Documentation (périodiques, livres, bases de données, bibliothèque. etc.)			2	30	100%	60	IFKEIVIEK
7.4*	Autres							
L	Sous-total Documentation et communication						60	
10	TOTAL						349413	

* Le coefficient de structure sur coûts directs de personnel est de 63% pour 2013 (IFREMER, Tarification 2013).

Ces coûts incluents les frais encourus par l'institut en support général aux projets Ifremer: 1) Charges de fonctionnement des Centres, 2) Salaires et charges de fonctionnement des Directions fonctionnelles et 3) l'utilisation des réseaux informatiques.

ANNEXE 2

<u>Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic</u> <u>mixtures of PAHs through diet produce</u> <u>physiological disruptions in zebrafish – Part I:</u> <u>Suvival and growth</u>

Article soumis dans *Environmental Science and Pollution Research* Au sein de la revue spéciale ConPhyPoP: "PAHs and fish – Exposure monitoring and adverse effects – from molecular to individual level"

C. Vignet^a, K. Le Menach^b, D. Mazurais^c, J. Lucas^{a,d}, **P. Perrichon^a**, F. Le Bihanic^b, M-H. Devier^b, L. Lyphout^{a,e}, L. Frère^e, M-L. Bégout^e, J.-L. Zambonino-Infante^c, H. Budzinski^b, X. Cousin^{a,f*7}

^a Ifremer, Ecotoxicology Laboratory, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

^b University of Bordeaux 1, EPOC, UMR CNRS 5805, 33405 Talence, France

^c Ifremer, Unit Funct Physiol Marine Organisms, UMR 6539 LEMAR, 29280 Plouzané, France.

^d UMR 7266 Littoral Environnement Sociétés (LIENSs), Institut du Littoral et de l'Environnement - 2rue Olympe de Gouges, 17000 La Rochelle, France

^e Ifremer, Fisheries laboratory, Place Gaby Coll, BP7, 17137 L'Houmeau, France

^f INRA LPGP, Campus de Beaulieu, 35042 Rennes, France

* Corresponding author: Xavier Cousin – Xavier.cousin@ifremer.fr

 $Tel + 33 \ 5 \ 46 \ 50 \ 06 \ 21 - Fax + 33 \ 5 \ 46 \ 50 \ 06 \ 50$

Abstract

The release of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) into the environment has increased very substantially over the last decades leading to high concentrations in sediments in contaminated areas. To evaluate the consequences of long-term chronic exposure to PAHs, zebrafish were exposed, from their first meal (5 days post fertilisation) until they became reproducing adults, to diets spiked with three PAHs fractions at environmentally relevant concentrations (0.3X, 1X and 3X; with the 1X concentration being in the range of 4.6-6.7 µg.g-1 for total quantified PAHs). The fractions used were representative of PAHs of pyrolytic (PY) origin or of two different oils of differing compositions (a heavy fuel (HO) and a light crude oil (LO)). Fish growth was inhibited by all PAH fractions (-30 to 80% at 3 months for HO and LO depending on the concentration) and the effects were sex-specific: as determined with 9 month-old adults, exposure to 3X PY inhibited growth of females by 22%; exposure to 3X HO and LO inhibited male growth by 25% and 38%, respectively; also, 3X HO reduced survival (by 80%). Morphological analysis indicated a disruption of jaw growth in larvae, and intestinal and pancreatic enzyme activities were abnormal in 2 month-old exposed fish: these effects may contribute to the poor growth. Finally, our results indicate that PAH mixtures of different compositions, representative of situations encountered in the wild, can promote lethal and sublethal effects which are likely to be detrimental for fish recruitment.

Keywords: *Danio rerio*, lifecycle, polycyclic aromatic hydrocarbon, heavy oil, light crude oil, alkylated PAH, jaw, digestion

Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a diverse family of compounds containing at least two aromatic rings. There are two major types of PAHs, petrogenic and pyrogenic, which enter the environment through different routes. Petrogenic PAHs are abundant in oils and enter the aquatic environment due to harbour activity or as a consequence of oil spills. Pyrolytic PAHs result from the incomplete combustion of organic matter, including fossil fuel; they enter aquatic environments through the deposition of atmospheric emissions directly on water or on ground followed by soil runoff. The release of PAHs into the environment is directly linked to human activity and has increased over the last decades. For example, the amount of PAH emitted into the atmosphere has increased from under 50 000 tons in 1987 (Eisler 1987), to over 500 000 tons in 2004 (Zhang & Tao 2009). PAHs are hydrophobic molecules, and are found associated with suspended particulate matter in water, such that they tend to accumulate in sediments; consequently, sediments constitute major sinks and can also act as secondary sources for aquatic systems contamination (Hylland 2006). Monitoring networks have documented PAH concentrations of up to 50 µg g-1 dry weight (dw)in sediment from various affected aquatic ecosystems although the concentrations in highly contaminated areas is more commonly in the 10 µg.g-1 range (Baumard et al. 1998, Benlahcen et al. 1997, Cachot et al. 2006, Johnson et al. 2007, Varanasi et al. 1993, Yanagida et al. 2012). In all cases, PAHs are present as very complex mixtures and can be associated with metallic and/or other organic compounds. PAHs mixtures of pyrolytic and petrogenic origin differ in their composition. Pyrolytic mixtures generally include more heavy PAHs, such as benzo[a]pyrene (BaP), whereas petrogenic mixtures contain more light PAHs and more alkylated PAHs, mainly C1-C3 derivatives. Also, oils from different geographic origins display different compositions, and composition is also affected by the degree of refining.

Unlike some persistent organic pollutants, PAHs can be degraded in several different ways. Degradation can be the consequence of physico-chemical reactions, such as photo-oxidation, or of biological metabolism (phase I metabolism machinery). The concentration of PAH in the biota varies depending on the surrounding concentration and trophic level: in particular, the biota lower down the food chain may be exposed to high levels of PAHs in sediment or suspended particles. For example, the total concentration of 16 PAHs used as indicators by the US Environmental Protection Agency (US-EPA) in the copepod Eurytemora affinis in the Seine Estuary is in the 165–3866 ng.g-1 range (Cailleaud et al. 2007) and in

mussels can be as high as 1600 ng.g-1 (Le Goff et al. 2006). In the case of acute accidental exposure, the concentration in mussels can be even higher, for example 3 000 ng.g-1 after the Erika oil spill (Jeanneret et al. 2002) and 14 350 ng.g-1 after Exxon Valdez oil spill (Payne et al. 2008). PAHs bioaccumulate in parts of the lower levels of the food chain, and many of the organisms involved have poor metabolisation activities; consequently, food is an important route of exposure. This has been demonstrated by the high concentrations of PAHs found in the stomachs of fish caught in contaminated areas (Johnson et al. 2007, Varanasi et al. 1993, Yanagida et al. 2012).

PAHs toxicity has long been documented (see (Hylland 2006) for a review). In particular, the genotoxicity of PAHs has been described, and phase I detoxification enzymes, such as Cyp1a, are involved: they produce reactive epoxides that interact with DNA (Akcha et al. 2003, Collier et al. 1992b). The resulting structural disruption of DNA can lead to carcinogenesis and neoplasia, particularly in liver where PAHs are metabolised (Cachot et al. 2013, Collier et al. 1992a, Myers et al. 1994). Mechanistic studies have demonstrated that cyp1a expression is activated by the binding of PAHs to the aryl hydrocarbon receptor (AhR). Other toxicities of PAHs have been found to be based on the same mechanisms, and they include the blue sac disease (BSD), a syndrome affecting developing fish larva a disease also caused by other molecules including the best known AhR inducer, dioxin (Peterson et al. 1993, Prasch et al. 2003). This syndrome includes oedema, heart development defects and jaw morphology disruptions. Mechanistic analyses based on individual compounds have been very useful to identify the underlying molecular pathway but have also demonstrated that not all PAHs elicit the same responses. For example, different PAHs bind AhR with affinities ranging over several orders of magnitude (Barron et al. 2004). Generally, four and five-ring PAHs are stronger inducers than smaller PAHs of AhR (Barron et al. 2004, Billiard et al. 2002, Ohura et al. 2007). Combinations may lead to synergistic or no effects depending on the PAHs used (Billiard et al. 2008, Timme-Laragy et al. 2007), suggesting that PAHs may exert effects through several pathways and not only, or even necessarily, through AhR activation. The toxicity of smaller PAHs (characterised by a lower octanol water partition coefficient, log Kow < 5.2) is believed to be mediated by a narcotic mechanism induced by cell membrane disruption and accumulation of these small PAHs in the lipid bilayer (Sverdrup et al. 2002). Findings for wild-caught animals after oil spills and from experiments using oils, PAH mixtures or individual compounds, indicate that the growth of both freshwater and marine fish is inhibited by these agents. Growth inhibition has been reported both after aqueous (Moles &Rice 1983, Schuler et al. 2007) and diet exposure of juveniles (Kim et al. 2008, Meador et al. 2006, Wang et al. 1993, Wu et al. 2003). Embryonic exposure can have consequences on subsequent growth (Carls et al. 1999, Heintz et al. 1999). However, most experimental models of acute exposure have involved high dose and short duration. Both data from the field and experimental analyses reveal disruptions of jaw ontogenesis during embryonic development related to the BSD (Carls et al. 1999, Debruyn et al. 2007, Heintz et al. 1999, Incardona et al. 2004, Li et al. 2011, Marty et al. 1997, Shi et al. 2012). The experimental exposure of fish embryos to individual PAHs or oil mixtures has led to the identification of the underlying mechanisms (Incardona et al. 2005, Incardona et al. 2006). It has also been observed that short-term exposure of seabass juveniles to light cycle oil disrupts vertebral bone quality (Danion et al. 2011).

The ontogeny of the digestive functions in developing fish larvae is a key determinant of the physiological status of the future juvenile (Pittman et al. 2013, Zambonino-Infante et al. 2008). Paradoxically, how this ontogenic process could be affected by PAHs has not been studied. It is not known to what extent the adverse physiological effects of PAHs observed in juveniles is due to impairment of the digestive functions, although the developmental course of the digestive capacities parallels the course of the body growth rates (Buddington &Diamond 1992).

We exploited the short lifecycle of zebrafish to perform study long-term exposure to PAHs. Fish were exposed from the first meal (5dpf) and for the 9 following months, i.e. from larvae to reproducing adults. Three complex mixtures of PAHs representative of environmental situations, were used to spike the food: a pyrolitic (PY) fraction from sediment sampled in the Seine Estuary; and two petrogenic fractions, one from a heavy oil "Erika" (HO) and one from a light crude oil "Arabian light" (LO). We analyzed consequences of this exposure on survival, growth, jaw and bone morphology and digestive enzyme capacities.

Materials and methods

This study was conducted with the approval of the Animal Care Committee of France under the official licence of M.-L. Bégout (17-010).

PAH fraction preparation

Sediment was collected in Oissel (GPS: 46°11'55.65''N and 1°12401.54''O; downstream from Rouen, in the Seine Estuary, France) at low tide from the intertidal area.

Contaminants were extracted with Accelerated Solvent Extraction (ASE300, Dionex) using 34 mL cells with 13-14g of sediment per cells according to the following method: Heat: 5min, Static: 5min, Flush (%): 60vol, Purge: 60s, Number of cycles: 2, Pressure: 100bar, Temperature: 100°C, Solvent: 100% dichloromethane (DCM)).

The two oils were dissolved in pentane to induce asphaltene precipitation (Mazeas &Budzinski 2001, Mazeas &Budzinski 2002). The sediment extract and the two pentane extracts were then reconcentrated using a Vacuum Evaporation System (Rapidvap, Labconco, Kansas city, USA). All three extracts were then purified using alumina columns (preparative liquid chromatography) and eluted with dichloromethane (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium). After another re-concentration step, aliphatic fractions obtained after elution on silica columns with pentane were discarded and aromatic fractions were obtained using pentane/dichloromethane (65/35, v/v) as solvents (Mazeas &Budzinski 2001, Mazeas &Budzinski 2002). Atlantic Labo (Bruges, France) provided the pentane solvent. Finally, samples were re-concentrated and the final fractions kept in dichloromethane (stored at -20 °C) for spiking experiments. All the steps were gravimetrically controlled in order to prevent PAH losses and also to be able to express results in terms of quantity of the initial material (i.e. sediment or petroleums).

Metabolites quantification

At the end of exposure, 30 larvae were euthanized with a lethal dose of benzocaine (250 mg.l⁻¹) collected in microtubes. A maximum of liquid was removed and tubes frozen in liquid nitrogen. After grinding in acetate buffer at pH 5, larvae were extracted and metabolites were quantified in whole larvae according to published protocol (Devier et al. 2013, Le Du-Lacoste et al. 2013).

Food preparation

Zebrafish were exposed from their first meal (5 dpf) onward and exposure continued up to age 9 months. Spiked size-graded food pellets were used. The food pellets obtained from the supplier were 0.5 mm in diameter (INICIO Plus 0.5, Biomar, France); these pellets were ground and used to prepare food pellets of fours sizes: $\leq 125 \mu m$, 125-315 μm , 315-500 μm and $\geq 500 \mu m$. For pellets of all sizes and for all fractions used, the spiking procedure was similar other than vessel and solution volumes being adapted to the quantity of food to be spiked. The method described by Vicquelin et al. (2011) was used for spiking. The three types of aromatic fractions were dissolved in DCM. Briefly, the adequate amount of dry food was placed in a round-bottom glass flask and immerged in dichloromethane. Then, aromatic fractions obtained from the natural sediment from Seine estuary and the two petroleums were added with quantities in relation with amount needed to reach the target final concentration. Solvent evaporation was performed using a rotavapor (RV10 Basic, VWR International) equipped with a heating water bath (HB10 Basic, VWR International) set at 45 °C until the food was visually completely dry. Potentially remaining traces of organic solvent 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 PAH contamination was characterized. Three concentrations, 0.3X, 1X and 3X were used with the 1X concentration corresponding to the Σ [16 EPA PAH] at 5µg.g-1 food, representative of the concentrations found in mollusks in the Seine Estuary. Diets were analyzed before being used (see Table 1 and Supplementary Material Table 2 for details of the composition). Diets are named according to the origin of the fraction and its concentration: the 1X pyrolytic fraction diet is thus PY-1X.

Fish rearing and exposure

We used TU strain (ZFIN ID: 76 ZDB-GENO-990623-3) which has been established in our platform (PEP – http://wwz.ifremer.fr/pep) for 6 years as large batches of individuals originating from the Amagen platform (Gif/Yvette, France) and the Pasteur Institute fish facility (Paris, France). Adults were maintained at 27°C under a controlled 14 hour light/10 hour dark (14:10) photoperiod. Water was a mix of reverse osmosis-treated water and tap water, both being filtered beforehand through dust and charcoal filters, to obtain a pH of 7.5 \pm 0.5 and a conductivity of 300 \pm 50 µS.cm-1. Ammonia, nitrites, and nitrates were monitored weekly and remained within recommended ranges (Lawrence 2007). Eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish placed together in spawning boxes the evening before collection (AquaSchwarz, Germany). Eggs were collected in the morning of day 0 (D0) and the fertilisation rate assessed within two hours of collection: only spawns with rate above 80% were kept. At the same time, spawn was sorted to remove faeces and dead and unfertilised embryos. To provide as homogeneous and similar incubation conditions as possible, a minimum of five spawns were mixed and 50 embryos randomly sampled and transferred to as many Petri dishes as required for all conditions on D1 (24 hpf, see Fig. 1 for rearing planning). Petri dishes were filled with E3 solution (5mM NaCl, 0.17mM KCl, 0.33mM CaCl2, 0.33mM MgSO4). Exposures to PY, HO and LO were performed successively and all exposures were performed in triplicate. Embryos and larvae were maintained at 28°C in Petri dishes in an incubator with the same photoperiod as for adults. After hatching, chorions were removed manually. On D5, larvae (N=50) were transferred into 1L tanks (spawning box without inserts; AquaSchwarz, Germany) containing 100 mL of E3 solution. Dead or abnormally developed larvae were removed and replaced with larvae from reserve Petri dishes. Between D6 and D11, larvae were maintained in the 1 L tanks and 150 mL of water was added every day. On D12, larvae were placed in a Plexiglas© cylinder of 15 cm in diameter and 17 cm in height with the bottom end closed with a 500 µm-pore mesh cloth and transferred into 10L rearing tanks (Ehret, Polycarbonate PC 3108, type III cage, 265x150x240) placed in the flow-through exposure rack with a water-dripping system and air bubbling into the cylinder. Cylinders were removed on D27 and the juveniles were then freed into the 10L tanks. In the flow-through system, water was automatically added every hour leading to an exchange rate of 180-200mL/hour/tank corresponding to daily renewal of approximately 40% of the water. Outflow water was collected and treated with activated charcoal before being discharged into the sewer (Disposorb, Chemviron, France). Tanks were manually cleaned daily from D5 to D27 and thereafter as necessary; in particular, dead fish were removed and counted.

From D5 onward, fish were fed twice a day with size-adapted food and once a day with A0 artemia. The size of the food pellets provided was increased as the fish aged (at some ages fish received two sizes of pellets): $\leq 125 \mu m$ between D5 and D20, 125-315 μm between D15 and D30, 315-500 μm between D25 and D55 and $\geq 500 \mu m$ from D50 (see Fig. 1). One food vial was used for each tank and weighed before and after use to measure rations. The ration was ad libitum until the first biometric measures (2 or 3 months post fertilisation (mpf)); thereafter, the quantity of food provided was 2% of the biomass in each tank, with the exception of the PY spiked food, for which the ration was 5% at 2 mpf and then reduced to 2% at 3 mpf. Rations were then adapted after each biometry on a monthly basis.



Figure 1: Exposure schedule. Breeding and feeding timelines are indicated above and below the central arrow. Main steps and transfer times between different containers are presented in breeding timeline while pellet diameter of successive diets and changes between them are presented in the feeding timeline.

Fish survival and growth monitoring

Survival rates were assessed on a daily basis from D5 to D27 and then at each biometric analysis. Fish growth was monitored on a monthly basis from 2 to 3 mpf onward. Fish were anaesthetized for 1 min with benzocaïne (50mg.L⁻¹) and individual standard length (mm, to the nearest mm) and body mass (mg, to the nearest mg) were measured, and sex recorded when possible (on the basis of morphological clues).

Larval morphology

Calcified structures were stained by immersing live larvae in calcein as described in (Du et al. 2001). Briefly larvae were transferred into neutralised calcein solution (0.2% in water; Sigma-Aldrich) in Petri dishes for 10 minutes; they were then rinsed three times in water and allowed to stand for 10 min. Larvae were then euthanized in benzocaine (50 mg.L⁻¹) and mounted on depression glass slides with methyl-cellulose (3%) and imaged using a dissecting microscope with a green fluorescence filter. Calcified vertebrae were manually counted and jaw landmark coordinates as defined by (Xiong et al. 2008) obtained using ImageJ (Schneider et al. 2012).

Digestive enzyme studies

Samples of 20 to 30 fish were collected in triplicate 2mpf from each experimental group, killed by anaesthesia, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at -80°C pending dissection and assays.

Following exposure to HO and LO, a significant effect on larval growth was observed, so we sampled the fish after a nutritional challenge (one week of starvation, followed by refeeding for 2 days) to evidence the digestive capacities better.

