



HAL
open science

Réponse aux stress multiples chez les poissons : effets croisés de la température et des cocktails de pesticides

Allison Gandar

► **To cite this version:**

Allison Gandar. Réponse aux stress multiples chez les poissons : effets croisés de la température et des cocktails de pesticides. *Ecologie, Environnement*. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30310 . tel-01400793

HAL Id: tel-01400793

<https://theses.hal.science/tel-01400793>

Submitted on 22 Nov 2016

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.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Allison GANDAR

Le 10 Décembre 2015

Titre :

Réponse aux stress multiples chez les poissons :
effets croisés de la température et des cocktails de pesticides

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED SDU2E : Écologie fonctionnelle

Unité de recherche :

ECOLAB - Laboratoire d'Ecologie Fonctionnelle

Directeur/trice(s) de Thèse :

M. Pascal LAFFAILLE - PR INPT

Mme Séverine JEAN - MCF INPT

Jury :

Mme Michelle GUE - PRU Toulouse 3 - Présidente du Jury
M. Jean LAROCHE - PRU Bretagne Occidentale - Rapporteur
M. Patrice GONZALEZ - CR CNRS - Rapporteur
M. Philippe CIFFROY - CS EDF R&D - Examineur
M. Pascal LAFFAILLE - PR INPT - Codirecteur de thèse
Mme Séverine JEAN - MCF INPT - Codirectrice de thèse

A mes parents.

"Tout est mystère, et la clé d'un mystère est un autre mystère"

Ralph Waldo Emerson

"Our bodies are made of extraordinarily unstable material.

Pulses of energy, so minute that very delicate methods are required to measure them,

course along our nerves.

On reaching muscles they find there a substance so delicately sensitive to slight disturbance that,

like an explosive touched off by a fuse,

it may discharge in a powerful movement."

Walter Bradford Cannon

AVANT PROPOS

Les recherches menées dans le cadre de travail de thèse ont en partie été financées par "ADAPT'EAU" (ANR-11-CEPL-008), un projet supporté l'Agence Nationale de la Recherche (ANR) dans le cadre du programme "The Global Environmental Changes and Societies" (GEC&S). Certaines analyses ont également été financées par le projet "ATTENAGUA" (SOE3/P2/F558) supporté par le programme SUDOE Interreg.IV du Fond Européen de Développement Régional (FEDER).



Ces travaux ont également fait l'objet de collaborations entre différents laboratoires. Nos remerciements vont à l'ensemble des équipes de recherches des laboratoires :

- ECOLAB, UMR 5245: CNRS, UPS, INP-ENVT, Toulouse et Castanet, France
- GENPHYSE, UMR 1388 : INRA, INP-ENVT, ENSAT, Castanet, France
- TOXALIM et la plateforme GENOTOUL-METATOUL, UMR 1331 : INRA, INP-ENVT, UPS, Saint-Martin du-Touch, France
- IMBE, UMR 7263 : CNRS, Université Aix-Marseille, IRD, Université Avignon, Marseille, France
- SEBIO, UMR-I 02 : INERIS, Université de Reims Champagne-Ardenne, Université du Havre, Reims, France



REMERCIEMENTS

La réalisation d'une thèse de doctorat peut sembler un chemin long et difficile. C'est parce que il est long et difficile. Mais c'est aussi l'expression d'une passion pour la découverte et la recherche nourrie par des années d'études, d'apprentissage, d'expériences de laboratoire ou de terrain mais également, et surtout, humaines.

Mes remerciements vont à mes deux directeurs de stage, le Pr. Pascal Laffaille et le Dr. Séverine Jean, qui m'ont donnée l'opportunité de réaliser cette thèse. Leur disponibilité, leur soutien dans les moments difficiles, leurs encouragements et les coups de pieds aux fesses (parfois) nécessaires m'ont permis d'arriver au bout de ce travail sans encombre.

Toute ma gratitude va également à Nathalie M.-G. et Annie P. pour le travail incroyable qu'elles ont fait pour m'aider dans mes expériences et analyses, mais également pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur persévérance et leur soutien de tous les instants.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont appris à disséquer des poissons et se sont relayées à mes côtés lors des expérimentations avec pour seul motif de rendre service et de m'aider : Corinne B., Corinne P., Hélène M., Cécile B. et Christine J. Un grand merci également à Franck G., Caroline M., Laure G., Rémy L., Julie C., Mélissa A.-S., Aurore A. et toutes les autres personnes qui m'ont apporté leur aide et leur savoir-faire à un moment ou à autre de cette thèse. Je tiens également à remercier Cécile C., Marie T.F et Roselyne G. pour leur travail en métabolomique.