Fish were dissected on a glass slide maintained at 0° C: the intestine and a segment containing pancreas (and also, inevitably, a crude mixture of liver, heart and stomach tissue) were dissected. Protocols for the homogenisation of the pancreatic segments and intestine, protein assays, and enzymatic procedures for amylase, trypsin, alkaline phosphatase (AP) and leucine-alaninepeptidase (leu-ala) were as described in Zambonino-Infante et al. (1997). Enzyme activities are expressed as specific activities, i.e. units per mg of protein.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed with Statistica 9.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA). A general linear model (GLM) was applied in each case and the factors considered are indicated below for each variable. For distributed food, food size and diets were tested as fixed factors and replicates as random factors. For larval and adult survival, diet was tested as fixed factor and replicates as random factors, with the age of fish as an additional fixed factor for adults. To evaluate growth (body mass and length) diet and age were tested as fixed factors, and replicates and fish as random factors. To evaluate larval morphology, diet was tested as fixed factor, and replicates and fish as random factors. Digestion enzyme activities were analysed using one-way ANOVA, with the effects of each diet considered separately. All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance and only fixed factors and the interaction between them are presented in the text. Newman-Keuls post hoc tests were performed in each case.

Results

Diets and fish exposure

The concentration for the 16 US-EPA PAHs in 1X diets were PY-1X: 4505 ± 1527 , LO-1X: 2739 ± 231 and HO-1X: 1887 ± 130 ng.g-1 (Table 1). With reference to the 5 µg.g-1 targeted concentration for the 16 US-EPA PAHs for 1X diets, the spiking efficiencies for the three fractions were between 38 and 100%. The best efficiency was obtained with the PY fraction [81-100%]. Efficiencies for HO fraction were around 40% [38-42%] and for LO fractions around 58% [55-63%]. The spiked diets also included PAHs other than the 16 US-EPA PAHs, for example 2-ring methylated PAHs (methylnaphtalenes; MN) and 3-ring methylated PAHs (methylnaphtalenes; MP+MA). The total concentration of PAHs was similar in the three 1X diets 5816 ± 1433 , 4663 ± 360 and 6726 ± 278 ng.g-1 dw for PY, HO and LO respectively.

Mixture	Concentration	Σ[16 EPA PAH]	Spiking efficiency (%)	MeNaph	MePhe	Total PAHs concentration
 PY food	Solv.	28 ± 5		13 ± 14	6 ± 3	55 ± 12
	0.3X	1343 ± 499	81	21 ± 7	65 ± 19	1763 ± 468
	1X	4505 ± 1527	90	61 ± 17	204 ± 54	5816 ± 1433
	3X	15073 ± 4285	100	178 ± 60	668 ± 157	18151 ± 4983
 HO food	Solv.	39 ± 30		6 ± 2	2 ± 2	47 ± 33
	0.3X	698 ± 460	42	300 ± 20	530 ± 324	1633 ± 71
	1X	1887 ± 130	38	657 ± 52	1448 ± 144	4663 ± 360
	3X	5947 ± 217	40	2113 ± 202	4122 ± 581	14317 ± 813
LO food	Solv.	33 ± 26		5 ± 1	2 ± 2	40 ± 29
	0.3X	1053 ± 63	63	878 ± 38	640 ± 35	2572 ± 96
	1X	2739 ± 231	55	2183 ± 197	1804 ± 67	6726 ± 278
	3X	8335 ± 854	56	6282 ± 1465	4957 ± 731	19574 ± 1945

Table 1: Summarized PAHs concentration for produced diets.

Mean \pm SD in ng/g of food; n=4-7.

The fraction compositions differed in the relative proportion of PAHs, MN and MP+MA (Table 2). The proportions of these compounds differed accordingly in diets reflecting the fraction composition for PY and HO diets. However, the PAH proportions were higher and MN proportions lower in the LO diet than expected from the composition of the LO fraction. The PY diet contained a high proportion of high molecular weight PAHs — 82%

were 4-6 ring compounds — and very few methylated derivatives (5%; Fig. 2 and supplementary table 2).

		Fractions		Diets					
	PY	НО	LO	PY	HO	LO			
PAHs	94	51	27	95 ± 0	55 ± 1	41 ± 1			
MN	2	16	46	1 ± 0	14 ± 1	33 ± 1			
MP+MA	4	32	27	4 ± 0	31 ± 2	26 ± 1			

Percentage of each group in fractions or diets. Fractions; n=1; Diets (mean \pm SD; n=1-3). PAHs: sum of non-alkylated PAHs; MN: methylnaphtalenes; MP+MA: methylphenanthrenes and methylanthracenes



Figure 2: Comparison of the proportions of PAHs compounds in PY, HO and LO diets based on ring numbers and substitutions. Non-substituted compounds are grouped by the number of rings (2R to 6R). Substituted compounds are grouped as 2-rings methylnaphtalenes (MN) and 3-methylphenanthrenes and methylanthracenes (MP+MA). The number indicated after the ; indicates the proportion of each class in the diet

The two oil diets contained small amounts of high molecular weight PAHs: 31%, mainly 4-ring compounds in the HO diet and only 6% in the LO diet. The oil diets contained abundant methylated PAHs: 43 for the HO diet and 55% for the LO diet. The HO diet contained twice as much 3-ring than 2-ring methylated PAHs whereas in LO diet these two categories were present in similar amounts. The same results were found for all diet concentrations and pellet sizes (not shown). Quantification of hydroxylated metabolites (OH-

PAHs) was performed on 15 dpf larvae to confirm fish exposure (Table 3). A global dosedependent increase of metabolites was observed with some specificities. The sum of OH-PAHs of HO-3X and LO-3X was similar to those for 1X concentration. For PY, metabolites increase with PAHs concentration in diet. A more detailed analysis revealed that these differences are driven by different metabolites depending on the mixture (Table 3). The concentration of 2-OH-biphenyl is significantly higher in LO-1X compared to control. For PY and HO mixture, the concentration of 1-OH-pyrene and the sum of OH-BaP metabolites was higher in 3X larvae than in the control.

To verify that differences in growth and survival were not due to uneven food distribution, we compared cumulated food distributed, for each granulometry and each diet, during the first three month of exposure. Whatever the mixture used, there was no difference in the ration distributed to the various experimental groups (PY: F=0.09; p=0.96; HO: F=0.27; p=0.85; LO: F=0.05; p=0.98). Thereafter, the food ration was adapted according to biometry as indicated.

 Table 3: Metabolite concentrations in 15 dpf larvae

			DV				HO	11	,		10	
Metabolites	Solvent	0.3X	11	3X	Solvent	0.3X	110	3X	Solvent	0.3X	11	3X
Wietabolites	Solvent	0.5A	11	54	Solvent	0.5A	17	54	Solvent	0.5A	11	54
∑ OH-naphtalenes	1 ± 0	1 ± 0	2.3 ± 1.2	1.7 ± 1.2	1 ± 0	1.7 ± 1.2	1.7 ± 1.2	3 ± 0	1 ± 0	2.3 ± 1.2	1 ± 0	1.7 ± 1.2
2 OHBi	1.5 ± 0	1.5 ± 0	8.5 ± 6.3	16.1 ± 14	2 ± 1.5	3.1 ± 1.2	39.3 ± 38	9.7 ± 14.1	1.5 ± 0	8.7 ± 3.8	$\textbf{28.6} \pm \textbf{17.7}$	12.6 ± 14.7
∑ OH-phenanthrenes	0.5 ± 0	0.5 ± 0	0.8 ± 0.3	1 ± 0.5	0.5 ± 0	0.5 ± 0	0.5 ± 0	1 ± 0.9	0.5 ± 0	0.5 ± 0	0.8 ± 0.3	1.6 ± 0.9
3-OH-fluorene	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0
1-OH-pyrene	2 ± 0.3	7 ± 0.8	15.3 ± 1	$\textbf{84.3} \pm \textbf{11.7}$	2.2 ± 0.4	4.3 ± 1.4	5.7 ± 1.9	$\textbf{18.2} \pm \textbf{8.2}$	2.7 ± 1	2.1 ± 0.8	2.9 ± 0.5	4.6 ± 0.8
1-OH-chrysene	0.7 ± 0	0.7 ± 0	1.5 ± 0.7	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	1.1 ± 0.8	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0	0.7 ± 0
∑ OH-benzo[a]pyrene	0.7 ± 0	0.7 ± 0	9.1 ± 4.9	$\textbf{34.6} \pm \textbf{0.7}$	0.7 ± 0	0.7 ± 0	1.9 ± 1	13.7 ± 7	0.7 ± 0	1.1 ± 0.8	1.6 ± 0.8	1.9 ± 1.2
Σ OH-HAP	2 ± 0.3	7.2 ± 0.7	33.8 ± 3.7	136 ± 22.1	3.7 ± 1.5	7.8 ± 3	46.6 ± 38.5	$\textbf{42.3} \pm \textbf{18.2}$	2.8 ± 0.7	11.1 ± 3.9	$\textbf{33.1} \pm \textbf{18.5}$	20.1 ± 15.4

 \overline{M} ean \pm SD in ng/g of food; n=3. Values in bold are significantly different from their control (Dunn's multiple comparison test; p<0.05)

Survival

Survival was monitored daily from 5 to 30 dpf (Fig. 3). For all diets, the pattern was similar with high survival rates during the first 5 days of exposure (5-10 dpf) followed by a high rate of mortality ending at 15 dpf. After this peak, mortality remained low until 30 dpf. No early difference was observed between controls and fish exposed to any of the test diets ; this suggests that the mortality during this period was not a consequence of the exposure. A technical improvement of feeding methods is responsible for the higher survival rate of the fish in the LO (\sim 80%) than PY and HO (\sim 50%) experiments.

Survival was monitored until age 9 months (Table 4). There was a low rate of mortality throughout the time course for all diets and PAH concentrations, with the exception of the HO diet. Indeed, the survival of fish fed with the H0-3X diet was compromised from 3 mpf: survival rate of 38% versus 48% for control fish at 3 mpf, and17% at 6 mpf versus 47% for control fish. Because of this high mortality, and to avoid losing all HO-3X fish before analysis at late time points, these fish and 10 fish exposed to the two other HO concentrations and the control were sampled in all replicates at 6 months of age.

		P	Y		НО				LO			
-	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X
3 mpf	92	84	91	94	72	74	78	57	74	89	71	80
6 mpf	82	70	80	81	71	69	71	25	68	84	62	52
9 mpf	61	79	76	70	40	40	43	0	67	82	55	51
3 mpf	61.3 ± 4.8	56 ± 2	60.7 ± 3.7	62.7 ± 4.7	48 ± 1.2^{a}	$49.3\pm0.7^{\text{a}}$	52 ± 1.2^{a}	38 ± 2.3^{b}	49.3 ± 2.9	59.3 ± 5.7	47.3 ± 2.4	53.3 ± 2.7
6 mpf	54.7 ± 5.8	46.7 ± 1.8	53.3 ± 6.4	54 ± 1.2	47.3 ± 0.7^{a}	46 ± 1.2^{a}	$47.3\pm4.8^{\text{a}}$	16.7 ± 3.3^{b}	45.3 ± 3.7	56 ± 8.1	41.3 ± 4.1	34.7 ± 1.8
9 mpf	40.7 ± 3.7	46.0 ± 1.2	50.7 ± 5.2	46.7 ± 4.1	$43.3\pm1.8^{\text{a}}$	$43.3\pm3.3^{\texttt{a}}$	$45.3\pm4.7^{\text{a}}$		44.7 ± 3.3	54.7 ± 6.4	36.7 ± 4.4	34.0 ± 7.0
In HO d	iets 25 fish	were cample	d at 6 mnf in	all concentrat	ione Survival	percentage (mean + SEM	: n=3 replicat	es) Different	letters indica	te significant	

In HO diets, 25 fish were sampled at 6 mpf in all concentrations. Survival percentage (mean \pm SEM; n=3 replicates). Different letters indicate significant differences between concentrations and within ages.



Figure 3: Survival of larvae exposed to PY, HO and LO diets. Survival percentages for all concentrations for each diet over 25 days of exposure. (n=20, 28 and 21 replicates for PY, HO and LO respectively).

Growth

In all cases, growth on PAH diets was slower than control growth, and the effect was dose dependent, affecting both body mass and length (Table 5 and 6). By 4 mpf, control fish weighed significantly more $(355 \pm 122 \text{ mg})$ than fish fed PY-1X $(309 \pm 135 \text{ mg}, p=0.042)$ and PY-3X $(268 \pm 137 \text{ mg}; p<0.001)$ whereas. The difference was even larger at older ages (table 5). For HO diets, the body mass of fish fed HO-1X and HO-3X was significantly lower than controls at all ages considered. The body masses of fish exposed to each of the three LO concentrations was significantly lower than control fish from at 3 mpf. By 9 mpf, it was possible to identify the sex of fish unambiguously for all diets and concentrations; therefore , body mass was analysed separately for each sex at 9mpf. Males on PY diets did not differ from control males for any of the three concentrations. However, PY-1X and PY-3X females had a lower body mass than control females. For HO and LO diets, male body mass was reduced from control values in a dose-dependent manner. No difference was observed for HO females; LO-0.3X females had lower than control body mass.

The findings for standard length were generally similar to those for body mass, although there were some differences (Table 6). PY fish were shorter than controls: at 2 mpf body length of PY-3X fish was 1.7 ± 0.4 mm whereas that of controls was 2 ± 0.3 mm (p<0.001) and at 4 mpf body length of PY-1X fish was 2.5 ± 0.4 mm) and that of controls was 2.6 ± 0.2 mm (p=0.009). PY-1X and PY-3X fish were shorter than control fish at later time points. HO-3X fish were shorter than other fish from 3 mpf and HO-1X were significantly shorter than controls only at 9 mpf. The pattern of length differences between LO fish and controls was similar to than for body mass differences.

	РҮ				НО				LO			
	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X
3 mpf	202 ± 9	202 ± 10	190 ± 10	161 ± 10	130 ± 9^{a}	133 ± 11^{a}	91 ± 8^{b}	27 ± 4^{c}	109 ± 7^{a}	71 ± 5^{b}	77 ± 5 ^b	37 ± 3^{c}
6 mpf	707 ± 22^{a}	707 ± 21^{a}	615 ± 19^{b}	479 ± 16^{c}	265 ± 7^{a}	285 ± 13^{a}	214 ± 13^{b}	67 ± 10^{c}	246 ± 6^{a}	172 ± 6^{b}	$208 \pm 11^{\circ}$	140 ± 11^{b}
$9\mathrm{m}$	$518\pm28^{\text{ab}}$	583 ± 16^{a}	$518\pm19^{\text{ab}}$	471 ± 16^{b}	339 ± 12^{a}	322 ± 9^{a}	253 ± 13^{b}		320 ± 9^{a}	245 ± 8^{b}	273 ± 22^{b}	$199\pm20^{\rm c}$
9m ♀	879 ± 22^{a}	851 ± 27^{a}	758 ± 27^{b}	683 ± 27^{b}	361 ± 24	318 ± 33	327 ± 25		$345 \pm 15^{\text{ac}}$	249 ± 13^{b}	385 ± 19^{c}	327 ± 23^{a}

Table 5: Body mass of juveniles and adults exposed to PAH diets

Body mass (mg; mean \pm SEM; *n* see table 3). Different letters indicate significant differences between concentrations and within ages.

Table 6: Standard length of juveniles and adults exposed to PAH diets.

	PY				НО				LO			
	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X
3 mpf	$22.5\pm0.3^{\texttt{a}}$	22.4 ± 0.3^{a}	21.5 ± 0.4^{a}	20.2 ± 0.4^{b}	19 ± 0.4^{a}	18.8 ± 0.5^{a}	16.2 ± 0.4^{a}	11.3 ± 0.4^{b}	18.6 ± 0.4^{a}	15.8 ± 0.3^{b}	16.1 ± 0.4^{b}	$12.4 \pm 0.3^{\circ}$
6 mpf	$31.1\pm0.3^{\text{a}}$	$31.5\pm0.2^{\text{a}}$	$30.1\pm0.3^{\texttt{b}}$	$27.9\pm0.3^{\text{c}}$	$25.2\pm0.2^{\mathtt{a}}$	$25.2\pm0.3^{\text{a}}$	$22.2\pm0.4^{\text{a}}$	15.9 ± 0.7^{b}	24.3 ± 0.2^{a}	22.1 ± 0.2^{b}	22.6 ± 0.4^{b}	$19.2 \pm 0.5^{\circ}$
9 mpf	$33.3\pm0.3^{\text{a}}$	$32.9\pm0.2^{\texttt{a}}$	31.5 ± 0.2^{b}	$29.8\pm0.3^{\rm c}$	27.7 ± 0.3^{a}	$26.8\pm0.3^{\text{a}}$	$24.9\pm0.4^{\texttt{b}}$		25.7 ± 0.2^{a}	23.7 ± 0.3^{bc}	$24.8\pm0.3^{\text{ab}}$	$22.6\pm0.5^{\rm c}$

Standard length (mm; mean \pm SEM; *n* see table 3). Different letters indicate significant differences between concentrations and within ages.

Larval morphology and calcification pattern

Jaw morphology was assessed using specific landmarks allowing the measurement of anterior and posterior lengths and angles. The anterior length of PY-3X jaws was greater than that in controls. The jaws in HO-3X and LO-3X fish were shorter than controls (both anterior and posterior length; Fig 4A-D). The geometry of PY-3X jaws also differed from controls with a more acute angle of the anterior part (Supplementary figure 1). The calcification of vertebrae appeared more homogeneous, although the number of calcified vertebrae was slightly smaller, in HO-3X and LO-3X larvae than control larvae (Fig 4E-G). The morphology of PY-3X larvae was not different from that of control. We also determined the standard length of larvae: LO-3X larvae were 17% shorter than control larvae (Fig. 4H); the lengths of PY and HO larvae, whatever the diet concentration, did not differ from those of the control larvae.



Figure 4: Jaw and vertebral column anomalies assessed in 15 dpf larvae after exposure to PY, HO and LO diets. Jaw morphology was evaluated, after calcein staining, by measuring distances between several landmarks positioned. Representative pictures are presented for Solvent control (a) and HO-3X (b). Length of anterior (c) and posterior (d) part of the jaw is presented for Solvent control and 3X for all three diets. Representative pictures used to count the number of stained vertebrae are presented for Solvent control and 3X for Solvent control (e) and HO-3X (f). Number of vertebrae counted on larvae for Solvent control and 3X for all three diets (g). Length of larvae (h). (mean \pm SEM; in c, d and g * indicates conditions significantly different from their respective Solvent control; p < 0.05; in h different letters indicate significantly different conditions; p < 0.05; n is indicated in each bar).

Digestive enzymes

Specific activities of leucine-alanine peptidase (leu-ala) and amylase in PY fish were assayed at 2 mpf (Fig 5), and in PY-3X fish were 40% and 45% lower, respectively, than in controls . The specific activities for trypsin, leu-ala and alkaline phosphatase for HO and LO fish were determined after nutritional challenge (Table 7). The recovery of enzyme activities after a starvation period seemed to be adversely affected by prior exposure to HO, and this effect tended to be greater at higher doses; the differences for trypsin were smaller than those for leu-ala or alkaline phosphatase. Exposure to the LO diet only affected the recovery of alkaline phosphatase and only at the highest dose (LO-3X).



Figure 5: Specific activities of amylase and leucine-alanine peptidase (leu-ala) in 2 mpf fish exposed to PY mixture. (mean \pm SD; different letters indicate significant differences with Solvent control; p < 0.05; n = 3).