Un merci spécial aussi à Lisa J. pour avoir pris le temps de relire une grande partie de ce manuscrit. Bien que ses corrections et remarques m'ai (très) souvent donné envie de jeter mon ordinateur par la fenêtre, elles ont été d'une aide extrêmement précieuse.

Je remercie également tous les amis, les collègues et la famille parce qu'il faut beaucoup de patience, de bienveillance et d'abnégation pour supporter les grand-huit émotionnels, le stress, les silences et parfois la mauvaise humeur d'une thésarde en pleine rédaction. Un merci spécial pour Samuel T. pour son soutien moral et nutritif sans faille les derniers mois de la rédaction de ce manuscrit de thèse.

Pour finir, je remercie tout particulièrement mes parents. Parce qu'ils ont été mon premier soutien depuis le premier jour et qu'ils sont encore derrière moi aujourd'hui, et ce quel que soient mes choix et mes décisions. Pour la liberté, la confiance et la force que vous m'avez donnée, je vous aime.

ARTICLES, CONFERENCES ET POSTERS

ARTICLES

Gandar A., Jean S., Canal J., Marty-Gasset N., Gilbert F. and Laffaille P., 2015. Multi-stress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism. *Environmental Sciences and Pollution Research*. 3(10): 3323-3331.

Gandar A., Laffaille P, Molette C., Marty-Gasset N. and Jean S. Proteome response of *Carassius auratus* to pesticide mixture exposure and temperature rising. *In prep.*

Gandar A., Laffaille P., Canlet C., Perrault A., Tremblay-Franco M., Budzinski H., Tapie N and Jean S. Adaptive response of *Carassius auratus* to combined chemical and thermal stresses: from the molecular to individual level. *In prep.*

COMMUNICATIONS ORALES

Adaptive response of fish under multi-stress exposure: from the molecular to the individual level. A. Gandar, P. Laffaille, C. Canlet, M. Tremblay-Franco, A. Perrault, H. Budzinski, N. Tapie and S. Jean. PRIMO18 International Congress – Trondheim, Norvège – 24 au 27 Mai 2015.

Effets croisés des pesticides et de la température sur les poissons : apports de la protéomique et de l'analyse en réseaux biologiques. A. Gandar, P. Laffaille, C. Molette, N. Marty-Gasset, S. Jean. Congrès SEFA – Bordeaux, France – 30 Juin et 1^{er} Juillet 2015.

Pesticides mixtures and fish: from cellular responses to behavioral changes. A. Gandar, S. Jean, L. Jacquin, F. Gilbert, C. Molette, N. Marty-Gasset, P. Laffaille. SEFS9 International Congress – Genève, Suisse – 05 au 10 Juillet 2015.

COMMUNICATIONS SOUS FORME DE POSTERS

Crossed-effects between temperature and pesticides on a freshwater fish of wetlands. A. Gandar, S. Jean, J. Canal, F. Gilbert, N. Marty-Gasset, J.M. Sanchez-Perez, P. Laffaille. International Wetlands Conference – Huesca, Spain – 2014.

Crossed-effect between temperature and pesticides on fish: contribution of metabolomics approaches. P. Pardo, A. Gandar, C. Canlet, M. Tremblay-Franco, C. Molette, J.M. Sanchez-Perez, P. Laffaille, S. Jean. 8èmes Journées Scientifiques du Réseau Français de Métabolomique et Fluxomique – Lyon, France – 19 au 21 Mai 2014.

Metabolic responses of fish under multi-stress exposure: Pesticides vs. thermal effects. A. Gandar, P. Laffaille, C. Canlet, M. Tremblay-Franco, A. Perrault, H. Budzinski, N. Tapie and S. Jean. Congrès SEFA – Bordeaux, France – 30 Juin et 1^{er} Juillet 2015.