Diets	Concentration	Status Trypsin	Leucine- alanine peptidase	Alkaline phosphatase
	G (1	unfed 14.9 ± 4.8^{abc}	44 ± 57 ^b	85 ± 22^{b}
	Control	fed 26.2 ± 8.3^{a}	$81\pm8^{\text{a}}$	170 ± 57^{ab}
		unfed 10.2 ± 2.2^{bc}	42 ± 6^{b}	86 ± 10^{b}
	0.3X	fed 21.4 ± 3.9^{ab}	89 ± 17^{a}	249 ± 96^{a}
HO		unfed 15.5 ± 1.8^{abc}	44 ± 5^{b}	89 ± 17^{b}
	1X	fed 20.3 ± 2.4^{ab}	54 ± 7^{b}	113 ± 35^{b}
		unfed $8.4 \pm 2.5^{\circ}$	35 ± 4 ^b	67 ± 10^{b}
	3X	fed 12.8 ± 3.2^{bc}	$50\pm7^{\mathrm{b}}$	82 ± 24^{b}
	1	unfed 17.7 ± 2.9	53 ± 17	104 ± 21^{b}
	Control	fed 25.6 ± 6.7	80 ± 12	$138 \pm 15^{\mathrm{b}}$
		unfed 20.4 ± 5.7	76 ± 23	115 ± 23^{b}
TO	0.3X	fed 19.8 ± 3.0	84 ± 10	Alkaline phosphatase 85 ± 22^{b} 170 ± 57^{ab} 86 ± 10^{b} 249 ± 96^{a} 89 ± 17^{b} 113 ± 35^{b} 67 ± 10^{b} 82 ± 24^{b} 104 ± 21^{b} 138 ± 15^{b} 115 ± 23^{b} 211 ± 5^{a} 123 ± 23^{b} 219 ± 37^{a} 127 ± 18^{b} 102 ± 29^{b}
LO		unfed 25.7 ± 4.8	53 ± 6	123 ± 23^{b}
	IX	fed 22.0 ± 7.4	73 ± 13	219 ± 37^{a}
		unfed 12.5 ± 0.3	57 ± 4	127 ± 18^{b}
	3X	fed 12.4 ± 2.1	50 ± 7	102 ± 29^{b}

Table 7: Specific activities of trypsin, leucine-alanine peptidase and alkaline phosphatase in fish exposed to HO and LO diets, after a nutritional challenge (one week starvation « unfed » followed by 2 days refeeding « fed »).

Specific activities (mUnit/mg protein; mean±SD). Different letters indicate significant differences between concentrations for each enzyme activity and PAH fractions.

Discussion

As part of the ConPhyPoP project, we exposed zebrafish, from their first meal and for at least 9 months, to mixtures of PAH fractions similar to those found in the environment. This prolonged duration of exposure allowed effects on physiological functions to be assessed during larval and juvenile stages and in adults. We studied diverse functions including growth, reproduction, behavior, tumorigenesis, metabolism (respiratory, digestive), osmoregulation and immunity. This comprehensive study was performed to obtain an integrated and as complete as possible knowledge of the physiological consequences of a long-term exposure to various PAHs mixtures. Here, we report exposure procedures, including the composition of the PAH mixtures used, and the consequences on survival and growth. We have also identified some potential mechanisms for the effects of these contaminants.

PAH-contaminated diets and exposure to the PAH-contaminated diets

The three diets used paper had a similar total amounts of PAHs (at each of the three concentrations used) but were prepared from different fractions, and thus had different compositions. As a general description, the PY diet contained a high proportion of high molecular weight PAHs, in particular four-ring compounds, and almost no alkylated derivatives; the two other, oil-based, mixtures (HO and LO) contained high proportions of alkylated compounds. The LO diet contained nearly twofold more 2 and 3-ring PAHs than HO and fourfold more than PY. PY contained more than twice as much high molecular weight PAHs than HO and more than tenfold more than LO. The LO diet contained the same concentration of MP+MA as HO but more than twofold more MN. The PAH composition of PY is representative of pollution observed in industrial and anthropized areas, and those of HO and LO are clearly petrogenic (Latimer & Zheng 2003). The analysis of PAHs metabolites revealed the same differences between the different mixtures with more heavy PAHs metabolites (1-OH-pyrene and OH-BaP) in PY larvae than in HO and a concentration for these metabolites in LO larvae not different when compared to control larvae. As said above, LO mixture is rich low molecular weight PAHs and therefore only 2-OH-biphenyl is significantly higher in exposed larvae compared to control fish. The low amount of low molecular weight metabolites compared to the high amount of parent PAHs has already been observed after experimental exposure of cod juveniles to naphtalene through diet (Grung et al. 2009). Other compounds may have been co-purified in the fractions used, including nitrogen, oxygen and sulfur derivatives of PAHs. With reference to the 16 US-EPA indicator PAHs, the 1X concentration of the preparations we used (PY-1X: 4505 ± 1527 ; LO-1X: 2739 ± 231 ; and HO-1X: 1887 \pm 130 µg.g-1 dw) were in the range of the target concentration (1X) of 5 µg.g-1 dw which is found in copepods and bivalves in contaminated areas (Cailleaud et al. 2007, Jeanneret et al. 2002, Le Goff et al. 2006, Payne et al. 2008). Thus, diets used for these studies displayed various and contrasted compositions which could be considered as mimicking some environmental situations.

Survival

In our experimental model system, exposure to PAH mixtures had no significant effect on larval survival whatever the mixture used; this indicates that preparations used did not display the acute lethal toxicity. This contrasts with observations that embryonic exposure to PAH or PAH mixtures leads to mortality (Heintz et al. 1999) and that early exposure (of eggs or embryos) can lead to delayed mortality at larval stages (Carls et al. 1999). The same three aromatic fractions were also tested by direct exposure of medaka embryos using a sedimentcontact assay at three different environmental concentrations (Le Bihanic et al. Submitted-a). Acute effects were observed on individuals exposed to both petrogenic fractions; however, exposure in this experimental model involved embryonic stages which are known to be extremely sensitive to pollutants (Hutchinson et al. 1998), whereas in the study reported here, exposure started at the larval stage, 2 to 3 days after hatching. Survival was then monitored for 9 months, to document the long-term effects of chronic exposure. We did not observe any modification of survival rates for any of the mixtures, except for HO-3X. Numerous reports describe sub-lethal effects of exposure to PAHs, but there have been few studies of long-term survival after early exposure. Nevertheless, one-month exposure of milkfish to high doses (>3 μ g.L-1 of anthracene or >1.4 of BaP) has been shown to be associated with mortality (Palanikumar et al. 2013). Also, a short acute exposure of sole juveniles to Fuel-oil No.2, an oil similar to the HO-3X mixture we used, produced a long-lasting increase of the risk of mortality (Gilliers et al. 2012). This suggests that this mixture is more toxic than the others used. However, the absence of mortality in our experimental model is in agreement with several previous reports (Meador et al. 2006, Wu et al. 2003, Yuen et al. 2007).

Growth and digestive enzymes

Growth was assessed after 10 days of exposure (larvae) and later a monthly basis starting at 2-3 mpf (juveniles and adults). Growth was estimated by measuring length in larvae and later stages and by measuring body mass of juveniles/adults. All PAH mixtures used caused a dose-dependent slowing of growth. This finding is in agreement with previous reports of fish exposure to PAH or PAHs mixtures through various routes (water or food), and for various durations (1 day to several months) and concentrations (Gilliers et al. 2012, Gundersen et al. 1996, Kim et al. 2008, Meador et al. 2006, Moles &Rice 1983, Palanikumar et al. 2013, Schuler et al. 2007). The use of several mixtures in the present study allowed

comparisons between them. The PY mixture had no effect on larval growth and caused a subsequent moderate reduction of growth (body mass ~15% for PY-1X and 30% for PY-3X lower than controls) after 6-7 months of exposure and was stable through time thereafter. The sex of the fish could be determined 9 mpf: the significantly lower than control body mass was observed only for PY-1X and PY-3X females, and not males.

Interestingly, digestive enzyme activities, both pancreatic (amylase) and intestinal (leucine-alanine peptidase), were lower in PY-1X and PY-3X fish than controls, after 2 months of exposure; the difference was almost 40% for both enzymes for PY-3X. As far as we know, no previous study has examined the effects of PAHs on fish digestive enzyme activities. Meador et al. (2006) reported, in Chinook salmon, a dose-dependent decrease in lipase and amylase activity in blood after exposure to artificial PAH mixtures designed to mimic those found in the stomach of field-collected fish: both enzymes were assayed in the blood although they are produced by the liver. Their expression was nevertheless impaired in fish exposed to PAHs, and this effect may also apply to digestive enzymes. Note that the impairment of the digestive capacities by the PY mixture we observed 2mpf preceded detection of the negative effect on fish growth, which was only observed at a later stage.

Growth inhibition by oils was already visible for larvae: by 3mpf, the growth of LO-1X and HO-1X was each 30% below that of controls, and the difference was 20% at 9mpf for both these two groups. Similarly, the body mass of LO-3X fish was 66% lower than the control value at 3 mpf and only 21% lower at 9 mpf. The largest effect was for HO-3X fish which were 80% lighter than controls at 3 mpf. Analysis by sex at 9 mpf revealed that differences of body mass persisted only for males, with a difference above 35% for both HO and LO at the 3X concentration. The analysis of body length gave similar results. As for PY exposition, the digestive enzyme activities after the nutritional challenge (one week starvation of fish, followed by 2 days-refeeding) paralleled the growth impairment observed in HO-1X, HO-3X and LO-3X fish. During starvation, the digestive enzymes activities decline and, after refeeding, recovered rapidly; the extent of the recovery is tightly linked to the digestive status of the animal (Zambonino-Infante et al. 1992, Zambonino-Infante et al. 1996). The digestive capacities of fish exposed to the HO and LO mixtures were affected in a dose-dependent manner: the higher the dose, the lower the digestive enzymatic rehabilitation. This impairment of digestive enzyme capacity may, to a large extent, explain the inhibition of fish growth.

The differences between sexes in the effects of PAHs on body mass could be linked to spawning events. The PAH mixtures used differentially affected spawning with almost no spawn obtained for the oil-based fractions at 1X and 3X concentrations (Vignet in prep.). It is

possible that consequently the female body mass increased relative to that of males because of egg retention. However, this does not apply to PY-1X females: the HO mixture had the largest effects, especially in juveniles and adults, and the LO mixture affected growth earlier with a tendency or subsequent catch-up; the growth inhibition by the PY mixture was smaller, and affected in juveniles and was stable over time.

Jaw morphology

We observed jaws abnormalities in juveniles and adults exposed to PAHs. PAHs have previously been shown to disrupt jaw development in embryos and calcification in juveniles (Debruyn et al. 2007, Incardona et al. 2004, Li et al. 2011, Shi et al. 2012). It is therefore plausible that early jaw disruptions may impair feeding abilities as this has been proposed for cod larvae exposed to produced water (Meier et al. 2010). Indeed, jaw morphology was modified in all larvae whatever the mixture to which they were exposed. In the case of the PY mixture, there was elongation of the anterior part of the jaw, manifest as both increased length and decreased width, with respect to controls; exposure to the oil mixtures led to shortening of the jaw but no modification of the geometry. These results indicate that exposure to PAHs affects jaw growth. During embryogenesis, neural crest cells originating from the dorsal part of the neural plate migrate to populate the pharyngeal arches, and then cells from the first pharyngeal arch further migrate and condense to form the jaw skeleton. This succession of events takes place during the first days of development and jaw morphology is established by 5 dpf, which corresponds to the date when the exposure started in the present study. Our results thus indicate then that jaw morphology can also be disrupted when exposure starts after jaw ontogenesis. In the case of LO, larval body size was also reduced, so we cannot rule out the possibility that jaw abnormalities are a consequence of growth inhibition rather than its cause. Nevertheless, these results indicate that growth was disrupted very early and was detectable after only 10 days. Even if we did not observe an effect on survival in this otherwise optimized experimental model, this rapid morphological effect could have dramatic consequences on survival of larvae in the wild.

Differences between the mixtures studied, and ecotoxicological consequences

Each mixture had dose-dependent effects that differed depending on the mixture used. Considering the whole set of variables analyzed, the HO mixture appeared to be the most toxic, followed by LO and PY. This finding is in agreement with what has been observed with the same mixtures after sediment-contact exposure of medaka and trout embryos (Le Bihanic et al. Submitted-a, Le Bihanic et al. Submitted-b, Le Bihanic et al. Submitted-c). Although they had roughly similar total PAH contents, the mixtures differed in the proportions of the various PAHs. It is therefore difficult to relate observed toxicity to a particular group of compounds or to predict the toxicity of a mixture on the basis its composition. However, it is likely that alkylated compounds, and in particular MP and MA, are responsible for a large part of the toxicity of these mixtures, acting in synergy with high molecular weight PAHs. This is in agreement with other findings for experimental exposure of zebrafish, medaka and trout embryos (Incardona et al. 2009, Le Bihanic et al. Submitted-a, Le Bihanic et al. Submitted-b, Le Bihanic et al. Submitted-c, Sundberg et al. 2005) and suggest that further investigation of alkylated derivatives would be informative. Recent analyses of other derivatives, and particularly hydroxy- or hydroxyalkylated PAH derivatives (Fallahtafti et al. 2012, Knecht et al. 2013), also indicate the need for additional long-term studies to provide information about their toxicity in an ecotoxicological perspective. Finally, our results indicate that PAH mixtures of different compositions, representative of situations encountered in the wild, can promote lethal and sublethal effects, both on larvae and at latter stages, which are likely to be detrimental for fish recruitment.

Conclusion

Three aromatic fractions extracted from three different naturally occurring sources of PAH (PY, HO and LO) were used to spike diets fed to zebrafish throughout their lives from 5 dpf onwards. The total concentrations of quantified PAHs were similar for all three fractions $[4.6 - 6.7 \ \mu g.g.1$ for the intermediate concentration used] but their compositions differed; the three fractions had different proportions of heavy PAHs and alkylated derivatives. The fractions had different effects and thresholds for effects on fish, suggesting differential involvement of these compounds in the toxicity of the mixtures. In this experimental model representative of environmental situations, long-term and chronic exposure to each of the three mixtures led to growth disruption, and in the case of HO to decreased fish survival. These effects could be due to developmental jaw defects and/or digestive enzyme dysfunctions; they have detrimental consequences on fish performance and contribution to recruitment.

Acknowledgements

We thank Didier Leguay, Cathy Haget, Manon Goubeau and Tiphaine Guionnet for their help. This study was supported financially by the ANR project ConPhyPoP (CES 09_002) and CPER A2E. This project is co-financed by the European Union with the European fund of regional development.. Doctoral grants were received from the Région Poitou-Charentes (C.V. and J.L.), from l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (C.V. and P.P), from Conseil Général de Charente Maritime (P.P.) and from the Ministère de l'Enseignement de Supérieur et de la Recherche (F.L.B.). This work was part of the LABEX COTE cluster of excellence continental to coastal ecosystems.

References

- Akcha F, Vincent Hubert F, Pfhol-Leszkowicz A (2003): Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. Mutat Res 534, 21-32
- Barron MG, Heintz R, Rice SD (2004): Relative potency of PAHs and heterocycles as aryl hydrocarbon receptor agonists in fish. Marine Environmental Research 58, 95-100
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P, Sorbe JC, Burgeot T, Bellocq J (1998): Concentrations of PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) in various marine organisms in relation to those in sediments and to trophic level. Marine Pollution Bulletin 36, 951-960
- Benlahcen KT, Chaoui A, Budzinski H, Bellocq J, Garrigues P (1997): Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in some Mediterranean coastal sediments. Marine Pollution Bulletin 34, 298-305
- Billiard SM, Hahn ME, Franks DG, Peterson RE, Bols NC, Hodson PV (2002): Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 133, 55-68
- Billiard SM, Meyer JN, Wassenberg DM, Hodson PV, Di Giulio RT (2008): Nonadditive effects of PAHs on Early Vertebrate Development: mechanisms and implications for risk assessment. Toxicol Sci 105, 5-23
- Buddington RK, Diamond J (1992): Ontogenetic development of nutrient transporters in cat intestine. Am J Physiol 263, G605-16
- Cachot J, Geffard O, Augagneur S, Lacroix S, Le Menach K, Peluhet L, Couteau J, Denier X,
 Devier MH, Pottier D, Budzinski H (2006): Evidence of genotoxicity related to high
 PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France).
 Aquatic Toxicology 79, 257-267
- Cachot J, Cherel Y, Larcher T, Pfohl-Leszkowicz A, Laroche J, Quiniou L, Morin J, Schmitz J, Burgeot T, Pottier D (2013): Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. Environ Sci Pollut Res Int 20, 723-37
- 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, 270-280
- Carls MG, Rice SD, Hose JE (1999): Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part
 I. Low-level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval pacific herring (*Clupea pallasi*). Environmental Toxicology and Chemistry 18, 481-493
- Collier TK, Singh SV, Awasthi YC, Varanasi U (1992a): Hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in two species of benthic fish showing different prevalences of contaminant-associated liver neoplasms. Toxicol Appl Pharmacol 113, 319-24
- Collier TK, Stein JE, Sanborn HR, Hom T, Myers MS, 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
- Danion M, Deschamps MH, Thomas-Guyon H, Bado-Nilles A, Le Floch S, Quentel C, Sire JY (2011): Effect of an experimental oil spill on vertebral bone tissue quality in European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). Ecotoxicol Environ Saf 74, 1888-95
- Debruyn AM, Wernick BG, Stefura C, McDonald BG, Rudolph BL, Patterson L, Chapman PM (2007): In situ experimental assessment of lake whitefish development following a freshwater oil spill. Environ Sci Technol 41, 6983-9
- Devier MH, Le Du-Lacoste M, Akcha F, Morin B, Peluhet L, Le Menach K, Burgeot T, Budzinski H (2013): Biliary PAH metabolites, EROD activity and DNA damage in dab (*Limanda limanda*) from Seine Estuary (France). Environ Sci Pollut Res Int 20, 708-22

- Du SJ, Frenkel V, Kindschi G, Zohar Y (2001): Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein. Dev Biol 238, 239-46
- Eisler R (1987): Polycylic Aromatic Hydrocarbons Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. . U.S. Fish and Wildlife Service, Washington, DC. Biological Report 85, 1-11
- Fallahtafti S, Rantanen T, Brown RS, Snieckus V, Hodson PV (2012): Toxicity of hydroxylated alkyl-phenanthrenes to the early life stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Aquatic Toxicology 106–107, 56-64
- Gilliers C, Claireaux G, Galois R, Loizeau V, Le Pape O (2012): Influence of Hydrocarbons Exposure on Survival, Growth and Condition of Juvenile Flatfish: A Mesocosm Experiment. Journal of Life Sciences 4, 113-122
- Grung M, Holth TF, Jacobsen MR, Hylland K (2009): Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites in Atlantic cod exposed via water or diet to a synthetic produced water. J Toxicol Environ Health A 72, 254-65
- Gundersen DT, Kristanto SW, Curtis LR, Al-Yakoob SN, Metwally MM, Al-Ajmi D (1996): Subacute toxicity of the water-soluble fractions of Kuwait crude oil and partially combusted crude oil on *Menidia beryllina* and *Palaemonetes pugio*. Arch Environ Contam Toxicol 31, 1-8
- Heintz RA, Short JW, Rice SD (1999): Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil:
 Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon valdez crude oil. Environmental Toxicology and Chemistry 18, 494-503
- Hutchinson TH, Solbe J, Kloepper-Sams PJ (1998): Analysis of the ecetoc aquatic toxicity (EAT) database III Comparative toxicity of chemical substances to different life stages of aquatic organisms. Chemosphere 36, 129-142
- Hylland K (2006): Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A 69, 109-123
- Incardona JP, Collier TK, Scholz NL (2004): Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Toxicol Appl Pharmacol 196, 191-205
- Incardona JP, Carls MG, Teraoka H, Sloan CA, Collier TK, Scholz NL (2005): Aryl hydrocarbon receptor-independent toxicity of weathered crude oil during fish development. Environ Health Perspect 113, 1755-62