Crossed-effect of pesticides and temperature on goldfish behavior. M. Aguirre-Smith, L. Jacquin, A. Gandar, A. Aguetz, A. Perrault and S. Jean. Congrès SEFA – Bordeaux, France – 30 Juin et 1^{er} Juillet 2015.

TABLE DES MATIERES

Avant propos	5
Remerciements	7
Articles, conférences et posters	9
Table des matières	11
Liste des figures.....	15
Liste des tables.....	17
Liste des acronymes	19
INTRODUCTION GENERALE	21
CHAPITRE 1. ETAT DE L'ART.....	25
1. La réponse au stress	27
1.1. DEFINITION DU STRESS	27
1.2. LES FACTEURS DE STRESS	28
1.3. LA REPONSE AU STRESS : CADRE THEORIQUE	28
1.3.1. <i>Le syndrome d'adaptation général</i>	29
1.3.2. <i>La cascade de réponses au stress</i>	30
1.4. LA REPONSE PRIMAIRE : ASPECTS NEUROENDOCRINIENS	31
1.5. LES REPONSES SECONDAIRES	33
1.5.1. <i>Aspects moléculaires</i>	33
1.5.2. <i>Aspects cellulaires</i>	35
1.5.3. <i>Aspects physiologiques généraux</i>	40
1.6. LES REPONSES TERTIAIRES	42
1.6.1. <i>Aspects comportementaux</i>	42
1.6.2. <i>Conséquences générales sur la croissance, la reproduction et la santé</i>	44
1.6.3. <i>Aspects énergétiques</i>	46
1.7. CONCLUSIONS SUR LES REPONSES AU STRESS	50
RESUME	53
2. Les pesticides	55
2.1. ROLES ET UTILISATIONS DES PESTICIDES	55
2.2. CONTAMINATION DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES ET EVALUATION DES RISQUES	60

2.2.1. <i>La contamination des écosystèmes aquatiques en France</i>	60
2.2.2. <i>Evaluation des risques pour les écosystèmes aquatiques et aspects législatifs</i>	62
2.2.3. <i>Le problème des crues de printemps</i>	66
2.2.4. <i>Effets des pesticides sur les écosystèmes et communautés aquatiques</i>	67
2.3. EFFETS DIRECTS DES HERBICIDES ET FONGICIDES SUR LES POISSONS	68
2.3.1. <i>Aspects neuroendocriniens</i>	69
2.3.2. <i>Effets moléculaires et conséquences cellulaires et tissulaires</i>	71
2.3.3. <i>Effets sur le comportement</i>	78
2.3.4. <i>Effets sur la survie, la croissance, la reproduction et le développement</i>	84
2.3.5. <i>Conclusion sur les effets directs</i>	85
2.4. LES MELANGES COMPLEXES DE PESTICIDES : UN ENJEUX EN ECOTOXICOLOGIE	85
2.5. CONCLUSION SUR LES PESTICIDES	89
RESUME	91
3. La température	93
3.1. SOURCES DE VARIATIONS THERMIQUES DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES	93
3.1.1. <i>Variations de température d'origine naturelle</i>	93
3.1.2. <i>Stress thermiques d'origine anthropique</i>	95
3.2. TOLERANCE THERMIQUE DES POISSONS	96
3.2.1. <i>Températures optimales, critiques et létales</i>	96
3.3. REPONSE ADAPTATIVE AUX CHANGEMENTS DE TEMPERATURE.....	97
3.3.1. <i>Aspects moléculaires de l'acclimatation à la température</i>	98
3.3.2. <i>Aspects cellulaires et physiologiques : le concept de tolérance thermique limitée par l'oxygène</i>	100
3.3.3. <i>Conséquences écologiques</i>	102
RESUME	106
4. Les effets multi-stress	107
4.1. DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES SOUS CONTRAINTES	107
4.2. EFFETS CROISES DE LA TEMPERATURE ET DES POLLUANTS	109
4.2.1. <i>Effets de la température sur la toxicité des polluants</i>	110
4.2.2. <i>Effets des polluants sur la tolérance thermique des organismes aquatiques</i>	110
4.3. MECANISMES D'INTERACTION	111
4.4. CONCLUSION SUR LES EFFETS CROISES TEMPERATURE-POLLUANTS	113
RESUME	115
5. Objectifs de la thèse et structure du manuscrit	117

CHAPITRE 2. MATERIEL ET METHODES.....	121
1. Le cadre de l'étude	123
1.1. LE MODELE BIOLOGIQUE : CARASSIUS AURATUS	123
1.1.1. <i>Origine et distribution géographique actuelle</i>	123
1.1.2. <i>Phylogénie et description</i>	123
1.1.3. <i>Biologie et écophysiologie du carassin</i>	125
1.1.4. <i>Un modèle biologique de plus en plus utilisé</i>	125
1.2. LE COCKTAIL DE PESTICIDES	126
1.2.1. <i>Contexte environnemental</i>	126
1.2.2. <i>Choix des molécules</i>	126
1.3. LES TEMPERATURES D'EXPOSITION	129
2. Design expérimental	131
2.1. STABILISATION ET ACCLIMATATION THERMIQUE DES POISSONS.....	131
2.2. MESURES DE REDUCTION DU STRESS DES POISSONS.....	131
2.3. EXPERIENCE 1.....	132
2.4. EXPERIENCE 2.....	134
2.5. EXPERIENCE 3.....	136
3. Protocoles	139
3.1. LES REPONSES COMPORTEMENTALES	139
3.1.1. <i>Mesures du remaniement sédimentaire</i>	139
3.1.2. <i>Locomotion et comportement exploratoire</i>	139
3.1.3. <i>Comportement alimentaire</i>	141
3.2. LES INDICES DE CONDITIONS.....	142
3.2.1. <i>L'indice de condition globale de Fulton</i>	142
3.2.2. <i>Indices somatique</i>	142
3.3. RESERVES ENERGETIQUES, ACTIVITE DE L'ETS ET CONSOMMATION CELLULAIRE EN ENERGIE.....	143
3.3.1. <i>Principes</i>	143
3.3.2. <i>Protocole</i>	143
3.3.3. <i>Analyses des résultats</i>	144
3.4. ACTIVITE DES SYSTEMES DE DEFENSE ENZYMATIQUES	146
3.4.1. <i>Principe général</i>	146
3.4.2. <i>Extraction de la PMS et dosage de la concentration en protéine</i>	146
3.4.3. <i>La catalase (CAT)</i>	146
3.4.4. <i>Les superoxydes dismutases (SODs)</i>	148
3.4.5. <i>La glutathion-S-transférase (GST)</i>	148

3.5. DOSAGE DU CORTISOL PLASMATIQUE.....	149
3.5.1. <i>Principes</i>	149
3.5.2. <i>Protocole</i>	149
3.5.3. <i>Analyse des résultats</i>	151
3.6. PROTEOMIQUE-2D ET ANALYSE EN RESEAUX BIOLOGIQUES	151
3.6.1. <i>Principes</i>	151
3.6.2. <i>Extraction des protéines</i>	151
3.6.3. <i>Electrophorèse 2D</i>	152
3.6.4. <i>Alignement des gels et détermination des spots différentiels</i>	152
3.6.5. <i>Excision des spots et séquençage des protéines</i>	152
3.6.6. <i>Analyse des réseaux biologiques</i>	153
3.7. ANALYSE EN METABOLOMIQUE.....	154
3.7.1. <i>Principes</i>	154
3.7.2. <i>Protocole</i>	154
3.7.3. <i>Traitement des données</i>	157
3.7.4. <i>Identification et validation</i>	158
3.8. ANALYSES STATISTIQUES.....	158
CHAPITRE 3. REPONSES COMPORTEMENTALES ET PHYSIOLOGIQUES.....	159
Résumé du chapitre	161
Article 1	167
Complément 1	181
CHAPITRE 4. REPONSE DU PROTEOME HEPATIQUE	195
Résumé du chapitre	197
Article 2	203
CHAPITRE 5. REPONSES ADAPTATIVES AUX STRESS MULTIPLES.....	233
Résumé du chapitre	235
Article 3	239
CHAPITRE 6. SYNTHESE GENERALE ET CONCLUSION	263
1. Synthèse générale	265
2. Conclusions et perspectives	272
REFERENCES.....	275