- Incardona JP, Day HL, Collier TK, Scholz NL (2006): Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism. Toxicol Appl Pharmacol 217, 308-21
- Incardona JP, Carls MG, Day HL, Sloan CA, Bolton JL, Collier TK, Scholz NL (2009): Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific herring (*Clupea pallasi*) exposed to crude oil during weathering. Environ Sci Technol 43, 201-7
- Jeanneret H, Chantereau S, Belliaeff B, Ratiskol G, Allenou J-P, Piclet G (2002): Suivi sanitaire et environnemental des conséquences de la marée noire de l'Erika. In: Cedre (Hrsg.), Colloque SAFERSEAS: les leçons techniques de l'Erika et des autres accidents, Brest
- Johnson LL, Ylitalo GM, Arkoosh MR, Kagley AN, Stafford C, Bolton JL, Buzitis J, Anulacion BF, Collier TK (2007): Contaminant exposure in outmigrant juvenile salmon from Pacific Northwest estuaries of the United States. Environ Monit Assess 124, 167-94
- Kim SG, Park DK, Jang SW, Lee JS, Kim SS, Chung MH (2008): Effects of dietary benzo[a]pyrene on growth and hematological parameters in juvenile rockfish, *Sebastes schlegeli* (Hilgendorf). Bull Environ Contam Toxicol 81, 470-4
- Knecht AL, Goodale BC, Truong L, Simonich MT, Swanson AJ, Matzke MM, Anderson KA,
 Waters KM, Tanguay RL (2013): Comparative developmental toxicity of
 environmentally relevant oxygenated PAHs. Toxicology and applied pharmacology
- Latimer JS, Zheng J (2003): The Sources, Transport, and Fate of PAHs in the Marine Environment, PAHs: An Ecotoxicological Perspective. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 7-33
- Lawrence C (2007): The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review. Aquaculture 269, 1-20
- Le Bihanic F, Clérandeau C, Morin B, Cousin X, Cachot J (Submitted-a): Toxicity of PAH mixtures on *Oryzias latipes* early life stages. Part 1: Developmental toxicity.
- Le Bihanic F, Le Menach K, Daffe G, Budzinski H, Gonzalez P, Cousin X, Cachot J (Submitted-b): Toxicity of PAH mixtures on *Oryzias latipes* early life stages. Part 2 : Bioavailability, Bioaccumulation and Gene expression.
- Le Bihanic F, Morin B, Cousin X, Le Menach K, Budzinski H, Cachot J (Submitted-c): Comparative toxicity of Pyrolytic, Arabian Light and Erika PAH fractions on rainbow trout early life stages.

- Le Du-Lacoste M, Akcha F, Devier MH, Morin B, Burgeot T, Budzinski H (2013): Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, *Scophthalmus maximus*. Environ Sci Pollut Res Int 20, 690-707
- Le Goff J, Gallois J, Pelhuet L, Devier MH, Budzinski H, Pottier D, André V, Cachot J (2006): DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas: Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. Aquatic Toxicology 79, 55-64
- Li R, Zuo Z, Chen D, He C, Chen R, Chen Y, Wang C (2011): Inhibition by polycyclic aromatic hydrocarbons of ATPase activities in *Sebastiscus marmoratus* larvae: relationship with the development of early life stages. Mar Environ Res 71, 86-90
- Marty GD, Hinton DE, Short JW, Heintz RA, Rice SD, Dambach DM, Willits NH, Stegeman JJ (1997): Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis, and cytochrome P4501A induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil-contaminated gravel during development. Canadian Journal of Zoology 75, 989-1007
- Mazeas L, Budzinski H (2001): Polycyclic aromatic hydrocarbon 13C/12C ratio measurement in petroleum and marine sediments application to standard reference materials and a sediment suspected of contamination from the Erika oil spill. J Chromatogr A 923, 165-76
- Mazeas L, Budzinski H (2002): Improved Accuracy of GC-MS Quantification of Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Marine Sediments and Petroleums. Validation on Reference Matrices and Application to the Erika Oil Spill. International Journal of Environmental and Analytical Chemistry 82, 157-173
- Meador JP, Sommers FC, Ylitalo GM, Sloan CA (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 63, 2364-2376
- Meier S, Craig Morton H, Nyhammer G, Grosvik BE, Makhotin V, Geffen A, Boitsov S, Kvestad KA, Bohne-Kjersem A, Goksoyr A, Folkvord A, Klungsoyr J, Svardal A (2010): Development of Atlantic cod (*Gadus morhua*) exposed to produced water during early life stages: Effects on embryos, larvae, and juvenile fish. Mar Environ Res 70, 383-94

- Moles A, Rice SD (1983): Effects of Crude Oil and Naphthalene on Growth, Caloric Content, and Fat Content of Pink Salmon Juveniles in Seawater. Transactions of the American Fisheries Society 112, 205-211
- Myers MS, Stehr CM, Olson OP, Johnson LL, McCain BB, Chan SL, Varanasi U (1994): Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in English sole (*Pleuronectes vetulus*), starry flounder (*Platichthys stellatus*), and white croaker (Genyonemus lineatus) from selected marine sites on the Pacific Coast, USA. Environ Health Perspect 102, 200-15
- Ohura T, Morita M, Makino M, Amagai T, Shimoi K (2007): Aryl hydrocarbon receptormediated effects of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons. Chem Res Toxicol 20, 1237-41
- Palanikumar L, Kumaraguru AK, Ramakritinan CM, Anand M (2013): Toxicity, feeding rate and growth rate response to sub-lethal concentrations of anthracene and benzo [a] pyrene in milkfish *Chanos chanos* (Forskkal). Bull Environ Contam Toxicol 90, 60-8
- Payne JR, Driskell WB, Short JW, Larsen ML (2008): Long term monitoring for oil in the Exxon Valdez spill region. Mar Pollut Bull 56, 2067-81
- Peterson RE, Theobald HM, Kimmel GL (1993): Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons. Crit Rev Toxicol 23, 283-335
- Pittman K, Yúfera M, Pavlidis M, Geffen AJ, Koven W, Ribeiro L, Zambonino-Infante JL, Tandler A (2013): Fantastically plastic: fish larvae equipped for a new world. Reviews in Aquaculture 5, S224-S267
- Prasch AL, Teraoka H, Carney SA, Dong W, Hiraga T, Stegeman JJ, Heideman W, Peterson RE (2003): Aryl hydrocarbon receptor 2 mediates 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin developmental toxicity in zebrafish. Toxicol Sci 76, 138-50
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012): NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nat Meth 9, 671-675
- Schuler LJ, Landrum PF, Lydy MJ (2007): Response spectrum of fluoranthene and pentachlorobenzene for the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Toxicol Chem 26, 139-48
- Shi X, He C, Zuo Z, Li R, Chen D, Chen R, Wang C (2012): Pyrene exposure influences the craniofacial cartilage development of *Sebastiscus marmoratus* embryos. Mar Environ Res 77, 30-4

- Sundberg H, Ishaq R, Akerman G, Tjarnlund U, Zebuhr Y, Linderoth M, Broman D, Balk L (2005): A bio-effect directed fractionation study for toxicological and chemical characterization of organic compounds in bottom sediment. Toxicol Sci 84, 63-72
- Sverdrup LE, Nielsen T, Krogh PH (2002): Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. Environ Sci Technol 36, 2429-35
- Timme-Laragy AR, Cockman CJ, Matson CW, Di Giulio RT (2007): Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. Aquat Toxicol 85, 241-50
- Varanasi U, Casillas E, Arkoosh MR, Hom T, Misitano D, Brown DW, Chan S-L, Collier TK, McCain BB, Stein JE 1993: Contaminant exposure and associated biological effects in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) from urban and nonurban estuaries of Puget Sound, WA NOAA Fisheries
- 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. Aquat Toxicol 105, 235-45
- Wang SY, Lum JL, Carls MG, Rice SD (1993): Relationship between Growth and Total Nucleic Acids in Juvenile Pink Salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*, Fed Crude Oil Contaminated Food. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 50, 996-1001
- Wu RS, Pollino CA, Au DW, Zheng GJ, Yuen BB, Lam PK (2003): Evaluation of biomarkers of exposure and effect in juvenile areolated grouper (*Epinephelus areolatus*) on foodborne exposure to benzo[a]pyrene. Environ Toxicol Chem 22, 1568-73
- Xiong KM, Peterson RE, Heideman W (2008): Aryl hydrocarbon receptor-mediated downregulation of sox9b causes jaw malformation in zebrafish embryos. Mol Pharmacol 74, 1544-53
- Yanagida GK, Anulacion BF, Bolton JL, Boyd D, Lomax DP, Paul Olson O, Sol SY, Willis M, Ylitalo GM, Johnson LL (2012): Polycyclic aromatic hydrocarbons and risk to threatened and endangered Chinook salmon in the Lower Columbia River estuary. Arch Environ Contam Toxicol 62, 282-95
- Yuen BB, Wong CK, Woo NY, Au DW (2007): Induction and recovery of morphofunctional changes in the intestine of juvenile carnivorous fish (*Epinephelus coioides*) upon exposure to foodborne benzo[a]pyrene. Aquat Toxicol 82, 181-94

- Zambonino-Infante J-L, Rouanet J-M, Caporiccio B, Pejoan C, Besançon P (1992): Nutritional rehabilitation of malnourished rats by di- and tripeptides: nitrogen metabolism and intestinal response. The Journal of Nutritional Biochemistry 3, 285-290
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL, Pères A, Quazuguel P, Le Gall MM (1996): Sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae fed different Artemia rations: growth, pancreas enzymatic response and development of digestive functions. Aquaculture 139, 129-138
- Zambonino-Infante JL, Cahu CL, Peres A (1997): Partial substitution of di- and tripeptides for native proteins in sea bass diet improves *Dicentrarchus labrax* larval development. The Journal of nutrition 127, 608-14
- Zambonino-Infante JL, Gisbert E, Sarasquete C, Navarro I, Gutiérrez J, Cahu CL (2008):
 Ontogeny and physiology of the digestive system of marine fish larvae. In: Cyrino JEP,
 Bureau DP, Kapoor BG (Editors), Feeding and digestive functions of fishes. Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd), Oxford, pp. 281-348
- Zhang Y, Tao S (2009): Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. Atmospheric Environment 43, 812-819

PAHs	Ring #	PY	НО	LO
naphthalene	2	7.8 ± 0.5	88.5	133.2 ± 4
acenaphthylene	2	4.8 ± 0.4	0.4	15.8 ± 1.9
acenaphthene	2	2.8 ± 0.3	34.9	16 ± 7.3
fluorene	2	4.7 ± 0.4	59.8	38.4 ± 1.1
phenanthrene	3	26.4 ± 2.5	280.7	60.5 ± 4
anthracene	3	14.5 ± 1.1	38.8	1.1 ± 0.5
fluoranthene	3	55.7 ± 4.8	23.2	0.3 ± 0.2
pyrene	4	49.5 ± 4.3	137.6	4.5 ± 0.4
benzo[a]anthracene	4	33.6 ± 2.8	112	2 ± 0.4
triphenylene + chrysene	4	39.9 ± 3.5	275.5	12 ± 0.6
benzo[b]naphto[2,1-d]thiophene	4	9.6 ± 0.6	154.4	21.6 ± 0.5
benzo[b]fluoranthene+benzo[k]f				
luoranthene+benzo[j]fluoranthen	4	76.8 ± 6.8	59.9	2 ± 0.2
e				
benzo[e]pyrene	5	32.2 ± 2.9	92.2	4.5 ± 0.5
benzo[a]pyrene	5	33 ± 3.1	56.5	0.6 ± 0.2
perylene	5	13.3 ± 1.3	30	1.1 ± 0.1
indeno(1,2,3-cd)pyrene	5	32 ± 2.4	5.3	ND
dibenz(ah)anthracene +	5	93 ± 07	171	ND
dibenz(ac)anthracene	5	7.3 ± 0.7	17.1	ND
benzo[ghi]perylene	6	29.5 ± 2.4	93.1	1.2 ± 0.2
Sum PAHs		475.5 ± 40.7	1560	315 ± 10.2
2-methylnanhthalene	2	49 + 05	311.9	247 1 + 7 3
1-methylnaphthalene	2	2.7 ± 0.3	187.4	281.6 ± 14.2
Sum methylnanhthalenes	2	$\frac{2.7 \pm 0.3}{7.6 \pm 0.8}$	499.3	528.7 ± 19.7
Sum methymaphenateres		7.0 ± 0.0	177.5	520.7 ± 19.7
3-methylphenanthrene	3	4.9 ± 0.4	227.3	52.5 ± 7.3
2-methylphenanthrene	3	6.6 ± 0.5	291.5	55.1 ± 1.9
2-methylanthracene	3	2.9 ± 0.2	83.6	41 ± 10.8
9-methylphenanthrene + 1-	3	58 ± 0.6	100 7	100.5 ± 12.3
methylanthracene	5	3.8 ± 0.0	190.7	100.3 ± 13.3
1-methylphenanthrene	3	3.5 ± 0.4	182.1	67.6 ± 15
Sum methylphenanthrenes		20.8 ± 1.9	975.2	316.7 ± 12.4
Total PAHs		504 ± 42.1	3034.5	1160.3 ± 35.1

Supplementary Material Table 1: PAHs concentration in used aromatic fractions.

Mean \pm SD in μ g/g of fraction. ND: not detectable. Value without SD indicated the compound was quantified in only one sample.

		РҮ				НО				LO			
	Ring#	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X	Control	0.3X	1X	3X
naphthalene	2	6 ± 6	15 ± 7	56 ± 14	157 ± 74	4 ± 1	37 ± 6	120 ± 16	405 ± 73	3 ± 1	161 ± 21	315 ± 183	1110 ± 472
acenaphthylene	2	1 ± 0	11 ± 2	35 ± 6	114 ± 23	1 ± 0	3 ± 1	3 ± 1	13 ± 13	1 ± 0	15 ± 1	46 ± 2	136 ± 19
acenaphthene	2	2 ± 1	14 ± 12	29 ± 7	89 ± 24	27 ± 26	46 ± 23	74 ± 19	190 ± 17	23 ± 21	37 ± 26	67 ± 68	90 ± 30
fluorene	2	2 ± 1	14 ± 3	42 ± 8	137 ± 28	2 ± 1	34 ± 2	99 ± 8	312 ± 25	2 ± 1	79 ± 1	232 ± 2	677 ± 55
dibenzo[b,d]thiophene	2	2 ± 3	11 ± 1	34 ± 5	102 ± 26	0 ± 0	54 ± 3	166 ± 11	546 ± 54	0 ± 0	443 ± 8	1161 ± 18	3489 ± 208
phenanthrene	3	8 ± 4	95 ± 21	291 ± 60	895 ± 213	6 ± 3	152 ± 7	418 ± 32	1279 ± 51	6 ± 4	178 ± 7	492 ± 10	1438 ± 86
anthracene	3	1 ± 0	49 ± 13	159 ± 41	482 ± 165	0 ± 0	22 ± 1	70 ± 2	220 ± 10	0 ± 0	2 ± 1	4 ± 1	42 ± 54
fluoranthene	3	3 ± 3	130 ± 28	523 ± 182	1782 ± 353	2 ± 1	17 ± 1	44 ± 2	145 ± 18	2 ± 1	2 ± 2	1 ± 1	15 ± 17
pyrene	4	3 ± 3	112 ± 24	447 ± 160	1496 ± 311	1 ± 0	80 ± 3	227 ± 19	709 ± 64	2 ± 0	13 ± 2	18 ± 2	73 ± 28
benzo[a]anthracene	4	1 ± 0	171 ± 75	581 ± 221	1671 ± 763	0	57 ± 4	172 ± 11	543 ± 29	0	4 ± 1	14 ± 2	49 ± 28
triphenylene + chrysene	4	1 ± 0	215 ± 91	744 ± 290	2144 ± 1032	ND	108 ± 8	336 ± 21	1073 ± 79	ND	30 ± 1	98 ± 4	320 ± 62
benzo[b]naphto[2,1-													
d]thiophene	4	5 ± 3	52 ± 26	156 ± 70	472 ± 230	0	56 ± 4	186 ± 8	573 ± 36	0	66 ± 1	194 ± 9	588 ± 30
benzo[b]fluoranthene+benzo[k]fl													
uoranthene+benzo[j]fluoranthene	4	2 ± 1	273 ± 72	868 ± 220	2740 ± 674	2.4	32 ± 2	110 ± 8	363 ± 18	2.4	6 ± 0	20 ± 1	66 ± 7
benzo[e]pyrene	5	1 ± 0	109 ± 29	346 ± 86	1084 ± 286	ND	56 ± 3	173 ± 11	536 ± 26	ND	17 ± 0	52 ± 1	160 ± 10
benzo[a]pyrene	5	1 ± 0	118 ± 33	373 ± 95	1168 ± 346	0 ± 0	ND	108 ± 6	342 ± 10	0 ± 0	ND	4 ± 1	17 ± 3
perylene	5	1 ± 0	37 ± 9	121 ± 27	390 ± 83	0 ± 0	ND	56 ± 4	172 ± 14	0 ± 0	ND	5 ± 1	13 ± 1
indeno(1,2,3-cd)pyrene	5	0 ± 0	123 ± 41	349 ± 89	1188 ± 265	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
dibenz(ah)anthracene +													
dibenz(ac)anthracene	5	2 ± 2	32 ± 11	108 ± 43	301 ± 106	0.3	ND	34 ± 2	113 ± 6	0.3	ND	3 ± 1	11 ± 1
benzo[ghi]perylene	6	0 ± 0	87 ± 27	268 ± 67	893 ± 191	0 ± 0	ND	146 ± 10	481 ± 12	0 ± 0	ND	12 ± 0	42 ± 12
Sum PAHs		34 ± 6	1670 ± 448	5532 ± 1383	17305 ± 4798	39 ± 30	880 ± 28	2558 ± 169	8082 ± 305	33 ± 26	1053 ± 63	2739 ± 231	8335 ± 854
2-methylnanhthalene	2	8 + 9	15 + 3	43 + 8	116 + 39	4 + 1	137 + 13	396 + 32	1259 + 118	4 + 1	420 ± 19	1036 + 96	2982 + 725
1-methylnaphthalene	2	4 + 6	8+2	13 ± 6 22 + 5	62 + 21	2 ± 0	86 + 8	261 ± 20	854 + 84	2 ± 0	458 ± 19	1030 ± 90 1147 ± 102	3300 ± 739
Sum methylnaphthalenes	2	12 + 15	23 + 5	65 + 13	178 ± 60	6 + 2	223 ± 20	657 ± 52	2113 ± 201	5+1	878 + 38	2183 + 197	6282 + 1465
5 un menymaphenarenes		12 - 10	10 - 0	00 1 10	110 1 00	011	220 1 20	007 2 02	2110 2 201	021	0/0 ± 00	2105 2 157	0202 ± 1400
3-methylphenanthrene	3	2 ± 1	17 ± 3	47 ± 11	149 ± 31	1 ± 0	126 ± 24	326 ± 47	934 ± 160	1 ± 0	114 ± 14	319 ± 38	850 ± 156
2-methylphenanthrene	3	2 ± 0	19 ± 5	60 ± 13	175 ± 41	1 ± 0	149 ± 11	400 ± 28	1172 ± 166	1 ± 0	121 ± 2	340 ± 16	915 ± 124
2-methylanthracene	3	0 ± 0	8 ± 2	25 ± 6	78 ± 18	ND	ND	ND	409 ± 32	ND	ND	ND	32 ± 8
9-methylphenanthrene + 1-													
methy lanthracene	3	1 ± 0	14 ± 4	49 ± 12	165 ± 56	1 ± 0	137 ± 20	360 ± 85	990 ± 206	1 ± 0	283 ± 29	798 ± 42	2226 ± 394
1-methylphenanthrene	3	1 ± 0	12 ± 3	37 ± 11	100 ± 28	0 ± 0	73 ± 8	227 ± 15	617 ± 71	1 ± 0	122 ± 4	348 ± 14	956 ± 97
Sum methylphenanthrenes		7 ± 3	70 ± 15	218 ± 41	668 ± 157	2 ± 2	530 ± 34	1448 ± 144	4122 ± 581	2 ± 2	640 ± 35	1804 ± 67	4957 ± 731
Total PAHs		55 + 12	1763 + 468	5816 + 1433	18151 + 4983	47 + 33	1633 + 71	4663 + 360	14317 + 813	40 + 29	2572 + 96	6726 + 278	19574 + 1945
1.0001171115		00 ± 14	1705 ± 400	2010 ± 1400	10101 ± 4705	H/ ± 00	1055 ± /1	4000 ± 500	1.1017 ± 013	TU ± 47	4574 ± 70	0120 ± 210	17017 - 1770

Supplementary Material Table 2: Detailed concentration of individual PAHs in produced diets

Supplementary figure 1

Jaw geometry in 15 dpf larvae fed with PAHs mixtures: Angles were calculated after geometrical calculus of angles between straight lines passing through previously defined jaw landmarks after calcein staining of calcified structure (red arrows in a and see methods section). Statistics were performed using absolute values for anterior and posterior angles (b; mean ± SD; ** p < 0.01).





ANNEXE 3

Carcinogenic but no genotoxic effects detected following chronic trophic exposure of zebrafish to three fractions of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

Article soumis dans *Environmental Science and Pollution Research* Au sein de la revue spéciale ConPhyPoP: "PAHs and fish – Exposure monitoring and adverse effects – from molecular to individual level"

T. Larcher^{1,2,*}, **P. Perrichon**^{3,4,5,§}, C. Vignet^{3,§}, M. Ledevin^{1,2}, K. Le Menach⁶, L. Lyphout³, L. Landi⁶, C. Clerandeau⁶, F. Lebihanic⁶, D. Ménard³, T. Burgeot³, H. Budzinski⁶, F. Akcha³, J. Cachot⁶, X. Cousin^{3,7}

¹ INRA UMR703, APEX, Oniris, F-44307 Nantes, France

² LUNAM Université, Oniris, École nationale vétérinaire, agro-alimentaire et de

l'alimentation Nantes-Atlantique, F-44307 Nantes, France

³ IFREMER, Laboratoire d'écotoxicologie, F-44311 Nantes and F-17137 L'Houmeau,

France

⁴ Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), Université de la Rochelle, F-17042 La Rochelle, France

⁵ Fédération de Recherche en Environnement pour le Développement Durable, FR-3097,

Université de La Rochelle, CNRS, IFREMER, F-17000 La Rochelle, France

⁶ Université de Bordeaux, EPOC UMR 5805, F-33405 Talence, France

⁷ INRA LPGP, Campus de Beaulieu, F-35042 Rennes, France

[§] These authors contributed equally to this work

^{*} Corresponding author: Thibaut Larcher Phone: +33 2 40 68 78 74; Fax: +33 2 40 18 00 02; email:thibaut.larcher@nantes.inra.fr

Abstract

PAHs are ubiquitous widespread contaminants being present as mixtures in polluted aquatic areas. Most of the PAHs are potent mutagens and many are well-known carcinogens. Despite numerous studies on individual compounds, little is known about PAHs as fractions of several molecules that are encountered in environmental situations. In the present work, zebrafish were continuously fed, from 5 days post-fertilization to 14 months post-fertilization (mpf), with a diet spiked with fractions of either pyrolytic (PY), petrogenic light oil (LO), or petrogenic heavy oil (HO) origin at 3 concentrations.

A decrease in survival was identified after 3 mpf in fish fed with the highest concentration of HO or LO but not for PY. All PAHs fractions caused preneoplastic and neoplastic disorders in long-term exposed animals. Target tissues almost exclusively of epithelial origin, with the bile duct epithelium being the far most susceptible to chronic exposure to all PAH fractions, and with germ cells being the second most responsive cells. Higher incidences of neoplasms were observed with increasing PAH concentration and exposure duration. The most severe carcinogenic effects were induced by dietary exposure to HO compared to exposure to LO or PY (respectively 45 %, 30 % and 7 % after 9 to 10 months of exposure to an intermediate concentration of PAHs). In contrast, earliest carcinogenic effects were detected as soon as 3 mpf after exposure to LO, including the lowest concentration, or to PY.

Neither DNA damage nor increase in EROD activity was detected after a chronic exposure to PAHs indicating that some PAHs may be associated with tumorigenesis without bioactivation or DNA damage such as strand breaks and micronuclei.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbon, zebrafish, carcinogenesis, genotoxicity, neoplasia, carcinoma, toxicological pathology.

Introduction

Persistent organic pollutants (POP) are contaminants of natural or anthropic origin including several chemical families such as dioxins, polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polyaromatic hydrocarbons (PAHs). The diverse PAHs are commonly classified into low molecular weight (LMW) or high molecular weight (HMW) PAHs, based on their molecular structure and their number of rings. Differences in the structure and size of individual PAHs result in substantial variability in their physical, chemical and toxicological properties.

Because of increasing human activity, PAHs are emitted at an ever-growing level and their concentration in the environment has considerably increased over recent decades (Shen et al. 2013). They are ubiquitous widespread contaminants present in the environment as complex fractions of dozens of individual PAHs. They may be generated mainly by three processes: combustion of organic matter (pyrolytic origin), release of petroleum (petrogenic origin), or to a lesser extent diagenesis (degradation of the organic matter) (Neff 1979). Once formed, PAHs may enter aquatic environment through the spillage of petroleum, industrial discharges, atmospheric fallout, and urban runoff (Neff 1979). Pyrolytic PAHs mainly enter in the aquatic environment via the atmosphere, associated with particles that reduce their bioavailability. In contrast, petrogenic PAHs can be directly discharged in the aquatic environment. In polluted environments, bivalves accumulate high levels of PAHs via their filtering activity (Hylland 2006; Rocher et al. 2006). Fish are exposed through water, through contact with contaminated sediments and by feeding. In molluscs and fish, some HMW PAHs can be metabolized into reactive compounds with DNA-binding activity (Le Goff et al. 2006; Fernandez-Tajes et al. 2011). These metabolism processes involve activation of AhR pathway, in particular the cytochrome P450 1A (cyp1a) (Billiard et al. 2002; Otte et al. 2010).

Long-term exposures to sublethal concentrations of PAHs have been shown to dramatically impair survival and physiology of exposed fish and their progeny (White et al. 1999). Some PAHs are potent mutagens (Mersch-Sundermann et al. 1992), and many are well-known carcinogens both in laboratory and environmental conditions (Hawkins et al. 1990; Myers et al. 1991). Elevated prevalence of hepatic neoplasms has therefore frequently been reported in fishes from heavily PAH-contaminated environments (Baumann 1989). Additionally, their major role is suspected in the aetiology of human cancer following

323

exposure to cigarette smoke, urban air pollution, coal combustion, and certain occupational situations (Mastrangelo et al. 1996; Warshawsky 1999).

Various small aquarium fish, like zebrafish, have been utilized as carcinogenesis models (Stanton 1965). In comparison to many rodent species (Ward 1981), advantages of zebrafish include heightened sensitivity to carcinogens with a very low background tumor rate (Reddy et al. 1999a). Due to their short generation time, studies can be conducted near the life span of the individuals in about 12 months (Hawkins et al. 2003), an invaluable advantage in long-term studies that involve environmentally realistic exposures. The potential of zebrafish as a model for cancer research has been emphasized by the demonstrated similarities of transcriptome profiles between zebrafish carcinogen-induced tumor and human cancer (Lam et al. 2006). Other advantages include small size of adults that is compatible with a complete histological examination of all organs and tissues in a few sections without bias of a selective tissue sampling.

Following the intensive analyses already made on individual prototypical compounds like dimethyl-benz[a]anthracene (DMBA) and benzo[a]pyrene (BaP), there is a need to study PAHs as fractions currently encountered in environmental situations and to minimize potentially confounding factors. Moreover, most previous laboratory studies in fish were conducted with dissolved PAHs (Jonsson et al. 2004) or PAH in sediments (Cachot et al. 2007). Trophic route has been more rarely explored to date (Rice et al. 2000; Wessel et al. 2010), especially if considering carcinogenic effects. In this context, Spitsbergen *et al.* (Spitsbergen et al. 2000a) chose to explore the long-term carcinogenic effects of high concentrations of one model PAH, DMBA, regarded as the most potent known PAH.

The aim of this study is to document carcinogenetic and genotoxic effects induced by environmentally relevant conditions of PAH exposure, using realistic fractions in both qualitative and quantitative points of view, and a long-term dietary exposure started at the first meal of the fish and maintained afterwards.

324

Materials and methods

PAH-contaminated diet preparation

Three aromatic fractions were used for exposures: i) a pyrolytic fraction (PY) extracted from sediments collected in the polluted site of Seine Estuary (Oissel, France) and ii) two petrogenic fractions obtained from Erika fuel (heavy oil; HO) and Arabian light crude oil (LO). PAH extractions were performed as previously described (Letellier et al. 1997; Cachot et al. 2007). PAHs concentrations of the three fractions were reported by Vignet *et al.* (Vignet et al. Submitted).

Food pellets (INICIO Plus 0.5, Biomar, France) were ground to obtain age-adapted pellets and spiked with PAH fractions. Three concentrations, 0.3X, 1X and 3X, were used with the 1X concentration corresponding to $5 \ \mu g.g^{-1}$ for the sum of concentration of 16 indicator PAHs selected by the US Environmental Protection Agency (US-EPA). This 1X concentration is representative of that found in molluscs in the Seine Estuary (Rocher et al. 2006). Diets are named after the origin of the fraction and its concentration: 1X pyrolytic fraction diet will be named: PY-1X.

Fish exposure and sampling

This study was conducted with the approval of the Animal Care Committee of France under the official licence of M.-L. Bégout (17-010). We used zebrafish wild type TU strain (ZFIN ID: 76 ZDB-GENO-990623-3), which was established in our platform (PEP – http://wwz.ifremer.fr/pep) 6 years ago as large batches of individuals originating from the Amagen platform (Gif-sur-Yvette, France) and the Pasteur Institute fish facility (Paris, France).

Detailed exposure procedures are described by Vignet *et al.* (Vignet et al. Submitted). Briefly, eggs were obtained by random pairwise mating of zebrafish placed together in spawning boxes the evening before collection (AquaSchwarz, Germany). Eggs were collected the next morning and the fertilisation rate assessed within two hours of collection: only spawns with rate above 80 % were kept. To provide as homogeneous and similar incubation conditions as possible, a minimum of five spawns were mixed and 50 embryos randomly sampled and transferred to as many Petri dishes as required for all conditions. Exposures to PY, HO and LO fraction spiked-diet were performed independently and successively in triplicates. For each exposure, a fourth control condition was included corresponding to the plain food treated as spiked-food with dichloromethane, used as carrier solvent for PAHs spiking. Embryos and larvae were maintained at 28 °C in Petri dishes in clean medium in an incubator with the same photoperiod as for adults. From 5 days post-fertilisation (dpf) larvae from each replicate were bred in separated 1 L-tanks and transferred after 12 days in 10 L-tanks in a flow-through system with a water renewal increasing with age and reaching a daily rate of 40 % after 1 month. Starting at 5 dpf, fish were fed twice a day with size-adapted food and once a day with uncontaminated *Artemia nauplii*. The size of the food pellets provided was increased as the fish aged. The ration was *ad libitum* from 5 dpf until the first biometric measures (2 or 3 months post-fertilisation (mpf)); thereafter, the quantity of food provided was 2 % of the biomass in each tank, with the exception of the PY-spiked food, for which the ration was 5 % at 2 mpf and then reduced to 2 % at 3 mpf. Rations were then adapted after each biometry on a monthly basis.

In the case of samplings dedicated to comet, EROD and micronuclei assays, fish were starved overnight and day of sampling.

Survival monitoring

Survival was monitored daily from 5 to 30 dpf and then on a monthly basis as described by Vignet *et al.* (Vignet et al. Submitted). The present study focused on latter stages and survival was calculated as a percentage of the starting number of fish for each exposure.

Histopathological evaluation

Fish were sampled at 3 mpf and 9-10 mpf for all diets except for HO-3X for which the last sampling was 7 mpf. Additional samplings were performed at 7 mpf for HO-0.3X and HO-1X and at 14 mpf for PY diets. Control fish were systematically sampled in parallel. Fish were euthanized with a lethal dose of benzocaine (250 μ g.L⁻¹; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) and fixed in 4 % formalin after ventral incision of the abdomen for larger individuals (Daouk et al. 2011). A histopathological evaluation was performed on a total of 760 fish from 3 mpf to 14 mpf (mean sex ratio of 0.52) (Table 1). The principles of step sectioning adult zebrafish have already been published (Spitsbergen et al. 2000a). After 24 h of fixation, fins, most scales and the caudal peduncle were carefully removed and samples

were dehydrated in graded ethanol solutions and embedded in paraffin. Serial sagittal step sections were cut from the left side of the fish. Four step sections from each adult fish were mounted on glass slides, 1 from eye anterior chamber level, 1 from eye posterior chamber level, 1 just medial to the eye, and 1 at the midline. Sections were routinely stained with haematoxylin-eosin-saffron (HES). Additional sections were stained with Ziehl-Neelsen acid-fast stain, Hall's bilirubin stain and Picrosirius red stain for collagen.

			F	lish	Preneoplastic lesions		Neoplastic lesions				
E	xposit	ion		Sex ratio	Pericanalar fibrosis	Bile duct epithelium			100 praser		
PAH mixture	Dose	Duration	n	M/F %M	% mild to marked	% dysplasia	FCA	Mesenchymal tumor	Adenoma	Duct carcinoma	Seminoma
PY	0	3	20	65%	13%	7%	2/20			0/15	
	0	9	30	27%	21%	7%	1/30			0/28	
	0	14	9	33%	33%	0%	0/9			0/9	
	0.3	3	20	47%	23%	0%	0/19			0/13	
	0.3	9	31	42%	37%	44%	1/31			3/27	
	0.3	14	21	43%	58%	47%	2/19	1/21 CHD		1/17	
	1	3	20	80%	15%	31%	1/19			0/13	
	1	9	30	40%	39%	39%	1/30	1/30 IST	1/30 PAD	0/28	
	1	14	20	35%	65%	60%	1/20			0/20	
	3	3	20	95%	44%	17%	0/20			2/18	2/20
	3	9	30	57%	85%	56%	2/29			4/27	1/30
	3	14	13	38%	85%	54%	0/12			3/13	
НО	0	3	20	85%	21%	5%	0/20			0/19	
	0	7	25	48%	0%	5%	0/23			0/21	
	0	10	22	91%	41%	23%	0/22			2/22	
	0.3	3	20	63%	33%	28%	0/19			0/18	
	0.3	7	25	56%	20%	32%	2/25			0/25	
	0.3	10	27	56%	78%	52%	4/27		1/27 DAD	2/27	
	1	3	20	89%	11%	11%	0/19			0/19	
	1	7	25	52%	48%	30%	0/24			3/23	2/25
	1	10	29	61%	86%	24%	1/29			13/29	
	3	3	20	80%	8%	0%	1/13			0/13	
	3	7	25	70%	29%	17%	1/24			8/24	
LO	0	3	28	43%	11%	0%	0/28			0/27	
	0	9	30	30%	63%	13%	1/30			1/30	
	0.3	3	31	42%	29%	6%	0/31			1/31	
	0.3	9	30	50%	63%	27%	0/30			4/30	
	1	3	29	28%	55%	28%	0/29			2/29	
	1	9	30	37%	90%	45%	1/30			9/29	
	3	3	30	48%	52%	41%	2/27			4/27	
	3	9	30	55%	100%	17%	0/29			21/29	2/30
Total			760	52%							

Table 1: Incidence of preneoplastic and neoplastic lesions in zebrafish dietary exposed to 4 concentrations and 3 fractions of PAHs

CHD: chondroma; EPD: endocrine pancreas adenoma; FCA: IST: intestinal stromal tumor; PDA: Pneumatic duct adenoma.

327

Immunochemistry assays were performed using i) a mouse anti-cytokeratin (CK) antibody (Dako, Glosdrup, Denmark; 1:500) for cells of epithelial origin or ii) a mouse Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) antibody (clone PC10, Abcam Inc., Cambridge, MA, USA; 1:3000) as a proliferation marker. Briefly, paraffin-embedded sections were deparaffinised and subjected to antigen retrieval respectively in Tris-EDTA pH 9.0 buffer (Zytomed Systems GmbH, Berlin, Germany) (98 °C, 40 min) and in boiling 10 mM citrate buffer (pH=6.0) for 20 min. Endogenous peroxidase activity was inhibited by incubating the samples in 3 % H2O2 in water for 10 min. The sections were then incubated for 30 min with 10 % normal goat serum (Dako). Primary antibody was incubated in 2 % BSA (Sigma, St. Louis, USA) for 1 hour at 37 °C and revealed using successively biotinylated secondary antibody (Dako, 1:300), streptavidin-peroxidase complex (Dako, 1:300) and 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Dako).

All lesions were reported by a skilled pathologist certified by the European College of Veterinary Pathology. A minimum of 4 tissue sections per fish was observed to ensure the observation of all tissues and organs. Due to the high occurrence of bile duct abnormalities, a semi-quantitative scoring was performed for all fish except those for which none bile ducts were visible on the all-4 sections. A score reflecting biliary pericanalar fibrosis (0, no lesion; 1, some collagen deposit of less than 5 μ m thick; 2, collagen deposit of less than 10 μ m thick; 3, severe continuous collagen deposit; 4, fibrodysplasia) and a score reflecting severity of the bile duct epithelium lesions (0, no lesion; 1, hyperplasia; 2, dysplasia; 3, epitheliomesenchymal transition; 4, carcinoma) were attributed.

Comet assay

For measurement of DNA strand breaks by the alkaline comet assay, 2 mpf-fish were sampled in each control and assay tank (3 fish per tank) to assess the level of DNA damage in the erythrocytes. Due to the small size of the fish, whole fish head was sampled and placed directly into 500 μ L of a freezing medium. The freezing medium made of RPMI 1640 supplemented with DMSO 20 % and SVF 25 % was then withdrawn in a 1 mL cryotube and stored in liquid nitrogen prior to analysis.