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Facteurs de stress chez les poissons.....	28
Figure 2. La réponse au stress chez les poissons.....	31
Figure 3. Sécrétions des catécholamines et des glucocorticoïdes chez les poissons sous l'effet d'un stress.....	32
Figure 4. Effet du cortisol sur le métabolisme énergétique.....	37
Figure 5. Conséquences de la réponse comportementale à un stress environnemental.....	43
Figure 6. Effet du stress sur la reproduction.....	45
Figure 7. Effet d'un stress sur l'allocation des ressources énergétiques.....	47
Figure 8. Représentation schématique du concept de capacité métabolique de Fry.....	48
Figure 9. Stratégies métaboliques en réponse à un stress modéré ou extrême.....	51
Figure 10. Infographie sur l'utilisation des pesticides dans le monde.....	58
Figure 11. Infographie sur l'utilisation des pesticides en France.....	59
Figure 12. Nombre de pesticides quantifiés (en haut) et concentration totale en pesticides (en bas) dans les cours d'eau français en 2012.....	61
Figure 13. Les pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau de métropole en 2012.....	62
Figure 14. Concentration de l'atrazine et débit de l'eau en sortie d'un réseau de drainage sur l'Orgeval (Bassin de la Seine, 77).....	66
Figure 15. Interactions possibles entre les polluants.....	87
Figure 16. Proportion des différents types d'interaction selon la nature des polluants présents dans le mélange....	88
Figure 17. Variations journalières et saisonnières de la température et amplitudes thermiques.....	94
Figure 18. Températures de l'eau mesurée dans le bassin versant du Sornin (département du Rhône) au cours de l'été 2012 et tolérance thermique de la truite fario.....	94
Figure 19. Changement climatique global observé et prédit.....	95
Figure 20. Limites de tolérance thermique de différents groupes de poissons.....	97
Figure 21. Effets de la température sur la performance des organismes et réponses adaptatives au stress thermique.....	103
Figure 22. Effets potentiels des changements climatiques sur les communautés.....	105
Figure 23. Interactions possibles entre les changements climatiques et les contaminants.....	108
Figure 24. Fréquence des types de corrélations entre la toxicité des polluants sur les organismes aquatiques et les facteurs environnementaux (température, statut nutritionnel et salinité).....	109
Figure 25. Effets croisés de la température et des polluants sur la performance biologique des organismes et sur la tolérance aux stress.....	114
Figure 26. Objectifs de la thèse, démarches expérimentales, réponses observées et organisation du manuscrit....	116
Figure 27. Le carassin doré, <i>Carassius auratus</i>	124
Figure 28. Contexte géographique de l'étude.....	127
Figure 29. Effet de la température sur le métabolisme et la vitesse de nage du carassin doré [393].....	128
Figure 30. Evolution de la température de l'eau de la Garonne en 2003 à Golfech (en haut) et à Toulouse (en bas) [410].....	128
Figure 31. Expérience 1 : Design expérimental, chronologie et réponses observées.....	133
Figure 32. Expérience 2 : design expérimental, chronologie et réponses observées.....	135
Figure 33. Expérience 3 : design experimental, chronologie et réponses observées.....	137
Figure 34. Protocole de mesure du remaniement sédimentaire.....	140
Figure 35. Exemples de trajectoires filmées et extraites par le logiciel Tracker (v4.8, comPADRE).....	141
Figure 36. Protocole de dosage des réserves énergétiques et de l'activité du système de transport d'électron (ETS).....	145

Figure 37. Protocole de dosage de l'activité des systèmes de défense enzymatiques.....	147
Figure 38. Principes du dosage du cortisol plasmatique par radio immunologie.	150
Figure 39. Principes de l'analyse des données générées par l'analyse non ciblée du métabolome par résonance magnétique nucléaire.	155
Figure 40. Protocoles d'extraction des métabolites testés	156
Figure 41. Mode d'action du mélange de pesticides à 22°C sur le carassin doré de l'échelle moléculaire jusqu'à l'individu : synthèse des résultats présentés dans les chapitres 3 et 4.	267
Figure 42. Effets croisés du mélange de pesticide et de l'augmentation de la température : synthèse des résultats présentés dans les chapitres 3 et 4.	269

Article 1

Figure 1. Effects of pesticide exposure and temperature rising on behavior and physiological parameters of an aquatic fish species, <i>Carassius auratus</i> : experimental design.	172
Figure 2. Effects of pesticide exposure and temperature rising on sediment reworking activity of an aquatic fish species, <i>Carassius auratus</i>	174
Figure 3. Effects of pesticide exposure and temperature rising on physiological parameters of an aquatic fish species, <i>Carassius auratus</i>	174