According to a previously described protocol (Akcha et al. 2003), two slides per fish were prepared with 10 μ L of sample mixed with 75 μ L of low melting point agarose (LMP). Once the last LMP agarose layer was deposited and polymerised, the slides were immersed in an ice-cold lysis buffer (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTANa₂, 0.01 M Tris base, 1 % N-sarcosinate,

10 % DMSO, 1 % Triton X-100, pH=10) for 1 h at room temperature in the dark. DNA unwinding was then performed by pre-incubating the slides in electrophoresis buffer (0.3 M NaOH, 0.001 M EDTA, pH=13) for 20 min at room temperature in the dark. DNA migration was performed in the same buffer for 12 min at 23 V (390 mA, E=0.66 V.cm⁻¹). Slides were then washed, dehydrated and dried. Just before analysis, 75 μ L of Gel Red (1:10,000) were spread on the slide for at least 1 h at 4 °C for coloration. Slides were then analysed using an optical fluorescence microscope (Olympus BX60, x40) fitted to a CDD camera (Luca-S, Andor Technology) and an image analysis system (Komet 6, Kinetic Imaging Ltd.). The percentage of DNA present in the comet tail was calculated for each observed nucleus (50 nuclei per slide).

Micronuclei assay

Micronuclei (MN) assay was performed on haemocytes from 8 to 9 month-old zebrafish. Twelve to fifteen fish (4 to 5 per replicate) from each control and assay tank were individually analysed. For HO, because of the high fish mortality observed with the highest concentration, only control, 0.3X, and 1X concentrations were examined.

Fish were anesthetised by immersion for 10 min in benzocaine solution (50 mg.L⁻¹). Caudal peduncle was cut using a clean razor blade and from 1 to 5 μ l of blood was collected from the caudal vein with a clean and heparinised 10 μ l-micropipette tip. Blood (1 μ l) was then smeared on a clean slide, air dried and then fixed in absolute ethanol for 15 min. Just before reading, slides were stained with 40 μ L acridine orange solution (0.003 % in PBS) and covered with a glass slip. Reading was processed using an epi-fluorescent microscope at x400 magnification (Olympus, Rungis, France). Micronucleated cells frequency was manually recorded from 1,000 cells per slide using blind review by a single observer. A cell was considered micronucleated if MN was round shaped, distinct from main nucleus, size inferior to a third of the main nucleus, and with a similar green staining to the main nucleus (Hayashi et al. 1998). Non-isolated, stacked, more than bi-nucleated or orange-red stained cells were not taken into account.

EROD activity

EROD activity was measured for 3 to 4 individual 2 mpf-fish per tank, according to a previously published protocol (Burgeot and Menard 2004). Briefly, whole fish were crushed in a Potter cylinder with 5 volumes of phosphate buffer. After centrifugation for 20 min at 9000 G, the kinetic of resorufin formation was measured on the supernatant fraction after addition of 7-ethoxyresorufin (2 μ M) and NADPH (0.25 mM) in a 96-well micro-plate with a spectrofluorimeter (TECAN Safire). Proteins were measured by the Bradford method and results were expressed as fmol/min/mg protein.

Kinetics of cyp1a and ahr2 genes expression

In order to decipher the kinetics of *ahr2* and *cyp1a* expression in relation with feeding, a specific starvation/feeding assay was performed with PY-3X diet. Exposures were performed as previously described with the following modifications. At 13 dpf, larvae were transferred in clean water (without food) and a 24 h starvation period was carried out. At 15 dpf (30 min after the onset of light), one part of larvae was fed again and pools of 20 larvae were sampled after 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 24 hours post-refeeding (hprf). Before this diet, 20 larvae were sampled to establish the basal level of *cyp1a* and *ahr2* at 0 hprf. The remaining part of larvae was kept starved and sampled after 10 and 24 h. As a control, an assay with the control diet was performed in parallel. Finally, larvae were euthanized, pooled, transferred in liquid nitrogen and stored at -80 °C until analysis.

Total RNA were extracted from larvae samples using Trizol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with successive chloroform/ethanol purifications following manufacturer's instructions. Then, first-strand cDNA was synthetized with a standard reverse transcription procedure from total 1 μ g of RNA using M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA) according to manufacturer's instructions. Finally, real-time PCR reactions were performed in sterile 96-wells PCR plates with StepOnePlusTM instrument (Applied Biosystems®, Life Technologies, USA) using reaction fraction based on the Fast SYBR® Green Master Mix 5X (Applied Biosystems®), and primers at 600 nM. The thermal cycling conditions were following: 10 min at 95 °C (activation), 15 s at 95 °C (denaturation), 40 s at 60 °C (hybridization) and 30 s at 72 °C (annealing) for 40 cycles. Gene's expression levels of *cyp1a* and *ahr2* were quantified by a comparative method from threshold cycle (C_T) number

and normalized from three housekeeping genes (*eef1*, *g6pd* and β *actin*). Primer sequences of target genes were designed with Primer3 software (http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/) and reported in Table 2.

Target gene	Accession Number	Primer $(5' \rightarrow 3')$
ast (aukariotic alongation factor 1)	NM 131263 1	CAGCTGATCGTTGGAGTCAA ^a
eej1 (eukarione elongation juctor 1)	11111_131203.1	TGTATGCGCTGACTTCCTTG ^Ď
g6pd (glucose-6-phosphate	BM 182602	GTCCCGAAAGGCTCCACTC ^a
dehydrogenase)	DIVI_102002	CCTCCGCTTTCCTCTC ^Ď
Ractin (heta-actin)	NM 131031	CCCAGACATCAGGGAGTGAT ^a
pacim (beia-acim)	11111_131031	CACAATACCGTGCTCAATGG ^D
cvn14 (cvtochrome P45014)	BC094977	GACAGGCGCTCCTAAAACAG
cypia (cylochrome 1 4501A)	DC0)4)//	CTGAACGCCAGACTCTTTCC ^Ď
ahr? (am) hydrocarbon recentor ?)	NM 131264	GCCTGGGATAAAGGAGGAAG
	11111_131204	CAGCTCCACCTGTCCAAAT ^Ď
a/b, Forward/Reverse primers		

Table 3: Specific primers sequences for target genes measured by real-time PCR

Statistical analysis

Unless otherwise mentioned, reported results are means \pm SEM. All statistical analyses were carried out at a 95% level of significance. Differences in survival were assessed within each diet using Log-rank (Mantel-Cox) test using Prism (Graphpad) software. Statistical analyses of histopathological results were performed with Statistica 9.0 software (Statsoft, Tulsa, OK, USA).

A GLM model was applied with age or PAH fraction tested as fixed factors, replicate, tank and gender as random ones. Only results for fixed factors and for the interaction between them are presented in the text. Post-hoc tests were performed using Newman-Keuls in each case. No tank effect was detected and an individual effect was only detected on tumor incidence at 3 mpf and on presence of epithelium dysplasia in LO-exposed fish. Global incidences, i.e. proportion of fish presenting duct epithelium dysplasia, pericanalar fibrosis or duct carcinomas, were analysed using chi-square test.

Raw comet data were Ln transformed to reach normality and then analysed by a one way-ANOVA with Statistica Software. For micronuclei assay, comparisons of mean

frequency were performed using one-way ANOVA after checking for normal distribution of data (Shapiro-Wilk's test on 1 % residues) and variance homogeneity (Levene's test).

Gene expression data were analysed with a Relative Expression Software Tool REST-2009[©] (Qiagen, http://www.REST.de.com). At 0 hprf, PY-3X data was given in relative expression ratio compared to the control condition. For other analysed times, relative expression of the fed larvae was compared to that of the starved ones.

Results

This work is part of a larger program that included analysis of other effects following exposure to the same diets. Chemical analysis of fractions, diets and metabolites are presented elsewhere (Vignet et al. Submitted). Briefly, PY fraction was characterized by a high proportion of heavy PAHs and almost no substituted derivatives. HO fraction contained moderate levels of heavy PAHs and alkylated derivatives. LO fraction contained low level of heavy PAHs and a high level of alkylated ones. Diets composition reflected the one of fractions. The concentration for the 16 US-EPA PAHs in 1X diets were PY-1X: 4505 ± 1527 , LO-1X: 2739 ± 231 and HO-1X: 1887 ± 130 ng.g⁻¹ dry weight and the total concentration of PAHs (included alkylated ones) was similar in the three 1X diets: 5816 ± 1433 , 4663 ± 360 and 6726 ± 278 ng.g⁻¹ for PY, HO and LO respectively. Quantification of hydroxylated metabolites in 15 dpf-larvae confirmed fish contamination and results were consistent with diet composition.

Mortality

Survival was assessed separately for each PAH fraction using Log-rank (Mantel-Cox) test (Fig. 1). No difference was observed between concentrations for PY fraction (Chi-square value=0.80; p=0.849). For HO and LO diets, survival curves were different between concentrations, (respectively Chi-square value=36.30; p<0.0001 and Chi-square value=13.86; p=0.003). In the absence of post-hoc test, it is difficult to individualize differences for LO diet. In the case of HO, HO-3X curve is clearly under the other curves starting from 3 mpf. Due to the high mortality observed in fish fed with HO-3X fraction, we decided to anticipate the sampling of fish fed with HO to 7 mpf instead of the 9 mpf initially planned in order to

avoid the risk of the complete loss of a treatment group. All HO-3X remaining fish and 25 fish from other HO concentrations were then sampled at 7 mpf to allow comparisons.

Global incidence of preneoplastic and neoplastic lesions

A total of 264, 258 and 238 fish fed during 3 to 14 months with a diet containing respectively PY, HO or LO at 4 concentrations (3 PAH concentrations and one control condition), were examined microscopically after sectioning and HES staining. Liver was the primary target organ in PAH contaminated zebrafish with recorded lesions in hepatocytes and bile duct epithelial cells. In addition to liver, neoplasia also occurred in testis, intestine and pancreas, although at a relatively low frequency (Table 1).

Some dissimilarity regarding tumor incidences were identified between PAH fractions (Fig. 2, left panel). Neoplasm incidences significantly increased with time of exposure to HO and LO (respectively F=11.92; p<0.001 and F=27.26; p<0.001) but not to PY (Fig. 2), and with concentration of PY (F=5.07; p=0.002), HO (F=11.34; p<0.001), and LO (F=18.57; p<0.001). There is an interaction between time and concentration in HO (F=3.09; p=0.010) and in LO (F=8.06; p<0.001). Considering in more details the evolution of carcinogenesis, at 3 mpf, we observed neoplasms in PY-3X, LO-0.3X, -1X and -3X (Table 1) with a significant effect of the concentration (F=6.45; p<0.001) but not of the fraction. At this time point, the number of tumor was significantly higher in PY-3X than in HO-3X (p=0.015). Due to the high mortality recorded all along the study in the HO-3X group, experiment was stopped in this group at 7 mpf, a time when neoplasm incidence reached already 33 % (8 out of 24). At 9 mpf, all concentrations considered, 17 % (5 out of 29) and 72 % (21 out of 29) of fish exposed to PY and LO respectively displayed neoplasm compared to 4 % (3 out of 82) in the control fish groups. An effect of the fraction (F=9.13; p<0.001), of the concentration (F=18.08; p<0.001) and an interaction between concentration and fraction (F=6.18; p<0.001) were identified at this time point. In the absence of data for HO-3X group at 9 mpf, we demonstrated a significant carcinogenic effect for HO-1X and LO-3X diets compared to control (p=0.003 and p<0.001) and a higher carcinogenic effect for LO-3X compared to PY-3X and for HO-1X compared to PY-1X (respectively p<0.001 and p=0.002). The carcinogenic effect of LO-1X was intermediate and could not be differentiated statistically from that of PY-1X or from HO-1X.



Figure 1: Survival of adults after exposure to PAH fractions. Kaplan-Meier survival plots are presented indicating survival rates for each fraction and concentration. Note that because of the high mortality occurring in the HO exposure, all the remaining HO-3X fish were sampled for histology analysis, at 6 mpf. This explains why the curve stops at 180 days. Log-rank (Mantel-Cox) test indicated significant differences for HO survival rates (Chi-square value=36.30; p<0.0001) and LO (Chi-square value=13.86; p=0.003) but not PY (Chi-square value=0.80; p=0.849)



Figure 2: Neoplasm incidence (left panel) and biliary epithelium mean score (right panel) of zebrafish exposed to various concentrations and fractions of PAHs. Mean scores are mean \pm SD. Different letters indicate that values differ significantly (p <0.05)

Nature of preneoplastic lesions

- Hepatocellular alteration foci

For consistency, only foci of cellular alteration (FCA) of more than 10 hepatocytes were considered and classified upon their staining with HES as eosinophilic, clear cell and basophilic foci (Fig 3). Respectively, 5.5 % (11 out of 199), 5.0 % (9 out of 180) and 2.8 % (5 out of 176) FCA were identified after PY, HO or LO exposure, all concentrations considered (Table 1). The global incidence in control groups was 2.2 % (4 out of 182). No significant effect of the gender, the age or the fraction could be identified on FCA incidences. Clear cell foci were globally more frequent (60 % of all observed FCA) and consisted of pale, finely vacuolated hepatocytes with granular cytoplasm. Eosinophilic foci (24 % of all FCA) appeared as round or irregular sharply delineated foci of hypereosinophilic slightly enlarged hepatocytes. Basophilic foci (16 % of all FCA) appeared round and consisted of clusters of smaller hepatocytes with hyperbasophilic or amphophilic cytoplasm.



Figure 3: Hepatic parenchyma of zebrafish exposed to various concentrations and fractions of PAHs. (a) Normal hepatic parenchyma of a control fish exposed to control. (b) Clear cell foci of cellular alteration (FCA) in a fish exposed to PY-0.3X, 14 mpf. (c) Eosinophilic FCA in a fish exposed to PY-3X, 9 mpf. (d) Basophilic FCA in a fish exposed to LO-3X, 3 mpf. (a-d) Haematoxylin-Eosin-Saffron. Bars = 100 μ m (a, c) or 50 μ m (b, d)

- Biliary epithelium lesions

A systematic scoring of biliary epithelium lesions was performed. Bile duct epithelium appeared normally (score=0) as a monolayered cylindrical or cuboidal epithelium with a very low proliferation activity as assessed by PCNA labelling (Fig. 4, a-b). Bile duct hyperplasia (score=1) was a common finding in all zebrafish and consisted of an increased number of well-differentiated bile ducts with a typical epithelium displaying higher number of mitosis than in normal ducts (Fig. 4, d-e). The number of fish displaying hyperplastic bile ducts was stable between 3 and 9-10 months in control groups (34 % for both time points) while the number of fish with a higher score slightly increased from 3 to 18 %. In contaminated fish, the number of fish with a score of 1 slightly decreased from 34 % to 26 % during this time period, with a parallel global increase from 24 % to 62 % in the number of fish with a higher score (Table 1). Microscopically, dysplastic epithelium (score=2) appeared as a multi-layered and irregularly stratified epithelium and consisted of cells displaying pleomorphic, anisocytosis, anisokaryosis and high nucleo-cytoplasmic ratio (Fig.4, g). Number of mitotic cells was focally increased (Fig.4, h). In some samples displaying a dysplastic and highly proliferative duct epithelium, a few cells appeared elongated with loose intercellular bounds (Fig.4, j-k). They reached individually the pericanalar stroma through the basal membrane (Fig.4, 1) that is highly evocative of epithelio-mesenchymal transition (score=3). A mean biliary epithelium score was calculated for each group (Fig. 2, right panel). No significant effect of the fraction could be detected at 3 mpf in fish exposed to PY and HO but score of fish exposed to LO-1X and LO-3X were increased compared to control. At 7 mpf, a significant effect of the exposure to HO was identified for all concentrations compared to control. From 9 mpf, the mean score ranged [0.1-1.2] in control animals and contrasted with the ones calculated in exposed animals, ranging [1.3-3.4] (Fig. 2). At 9-10 mpf, a significant effect of the fraction (F=10.19; p<0.001), and the concentration (F=38.83, p<0.001) was demonstrated with an interaction between both factors (F=2.32; p=0.044). The relative potency could be summarized as follow: LO-3X > PY-3X, HO-1X > PY-1X and LO-1X > PY-1X (p<0.001, p=0.002 and p=0.002 respectively) while potency of HO-1X and LO-1X could not be distinguished. At 14 mpf, an effect of PY was identified for all concentrations compared to control.



Figure 4: Bile duct of zebrafish exposed to various concentrations and fractions of PAHs. A semiquantitative score (0 to 4) was attributed for each fish regarding bile duct epithelial lesions (left panel) and proliferation activity (middle panel). A second score (0 to 4) reflected the pericanalar amount of connective tissue (right panel). Contrasting with the normal appearance of bile ducts (a-c), hyperplastic ducts appeared with numerous mitotic cells (d, open arrowhead and e), sometimes surrounded with a thickened layer (*) of connective tissue (f). Dysplastic ducts were multi-layered with cellular atypias (g) and with a mild proliferation activity (h). During epithelio-mesenchymal transition, some epithelial cells appeared elongated, loosely attached to other epithelial cells (j-k, arrowhead) and disrupting basal membrane (l, arrowhead). Bile duct carcinomas (m) were composed of clusters and cords of neoplastic cells (arrowheads), sometimes with tubular differentiation. The proliferation activity was very high (n). Neoplastic cells were scattered in an abundant collagenic stroma (n, *). (left panel) Haematoxylin-Eosin-Saffron. (middle panel) Immunolabelling of the Proliferating Cell Nuclear Antigen. (right panel) Picrosirius red. (a-o) Bars = 10 μ m

- Cholangiofibrosis

Bile duct epithelium lies normally on a basal membrane surrounded by scant connective tissue (Fig.4, c). In our study, the amount of connective tissue around bile ducts was frequently increased as evidenced in HES sections (Fig. 4, left panel) and this thickening was associated with the presence of several fibroblasts with a large euchromatic and nucleolated nucleus indicative of their active state. The collagenous nature of this densified tissue was confirmed with a specific Picrosirius red stain (Fig 4, right panel). The number of fish displaying mild to marked pericanalar fibrosis in control groups increased with time from 15 % at 3 mpf to 43 % at 9-10 mpf. Pericanalar fibrosis also increased following exposure to all contaminated diets from [11-55 %] to [37-100 %] at the same time points (Table 1). Significant effects of both the fraction, the concentration and an interaction between them were identified at 3 mpf (F=3.52, p=0.031; F=3.81, p=0.011; F=2.24, p=0.041 respectively) and 9-10 mpf (F=14.28, p<0.001; F=25.47, p<0.001; F=2.87, p=0.015). Pericanalar fibrosis was shown to be associated with bile duct epithelium dysplasia (Chi-squared test, p<0.001).

Neoplastic lesions

The nature of the 94 observed tumors is indicated in Table 1. The vast majority of tumors were of epithelial origin except one chondroma and one intestinal stromal tumor, both of mesenchymal origin and originating in these two cases from the intestinal wall (Table 1). Most tumors (91 out of 94) were malignant, with visible infiltration of peripheral tissues in 50 % of cases. These tumors are described below. Only 3 tumors were classified as benign, always consisted of a well-demarcated mass slightly compressing peripheral tissues and were identified as a chondroma, an adenoma of endocrine pancreas origin and a pneumatic duct adenoma.

- Duct carcinoma

Nodular proliferation of duct cells was observed in liver or more rarely in pancreas (Fig. 4 and 5). According to their common duct epithelium origin, we chose to indifferently call these two neoplasms "duct carcinoma" in this report, without considering their hepatic or pancreatic primary site. This name should reflected more properly their very similar appearance and their high propensity to infiltrate peripheral tissues that sometimes precluded

identification of the tissue origin of the tumor. Duct cells proliferation and transformation most frequently occurred in the anterior area of the liver near the emergence of the common bile duct. The early very invasive behaviour and the abundance of atypias were indicative of their carcinomatous nature.

Duct carcinomas formed large tumors, without significant increase in the mean size of tumors from 3 to 14 mpf. Neoplasms were composed of disorganized clusters of atypical, variably sized, branching and tortuous ductules and ducts often admixed with abundant proliferating dense collagenous or myxoid stroma (Fig. 4, m and o and Fig. 5, a). Lining neoplastic epithelium was usually simple, but in some regular instance was irregularly stratified with occasional extension through the basement membrane. Neoplastic cells could either be cohesive and polygonal, reminiscent of their epithelial origin, or isolated and elongated with fine cytoplasmic processes. The proliferation activity was very high (Fig. 4, n). A spindle cell proliferation around ducts was frequently associated, sometimes making it difficult to distinguish between proliferating neoplastic ducts and a highly cellular stroma. Special staining and immunohistochemical analysis confirmed the presence of scattered epithelial cells in the stroma, isolated, in little clusters or forming small ductules with a collapsed lumen (Fig 5, c).

Neoplasm infiltration first occurred in the surrounding parenchyma and larger tumors in the liver additionally extended through the hepatic capsule and invaded directly of adjacent tissues and organs, including intestine, pancreas and spleen. The only observed form of distant metastasis was transcoelomic after fragmentation of the primary tumor into the peritoneal cavity with occasional implantation and invasion into abdominal fat, pancreas and peritoneal wall. No vascular emboli or distant metastasis in tissues away from the pleuroperitoneal cavity could be observed.

Duct carcinomas were observed in control and exposed fish from 3 to 14 mpf. Global incidences ranged [0-3.2 %] in control fish compared to incidences of 7.4 %, 14.6 % and 23.4 % in fish exposed to PY, HO and LO respectively with a significant effect of the fraction (Chi-squared test, respectively p=0.012, p<0.001 and p<0.001).

- Seminoma

In the present study, seminomas were the second most commonly found tumor with 7 occurrences. These tumors were observed in fish exposed to PAHs at 1X and 3X concentrations all fractions considered. Fish age at the time of observation ranged from 3 to 9

mpf. None seminoma was observed in non-exposed fish and no significant difference of incidence could be identified between the 3 PAH fractions. These neoplasms were often very large, always exhibiting a very aggressive behaviour, invading large parts of the body cavity and infiltrating abdominal tissues. The tumors were solid with only a few lobules containing spermatocytes and spermatids (Fig 6). A severe inflammatory infiltration was frequently associated.



Figure 5: Carcinoma of zebrafish exposed to various concentrations and fractions of PAHs. (a) Bile duct carcinoma (black arrowhead), also called cholangiocarcinoma, in the liver of a fish exposed to LO-3X, 9 mpf. Note the adjacent proliferative bile ducts from which the tumor arose (open arrowhead). (b) Pancreatic duct carcinoma (black arrowhead) in a fish exposed to LO-0.3X, 9 mpf. (c) Bile duct carcinoma in the liver of a fish exposed to HO-3X, 7 mpf. Cytoplasm of neoplastic cells was positive for cytokeratin, indicative of their epithelial origin. Some isolated neoplastic cells could be identified (arrow). (a, b) Haematoxylin-Eosin-Saffron. (c) Pancytokeratin immunohistolabelling. Bars = 50 μ m (a, c) or 100 μ m (b)



Figure 6: Spermatocytic seminoma in a zebrafish exposed to PY-3X, 9 mpf. Haematoxylin-Eosin-Saffron. Bar = $50 \ \mu m$

Sporadic findings

Other lesions included developmental lesions of the heart, the eyes and the organs of reproduction. These results not directly related to the carcinogenic study will be reported elsewhere (Lucas et al. 2013; Vignet et al. Submitted). Some inflammatory lesions, predominantly macrophage aggregates and granulomas, were sporadically found in the body cavity or in the ovary. Atypical nephrocytes that stained more basophilic than normal nephrocytes were infrequently and undifferentially observed in exposed and control fish. Hamartoma of pseudobranch was observed in 2 fish, near the normal pseudobranch. This was a well-differentiated redundant pseudobranchial tissue.

Genotoxic effects

Genotoxicity was evaluated at 2 mpf using comet assays to assess repairable DNA damages and at 9 mpf using MN assay to assess non-repairable DNA damages.

Due to the small size of the fish exposed to the HO and LO diets, blood was very difficult to collect and, as a consequence, the number of nuclei available on the slides was too small to be significant. By applying the comet assay in fish fed with the PY-contaminated diet, no difference in the extent of DNA damage was observed compared to the control group (p=0.37), whatever the concentration (Fig. 7).



Figure 7: Mean tail DNA value as an indicator of DNA fragmentation level in fish exposed to various concentrations of a pyrolytic fraction (N=12 to 15 in each group)

Micronuclei analysis was performed on blood cells of adult zebrafish fed for 9 months with PY-, LO- or HO-contaminated diets (Fig. 8). MN frequency ranged from 0.07 to 0.33 ‰ with no significant difference (ANOVA, p>0.05) between fractions. A relatively high interindividual variability was observed.



Figure 8: Micronuclei frequency (‰) in haemocytes of adult zebrafish fed with of PAH-contaminated diet for 9 months. No significant differences were observed between treatment groups (ANOVA, p>0.05, N=3)

Metabolism activation and kinetics

EROD activity results are presented in table 3. No significant effect of the exposure to PAHs was detected (Tukey test) except between control group and fish fed with diet containing HO-0.3X (p=0.020) in which EROD activity was increased (fold-change=1.9).

	Control	0.3X	1X	3X
PY	39.5 ± 8.8	94.8 ± 43.2	81.2 ± 33.0	78.8 ± 17.7
НО	27.6 ± 7.8	$51.6\pm5.9*$	37.9 ± 5.5	40.6 ± 10.9
LO	38.3 ± 8.5	53.6 ± 3.4	44.6 ± 4.9	58.9 ± 8.7
* p<0.05				

Table 3: Mean EROD activity in whole fish exposed to 4 concentrations and 3 fractions of PAHs (N=3 to 4 in each group)

To investigate the possible consequence of sampling procedure on comet and EROD assays, the kinetics of *cyp1a* and *ahr2* expression after feeding were analysed on PY-3X larvae. Expression of *cyp1a* was measured following a 24 h starvation period (0 hprf) of larvae exposed to PY-3X and of control larvae (Fig. 9). At 0 hprf, *cyp1a* expression was only slightly up-regulated in PY-3X fish (fold-change=1.3; p<0.001). This expression was highly up-regulated in refed PY-3X larvae compared to starved PY-3X larvae from 2 to 8 hprf (fold-change range [5.5-11.3]; p<0.001). No significant difference was observed in expression levels at 10 hprf (p=0.177). At 24 hprf, *cyp1a* expression was not different from the basal level (0 hprf) (p=0.325).

Regarding, the aryl hydrocarbon receptor 2 (*ahr2*), no significant expression change was revealed after a contaminated refeeding from 0 to 4 hprf (p=0.346, p=0.325, p=0.825 and p=0.325) and from 10 to 24 hprf (p=0.830 and p=0.177). However, *ahr2* expression was 0.9-fold repressed in refed PY-3X larvae at 6 and 8 hprf respectively (p<0.001).



Figure 9: Expression kinetics of genes in 16 dpf larvae exposed to PY-3X spiked diet demonstrating an induction of cyp1a levels (a) and a repression of ahr2 levels (b) following nutritional/starvation assay. Data are given in relative expression mean \pm SEM. *** denote significant differences as compared to control condition at t0 and their respective starved condition for other analysis time (p<0.001). Stars placed at the top of markers indicate an up-regulation and below, a down-regulation.

Discussion

Despite numerous toxicological studies on individual PAHs, little is known about effects of long-term trophic exposure to PAHs as mixtures containing dozens of molecules that are effectively encountered in environmental situations. This is in particular due to the fact that wild-caught fish could have been exposed to other carcinogenic compounds or to other confounding factors. The aim of the present study is to document carcinogenic and genotoxic effects induced by exposure to PAHs from the first meal and maintained afterwards.

Neoplasm incidences

In order to exhaustively describe here all preneoplastic and neoplastic lesions and characterize the full range of carcinogen responsiveness of all tissues, serial step sections of the entire body of exposed and control zebrafish were observed microscopically. Descriptive studies of chemically induced tumors in zebrafish have frequently omitted in the past to report complete data concerning fish strain, fish age or spectrum of investigated tissue. Additionally, naturally occurring tumors in zebrafish have only been identified in a few published works (Spitsbergen et al. 1997b; Smolowitz et al. 2002). This information would be useful to compare results between carcinogenesis studies. Reported incidences of spontaneous neoplasia in zebrafish colonies must therefore be taken cautiously but always seems to be relatively low, evaluated to approximately 1 % (Spitsbergen et al. 1997a). An incidence of 4 % was found in our control fish, which is in agreement with this low basal level.

After chronic exposure of seven or more months to PAH fractions, incidences of neoplasia ranged from 17 % to 72 % with the lowest carcinogenic effect observed with the PY fraction and the highest with the HO one. A clear concentration-effect relationship was additionally demonstrated for all tested fractions. As a comparison with two of the most potent PAHs characterized to date, a maximal incidence of 23 % of zebrafish developing neoplasia was reported after dietary exposure to 1,000 ppm of DMBA for 12 weeks from 2 months of age (Spitsbergen et al. 2000a) and no increase of the incidence with time. Medaka or even trout are believed to be much more sensible to carcinogenic effects in similar conditions (Reddy et al. 1999a).
Effect latency

Several times of exposure were documented here for the first time. The survival was decreased as soon as 3 mpf in the high concentration group of fish exposed to HO, confirming the already observed higher toxicity of this fraction (Le Bihanic et al. Submitted-a; Le Bihanic et al. Submitted-b; Vignet et al. Submitted). Effect on survival was only detected afterwards in fish exposed to LO and no effect on survival was identified in fish exposed to PY. Regarding tumors, neoplasms were observed as soon as 3 mpf only after exposure to the highest level of PY or LO.

Target tissues and cells

In the few published data, the most commonly reported spontaneous neoplasms in zebrafish are epithelial, including seminoma, dysgerminoma, adenoma of exocrine pancreas and hepatocellular adenoma and less frequently intestinal adenocarcinoma (Spitsbergen et al. 2000a; Smolowitz et al. 2002). In our study, a large majority of neoplasms were tumors of epithelial origin and corresponded mainly to duct carcinomas and to seminomas. Mesenchymal tumors were very few as previously reported (Spitsbergen et al. 2000a).

Our study identified liver as the main target organ after a chronic dietary exposure to PAHs. This is in accordance with other reports identifying liver tumors (including those derived from hepatocellular, bile duct, blood vessel and Kupffer cells) as predominant following exposure of various fish species to DMBA or BaP (Bailey et al. 1984; Hendricks et al. 1985; Fong et al. 1993; Bailey et al. 1996; Bunton 1996; Reddy et al. 1999b; Wills et al. 2010). Rare gastric tumors were additionally observed with lower incidence in the rainbow trout (Fong et al. 1993) and similarly, very few intestinal tumors were recorded here in the agastric zebrafish. In PAH-contaminated sites, a high prevalence of hepatic preneoplastic or neoplastic lesions was also reported in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) (Vogelbein et al. 1990), North American winter flounders (*Pleuronectes americanus*) and European flounders (*Platichthys flesus*) (Murchelano and Wolke 1985, 1991; Cachot et al. 2013).

The large predominance of duct carcinomas of hepatic origin described here contrasts with the neoplasm incidences reported by Spitsbergen *et al.* in juvenile zebrafish (2 mpf) dietary exposed to DMBA for 4 months (500 to 1,000 ppm) (Spitsbergen et al. 2000a). In this last study, intestinal and gill neoplasms were identified with respective incidences of 7 and

4 %. Only 3 duct carcinomas, originating from the pancreas, and no liver neoplasm were observed. The main distinctive parameters with our study, that are age of onset of exposure and nature of the PAH, may explain the discrepancy in target tissues (Spitsbergen et al. 2000b). In liver, in addition to bile duct tumors, FCA were sporadically seen but their global low incidence precludes any correlation with the exposure to PAHs. None liver adenoma or hepatocarcinoma was observed although FCA is considered to represent the first morphological stage in the progression of hepatic neoplasia in rodents and fish (Maronpot et al. 1986; Hendricks et al. 1995; Boorman et al. 1997; Hobbie et al. 2012). In mummichog subjected to acute aqueous expositions to BaP, incidences of both FCA and hepatocellular carcinomas have been described to be increased (Wills et al. 2010).

The histologic appearance of tumors in zebrafish is similar to that of the human counterpart, including increased frequency of mitosis and atypical nuclei (Goessling et al. 2007). A comparison of the human and zebrafish genomes reveals the conservation of cancer-relevant oncogenes, tumor suppressor genes, and cell cycle genes (Amatruda et al. 2002). The histologic similarity and genetic conservation suggests that the genetic mechanisms underlying carcinogenesis in zebrafish may be highly similar to those in humans. A recent study compared the gene expression signatures in chemically induced liver tumors in zebrafish to human hepatocellular carcinoma (Lam et al. 2006). Another study analysed deregulation of genes involved in cell cycle, apoptosis, DNA repair, and metastasis in zebrafish liver tumors and revealed that the genetic changes in both species were significantly correlated (Goessling et al. 2007).

Carcinogenesis mechanisms

The carcinogenic mechanisms implicated in duct tumor progression were not elucidated here despite several investigations. In particular no evidences of repairable or irreversible DNA damages were observed. Unfortunately, genotoxic effects were only documented in haemocytes due to their higher accessibility for sampling. We cannot rule out DNA damages in other tissues, particularly in bile ducts whose cells displayed preneoplastic lesions correlated to the fraction and the dose of exposure and from which most neoplasms derived. Indeed, PAHs are known to be bioavailable and quickly metabolized by fish hepatic enzymes as confirmed here by the kinetic of *cyp1a* expression after feeding or, in other studies, by the rapid production of biliary PAH-metabolites after exposure (Wessel et al. 2010; Le Du-

Lacoste et al. 2013). Among these metabolites, 3-hydroxybenzo[a]pyrene is believed to be one of the most genotoxic (Aas et al. 2000; Ruddock et al. 2003; Brinkmann et al. 2010; Le Du-Lacoste et al. 2013). Several studies have also reported the genotoxicity of compounds such as nitrogen-, sulfur- and/or oxygen-containing PAHs or their alkyl substituted analogues (Burczynski and Penning 2000; Binet et al. 2002; Francioni et al. 2007; Ramos de Rainho et al. 2013).

All the three fractions tested here have genotoxic potential. In the case of the PYcontaminated diet, genotoxicity may be driven by high molecular weight PAHs such as BaP from which metabolites were quantified in larvae exposed to this diet (Vignet et al. Submitted). Regarding the LO-contaminated diet, genotoxicity should rather be due to the high level of alkylated PAHs as genotoxicity of these compounds and their metabolites have already been documented (Burczynski and Penning 2000; Francioni et al. 2007). As for HOcontaminated diet, it displayed high levels of both heavy PAHs, including BaP, and methylated ones. Additionally we cannot exclude the role of compounds that were not quantified here as some recent studies focused on the important role of uncharacterized polar contaminants such as nitro-PAHs, aromatic amines and sulfur compounds in the global mutagenicity of PAH fractions (Amat et al. 2004; Wahidulla and Rajamanickam 2010; Di Giorgio et al. 2011).

The chronic exposure of bile duct cells to some of these compounds may be responsible from their higher rate of proliferation depicted in the present study but also from the formation of DNA base oxidation or DNA adducts resulting in the induction of neoplasms originating from these specific cells. Noteworthy, genotoxicity assessed by the comet assay was demonstrated to be higher in trout larvae exposed for 10 days to HO fractions compared to larvae exposed to LO or PY fractions (Le Bihanic et al. Submitted-b). This result would be in accordance with the higher carcinogenic potency of the HO fraction highlighted in the present study.

Direct alteration to DNA is not the sole mechanism of chemical carcinogenesis and a large number of chemicals can produce cancer in animal models (as well as in humans) without any genotoxic effect. It is now assumed that the multistage carcinogenic process can result from an increase in cellular proliferation (Cohen and Arnold 2011). Although some PAH-metabolites are well-known DNA-reactive carcinogens at high levels, our results at lower levels suggest that some PAHs might chronically increase the duct cell proliferation rate. In accordance to this hypothesis, it has been recently described in Medaka, the induction of TGF- \Box 1 expression after dimethylnitrosamine exposure in some liver cells, including

preductular epithelial cells. TGF- \Box 1 expression results in collagenous matrix deposition, spindle cell proliferation and hepatocellular and biliary carcinomas (Hobbie et al. 2012). In accordance to this work, we found some collagenous deposits around bile ducts of fish exposed to PAHs eliciting a progressive thickening of the pericanalar space. Other mechanisms, like epigenetic alterations and DNA methylation alterations, may have also contributed to carcinogenesis without DNA-adduct formation by specific silencing of tumor suppressor gene expression or by aberrant activation of tumor-promoting genes (Oliveira et al. 2007; Pogribny and Beland 2012).

Taken together these results indicated that chronic dietary exposures of zebrafish to environmentally relevant doses and mixtures of PAHs elicited carcinogenic events with a high frequency and in a narrow range of tissues. Due to their invasive behaviour, tumor growth had detrimental effects on adult fish survival. Despite their very contrasted compositions, pyrolytic and petrogenic mixtures were similar regarding the array of induced preneoplastic and neoplastic lesions suggesting shared carcinogenic mechanisms.

Acknowledgements

We thank Lucette Joassard, Julie Lucas and Didier Leguay for their help in zebrafish maintenance. This study was supported financially by the Agence Nationale de la Recherche in the frame of the project 'ConPhyPoP' (CES 09_002). Doctoral grants were received from the région Poitou-Charentes (C.V.), from l'Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer and Conseil général de Charente Maritime (P.P.) and from the ministère de l'enseignement supérieur de la recherche (F.L.).

References

Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B, Andersen OK (2000) PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. Aquat Toxicol 51 (2):241-258.

- Akcha F, Burgeot T, Narbonne JF, Garrigues P (2003) Metabolic activation of PAHs: role of DNA adduct formation in induced carcinogenesis. In: Douben P (ed) PAHs: an ecological perspective. Wiley and Sons, London, pp 65-79.
- Amat A, Pfohl-Leszkowicz A, Castegnaro M (2004) Genotoxic activity of thiophenes on liver human cell line (HepG2). Polycyclic Aromatic Compounds 24 (4-5):733-742.
- Amatruda JF, Shepard JL, Stern HM, Zon LI (2002) Zebrafish as a cancer model system. Cancer Cell 1 (3):229-231.
- Bailey GS, Hendricks JD, Nixon JE, Pawlowski NE (1984) The sensitivity of rainbow trout and other fish to carcinogens. Drug Metab Rev 15 (4):725-750.
- Bailey GS, Williams DE, Hendricks JD (1996) Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. Environ Health Perspect 104 Suppl 1:5-21.
- Baumann PC (1989) PAH, metabolites, and neoplasia in feral fish populations. In: Varanasi U (ed) Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, pp 269-289.
- Billiard SM, Hahn ME, Franks DG, Peterson RE, Bols NC, Hodson PV (2002) Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 133 (1):55-68.
- Binet S, Pfohl-Leszkowicz A, Brandt H, Lafontaine M, Castegnaro M (2002) Bitumen fumes: review of work on the potential risk to workers and the present knowledge on its origin. Sci Total Environ 300 (1-3):37-49.
- Boorman GA, Botts S, Bunton TE, Fournie JW, Harshbarger JC, Hawkins WE, Hinton DE, Jokinen MP, Okihiro MS, Wolfe MJ (1997) Diagnostic criteria for degenerative, inflammatory, proliferative nonneoplastic and neoplastic liver lesions in medaka (*Oryzias latipes*): consensus of a National Toxicology Program Pathology Working Group. Toxicol Pathol 25 (2):202-210.
- Brinkmann M, Hudjetz S, Cofalla C, Roger S, Kammann U, Giesy JP, Hecker M, Wiseman S, Zhang X, Wölz J, Schüttrumpf H, Hollert H (2010) A combined hydraulic and toxicological approach to assess re-suspended sediments during simulated flood events. Part I, multiple biomarkers in rainbow trout. J Soils Sediments 10 (7):1347-1361.
- Bunton TE (1996) Experimental chemical carcinogenesis in fish. Toxicol Pathol 24 (5):603-618.

- Burczynski ME, Penning TM (2000) Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon orthoquinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. Cancer Res 60 (4):908-915.
- Burgeot T, Menard D (2004) Mesure de l'activité ethoxy-O-déethylase (EROD) chez les poissons marins. In: IFREMER (ed) Méthodes d'analyses en milieu marin. p 25 (in French).
- Cachot J, Cherel Y, Larcher T, Pfohl-Leszkowicz A, Laroche J, Quiniou L, Morin J, Schmitz J, Burgeot T, Pottier D (2013) Histopathological lesions and DNA adducts in the liver of European flounder (*Platichthys flesus*) collected in the Seine estuary versus two reference estuarine systems on the French Atlantic coast. Environ Sci Pollut Res Int 20 (2):723-737.
- Cachot J, 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. Environ Sci Technol 41 (22):7830-7836.
- Cohen SM, Arnold LL (2011) Chemical carcinogenesis. Toxicol Sci 120 Suppl 1:S76-92.
- Daouk T, Larcher T, Roupsard F, Lyphout L, Rigaud C, Ledevin M, Loizeau V, Cousin X (2011) Long-term food-exposure of zebrafish to PCB mixtures mimicking some environmental situations induces ovary pathology and impairs reproduction ability. Aquat Toxicol 105 (3-4):270-278.
- Di Giorgio C, Malleret L, Gueydon-Morin C, Rigaud S, De Méo M (2011) Comparison of two extraction procedures for the assessment of sediment genotoxicity: Implication of polar organic compounds. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 725 (1–2):1-12.
- Fernandez-Tajes J, Florez F, Pereira S, Rabade T, Laffon B, Mendez J (2011) Use of three bivalve species for biomonitoring a polluted estuarine environment. Environ Monit Assess 177 (1-4):289-300.
- Fong AT, Dashwood RH, Cheng R, Mathews C, Ford B, Hendricks JD, Bailey GS (1993) Carcinogenicity, metabolism and Ki-ras proto-oncogene activation by 7,12dimethylbenz[a]anthracene in rainbow trout embryos. Carcinogenesis 14 (4):629-635.
- Francioni E, Wagener Ade L, Scofield Ade L, Depledge MH, Cavalier B, Sette CB, Carvalhosa L, Lozinsky C, Mariath R (2007) Polycyclic aromatic hydrocarbon in inter-tidal mussel Perna perna: space-time observations, source investigation and genotoxicity. Sci Total Environ 372 (2-3):515-531.

- Goessling W, North TE, Zon LI (2007) New waves of discovery: modeling cancer in zebrafish. J Clin Oncol 25 (17):2473-2479.
- Hawkins WE, Walker WW, Fournie JW, Manning CS, Krol RM (2003) Use of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*) and guppy (*Poecilia reticulata*) in carcinogenesis testing under national toxicology program protocols. Toxicol Pathol 31 Suppl:88-91.
- Hawkins WE, Walker WW, Overstreet RM, Lytle JS, Lytle TF (1990) Carcinogenic effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons on the Japanese medaka and guppy in waterborne exposures. Sci Total Environ 94 (1-2):155-167.
- Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinae N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano N, Sofuni T, Ojima Y (1998) Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. Mutat Res-Fundam Mol Mech Mutag 399 (2):125-133.
- Hendricks JD, Meyers TR, Shelton DW, Casteel JL, Bailey GS (1985) Hepatocarcinogenicity of benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. J Natl Cancer Inst 74 (4):839-851.
- Hendricks JD, Shelton DW, Loveland PM, Pereira CB, Bailey GS (1995) Carcinogenicity of dietary dimethylnitrosomorpholine, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, and dibromoethane in rainbow trout. Toxicol Pathol 23 (4):447-457.
- Hobbie KR, DeAngelo AB, George MH, Law JM (2012) Neoplastic and Nonneoplastic Liver Lesions Induced by Dimethylnitrosamine in Japanese Medaka Fish. Vet Pathol 49 (2):372-385.
- Hylland K (2006) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) ecotoxicology in marine ecosystems. J Tox Environ Health 69 (1-2):109-123.
- Jonsson G, Bechmann RK, Bamber SD, Baussant T (2004) Bioconcentration, biotransformation, and elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sheepshead minnows (*Cyprinodon variegatus*) exposed to contaminated seawater. Environ Toxicol Chem 23 (6):1538-1548.
- Lam SH, Wu YL, Vega VB, Miller LD, Spitsbergen J, Tong Y, Zhan H, Govindarajan KR, Lee S, Mathavan S, Murthy KR, Buhler DR, Liu ET, Gong Z (2006) Conservation of gene expression signatures between zebrafish and human liver tumors and tumor progression. Nat Biotechnol 24 (1):73-75.
- Le Bihanic F, Clérandeau C, Morin B, Cousin X, Cachot J (Submitted-a) Toxicity of PAH mixtures on *Oryzias latipes* early life stages. Part 1: Developmental toxicity.

- Le Bihanic F, Morin B, Cousin X, Le Menach K, Budzinski H, Cachot J (Submitted-b) Comparative toxicity of Pyrolytic, Arabian Light and Erika PAH fractions on rainbow trout early life stages.
- Le Du-Lacoste M, Akcha F, Devier MH, Morin B, Burgeot T, Budzinski H (2013) Comparative study of different exposure routes on the biotransformation and genotoxicity of PAHs in the flatfish species, Scophthalmus maximus. Environ Sci Pollut Res Int 20 (2):690-707.
- Le Goff J, Gallois J, Pelhuet L, Devier MH, Budzinski H, Pottier D, Andre V, Cachot J (2006) DNA adduct measurements in zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, Pallas. Potential use for genotoxicant biomonitoring of fresh water ecosystems. Aquat Toxicol 79 (1):55-64.
- Letellier M, Budzinski H, Garrigues P, Wise SA (1997) Focused Microwave-assisted Extraction of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Open Cell from Reference Materials (Sediment, Soil, Air Particulate). Spectroscopy 13:71-80.
- Lucas J, Percelay I, Larcher T, Lefrancois C (2013) Trophic contamination by pyrolytic and petrogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: effects on swimming performance in zebrafish *Danio rerio*. Submitted.
- Maronpot RR, Montgomery CA, Jr., Boorman GA, McConnell EE (1986) National Toxicology Program nomenclature for hepatoproliferative lesions of rats. Toxicol Pathol 14 (2):263-273.
- Mastrangelo G, Fadda E, Marzia V (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons and cancer in man. Environ Health Perspect 104 (11):1166-1170.
- Mersch-Sundermann V, Mochayedi S, Kevekordes S (1992) Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in Escherichia coli PQ37. Mutat Res 278 (1):1-9.
- Murchelano RA, Wolke RE (1985) Epizootic Carcinoma in the Winter Flounder, *Pseudopleuronectes americanus*. Science 228 (4699):587-589.
- Murchelano RA, Wolke RE (1991) Neoplasms and nonneoplastic liver lesions in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. Environ Health Perspect 90:17-26.
- Myers MS, Landahl JT, Krahn MM, McCain BB (1991) Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West Coast. Environ Health Perspect 90:7-15.
- Neff J (1979) Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment: sources, fates and biological effects. Essex: Applied Sciences Publishers Ltd.

- Oliveira PA, Colaco A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz PL, Lopes C (2007) Chemical carcinogenesis. An Acad Bras Cienc 79 (4):593-616.
- Otte JC, Schmidt AD, Hollert H, Braunbeck T (2010) Spatio-temporal development of CYP1 activity in early life-stages of zebrafish (*Danio rerio*). Aquat Toxicol 100 (1):38-50.
- Pogribny IP, Beland FA (2012) DNA methylome alterations in chemical carcinogenesis. Cancer Lett.
- Ramos de Rainho C, Machado Correa S, Luiz Mazzei J, Alessandra Fortes Aiub C, Felzenszwalb I (2013) Genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and nitroderived in respirable airborne particulate matter collected from urban areas of rio de janeiro (Brazil). Biomed Res Int 2013:765352.
- Reddy A, Spitsbergen J, Hendricks J, Bailey G (1999a) An ED0.1 dose-response tumor study of the environmental carcinogen dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P) in rainbow trout. Proc Am Assoc Cancer Res 40:507.
- Reddy AP, Spitsbergen JM, Mathews C, Hendricks JD, Bailey GS (1999b) Experimental hepatic tumorigenicity by environmental hydrocarbon dibenzo[a,l]pyrene. J Environ Pathol Toxicol Oncol 18 (4):261-269.
- Rice CA, Myers MS, Willis ML, French BL, Casillas E (2000) From sediment bioassay to fish biomarker--connecting the dots using simple trophic relationships. Mar Environ Res 50 (1-5):527-533.
- Rocher B, Le Goff J, Peluhet L, Briand M, Manduzio H, Gallois J, Devier MH, Geffard O, Gricourt L, Augagneur S, Budzinski H, Pottier D, Andre V, Lebailly P, Cachot J (2006) Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. Aquat Toxicol 79 (1):65-77.
- Ruddock PJ, Bird DJ, McEvoy J, Peters LD (2003) Bile metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in European eels *Anguilla anguilla* from United Kingdom estuaries. Sci Total Environ 301 (1-3):105-117.
- Shen H, Huang Y, Wang R, Zhu D, Li W, Shen G, Wang B, Zhang Y, Chen Y, Lu Y, Chen H, Li T, Sun K, Li B, Liu W, Liu J, Tao S (2013) Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. Environ Sci Technol 47 (12):6415-6424.
- Smolowitz R, Hanley J, Richmond H (2002) A Three-Year Retrospective Study of Abdominal Tumors in Zebrafish Maintained in an Aquatic Laboratory Animal Facility. Biol Bull 203 (2):265-266.

- Spitsbergen J, Tsai H, Reddy A, Hendricks J (1997a) Response of zebrafish to a panel of structurally diverse carcinogens. Proc Am Assoc Cancer Res 38:354.
- Spitsbergen JM, Tsai H, Reddy A, Hendricks J (1997b) Response of zebrafish to a panel of structurally diverse carcinogens. Proc Am Assoc Cancer Res 38:354.
- Spitsbergen JM, Tsai HW, Reddy A, Miller T, Arbogast D, Hendricks JD, Bailey GS (2000a) Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7,12-dimethylbenz[a]anthracene by two exposure routes at different developmental stages. Toxicol Pathol 28 (5):705-715.
- Spitsbergen JM, Tsai HW, Reddy A, Miller T, Arbogast D, Hendricks JD, Bailey GS (2000b) Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with N-methyl-N'-nitro-Nnitrosoguanidine by three exposure routes at different developmental stages. Toxicol Pathol 28 (5):716-725.
- Stanton MF (1965) Diethylnitrosamine-induced hepatic degeneration and neoplasia in the aquarium fish, *Brachydanio rerio*. J Natl Cancer Inst 34:117-130.
- Vignet C, Le Menach K, Lucas J, Perrichon P, Mazurais D, Le Bihanic F, Lyphout L, Frère L, Bégout M-L, Zambonino-Infante JL, Budzinski H, Cousin X (Submitted) Chronic exposures to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs through diet produce physiological disruptions in zebrafish - Part I: Survival and growth.
- Vogelbein WK, Fournie JW, Van Veld PA, Huggett RJ (1990) Hepatic neoplasms in the mummichog *Fundulus heteroclitus* from a creosote-contaminated site. Cancer Res 50 (18):5978-5986.
- Wahidulla S, Rajamanickam YR (2010) Detection of DNA damage in fish Oreochromis mossambicus induced by co-exposure to phenanthrene and nitrite by ESI-MS/MS. Environ Sci Pollut Res Int 17 (2):441-452.
- Ward JM (1981) Morphology of foci of altered hepatocytes and naturally-occurring hepatocellular tumors in F344 rats. Virchows Arch A Pathol Anat Histol 390 (3):339-345.
- Warshawsky D (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbons in carcinogenesis. Environ Health Perspect 107 (4):317-319.
- Wessel N, Santos R, Menard D, Le Menach K, Buchet V, Lebayon N, Loizeau V, Burgeot T, Budzinski H, Akcha F (2010) Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). Mar Environ Res 69 Suppl:S71-73.

- White PA, Robitaille S, Rasmussen JB (1999) Heritable reproductive effects of benzo[a]pyrene on the fathead minnow (*Pimephales promelas*). Environ Toxicol Chem 18 (8):1843-1847.
- Wills LP, Jung D, Koehrn K, Zhu S, Willett KL, Hinton DE, Di Giulio RT (2010) Comparative chronic liver toxicity of benzo[a]pyrene in two populations of the atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) with different exposure histories. Environ Health Perspect 118 (10):1376-1381.

Développement de tests embryonnaires prédictifs d'effets toxiques précoces et tardifs pour des molécules hydrophobes.

Résumé

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) sont des polluants ubiquistes dont le niveau d'émission est en constante augmentation en raison de l'intensification des activités anthropiques. Ces composés semi-persistants dans l'environnement représentent une menace pour les organismes. La santé et l'équilibre des systèmes naturels sont essentiels au maintien de la vie et au fonctionnement de la société. L'évaluation de l'impact de ces composés est alors devenue un véritable enjeu sociétal, établissant ainsi des mesures Européennes législatives (Directive Cadre sur l'Eau) et réglementaires (REACH, enregistrement, évaluation, autorisation et restriction de produits chimiques) pour une meilleure gestion des risques (éco)toxicologiques. Dans ce contexte, de nombreux biotests ont vu le jour afin d'évaluer la dangerosité des substances chimiques (ou de leurs mélanges), la qualité du milieu environnant et de comprendre les mécanismes d'action toxique sur les organismes. L'objectif de cette étude était alors de définir les risques (éco)toxicologiques liés à des expositions par les HAP à travers des tests embryo-larvaires de poisson, utilisant un modèle éprouvé, le poisson zèbre Danio rerio. Afin d'évaluer le transfert, le devenir et les effets toxiques de HAP, deux approches complémentaires (chimique et biologique) ont été utilisées. Les réponses biologiques induites ont été évalués à différents niveaux d'intégration biologique, des réponses moléculaires (stress oxydatif, dommages à l'ADN, EROD) aux modifications comportementales (Réponse PhotoMotrice), en passant par des altérations morphologiques et physiologiques (rythme cardiaque). Parmi les trois voies de contamination utilisées, l'exposition par contact avec le sédiment ne s'est pas révélée appropriée pour l'évaluation de la toxicité de HAP, contrairement aux expositions par voie aqueuse à partir de fractions hydrosolubles de produits pétroliers, qui sont plus reproductibles, intégratives et révélatrices des effets toxiques à plusieurs échelles. Suite à ces expérimentations, le champ d'observation des effets induits devrait être élargi au-delà des temps normalisés par l'Organisation de Coopération et de Développement Économique afin de ne pas sous-estimer le caractère létal du ou des composé(s) exposés. De plus, notre étude multigénérationnelle a mis en évidence des perturbations physiologiques et comportementales chez la première génération de descendance issue de parents contaminés par voie trophique à trois extraits aromatiques d'origine pyrolytique et pétrogénique (lourd et léger). Bien que le transfert de la contamination n'a pas été révélé, les altérations observées (probablement dues à des modifications génétiques et épigénétiques) chez les stades précoces de poisson zèbre, pourraient avoir des conséquences néfastes sur la survie et le recrutement des populations. Les études multigénérationnelles constituent ainsi des approches intégrées pour l'évaluation de la toxicité des composés exposés et permettent de renforcer le caractère prédictif des effets. Ces études écotoxicologiques devraient être largement déployées afin d'évaluer le potentiel qu'une population exposée a pour se maintenir dans le futur.

<u>*Mots clés*</u> : Écotoxicologie, embryons et larves de poisson zèbre, hydrocarbures aromatiques polycycliques, sédiment, WAF de pétrole, contamination trophique, descendance, multimarqueurs.

Development of embryo-larval assays to predict early and later toxic effects of hydrophobic substances

Abstract

PAHs are ubiquitous widespread contaminants which emissions are overgrowing with increasing anthropogenic activities. These semi-persistent chemicals are threatening organisms in the environment. Ecosystems health and resilience are essential to life and societal functioning. Impact assessment of these chemicals is a real requirement for society thereby establishing the European legislative (DCE, Water Framework Directive) and regulations (REACH, Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals) for better (eco)toxicological risk management. In this context, many bioassays have been developed to assess environmental quality, the toxicity of chemicals (including mixture) on organisms and its underlying mechanisms. This study aimed to identify (eco)toxicological risks in the context of fish embryo-larval assay, using a relevant and wellknown model: the zebrafish Danio rerio. Two complementary approaches (chemical and biological) were used to assess transfer, fate and toxicity of PAHs. Induced-responses were evaluated at different levels of biological organization, from molecular (oxidative stress, DNA damage, EROD) to physiological (cardiac activity), behavioral (PhotoMotor Response) and morphological levels. Among the three exposure routes tested, the sediment contact exposure was not suitable for PAHs toxicity assessment. In contrast, exposures to water-accommodated fractions (WAF) of petroleum products represented a more reproducible, sensitive and integrative approach for testing multiscale toxic effects. Following these experiments, the observation scope of induced effects should be broadened beyond the standard duration recommended by the Organization for Economic Cooperation and Development in order not to underestimate the acute effect of the tested-compounds.

Furthermore, our multigenerational study showed physiological and behavioral disturbances on the first generation of offspring providing from parents exposed to contaminated-food with three aromatic extracts pyrolytic and petrogenic origin (heavy and light). Although the contamination transfer of PAHs has not been revealed, the observed alterations (probably due to a transfer through genetic and epigenetic modifications) in the early stages of zebrafish could have adverse effects on survival and recruitment populations. Multigenerational studies prove to be an integrated approach for the toxicity assessment of chemicals and strengthen the predictive effects. These ecotoxicological studies should be widely undertaken to evaluate the potential for exposed-population to maintain in the future time.

<u>*Keywords*</u>: Ecotoxicology, zebrafish embryos and larvae, polycyclic aromatic hydrocarbons, sediment, WAF, trophic exposure, offspring, multimarkers.