Complément 1

Figure 1. Effets des pesticides et de la température sur la locomotion du carassin doré.	184
Figure 2. Evolution du comportement entre T0 et T96h : effets des pesticides et de la température.	185
Figure 3. Effets des pesticides et de la température sur le comportement alimentaire des poissons.	186
Figure 4. Estimation de la fonction de survie par la méthode de Kaplan-Meier pour le comportement alimentaire.	186
Figure 5. Effets des pesticides et de la température sur la perte de poids (A) et de l'IGS (B) du carassin doré.	187

Article 2.

Figure 1. Physico-chemical parameters of the experiment.	208
Figure 2. Representative 2-D gel with regulated proteins according to pesticides and temperature exposure.	209
Figure 3. PCA score plots for 2D proteomic analysis in liver extract of goldfish exposed to pesticide mixtures and temperature rising.	212
Figure 4. Canonical pathway implied in the liver proteome response of <i>Carassius auratus</i> to pesticide exposure and temperature rising.	215
Figure 5. Diseases and biological functions involved in the liver response of goldfish exposed to (A) low dose (LD) and (B) high dose (HD) of pesticide mixture at 22°C.	216

Article 3.

Figure 1. Exemple of 600 MHz ¹ H NMR spectra of liver extract (A) and score plots for OSC-PLS-DA of NMR data (B, C, D).	248
Figure 2. Canonical representations of endocrine, physiological and metabolic responses of goldfish to individual and combined chemical and thermal stresses.	250
Figure 3. Defense system induction in goldfish exposed to individual and combined chemical and thermal stresses.	251

LISTE DES TABLES

Tableau 1. Exemples de pesticides classés selon leurs familles chimiques et leurs cibles principales.....	56
Tableau 2. Exemples de Normes de Qualité Environnementale (NQE) et de Valeurs Guides Environnementales (VGE) pour quelques pesticides.....	65
Tableau 3. Réponse des systèmes antioxydants et marqueurs d'effets moléculaires de stress oxydant chez des poissons exposés aux herbicides et fongicides.....	74
Tableau 4. Dommages tissulaires induits par les herbicides et les fongicides chez les poissons.....	79
Tableau 5. Les grands challenges en écotoxicologie.....	86
Tableau 6. Composition des mélanges de pesticides et concentrations.....	127
Tableau 7. Paramètres d'acquisition des spectres 1D en RMN-H+	157

Article 1

Table 1. Compositions and characteristics of the two mixtures of pesticides: MIX1 et MIX2 for total concentrations of 8.4 and 42 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectively.....	171
Table 2. Factorial ANOVA/MANOVA analyses of the effect of pesticide exposure, temperature warming, and time on the percentage of surface reworked by <i>Carassius auratus</i> (% g^{-1}).....	173

Complément 1

Tableau 1. P-values des ANOVAs factorielles avec mesures répétées de l'effet individuel et combiné des pesticides, de la température et du temps sur le comportement du carassin doré (en gras, les p-values <0,05).....	182
Tableau 2. ANOVA factorielle de l'effet des pesticides et de la température sur différents traits physiologiques du carassin doré (en gras les p-values <0,05).....	187

Article 2.

Table 1. Composition and characteristics of the two mixture of pesticides.....	207
Table 2. Names, abbreviations, accession numbers and identification parameters of the differential proteins according to pesticide and tempertuare exposure.....	211
Table 3. Fold-changes of differential proteins identified by 2D proteomic on liver extract of goldfish exposed to pesticide mixtures and/or temperature rising.....	214
Additional Table 1.....	231

Article 3.

Table 1. Pesticide mixture: composition and concentrations.....	243
Table 2. Physic-chemical parameters of the exposure conditions.....	243
Table 3. Fold-change of discriminant metabolites identified by 1H NMR metabolomics approach in <i>Carassius auratus</i> exposed to pesticide mixture (PEST), temperature rising (TEMP) or both (PEST*TEMP) compared to CONTROL group.....	247
Table 4. Endocrine, metabolic and physiological responses in goldfish exposed to individual and combined chemical and thermal stresses.....	249
Additional Table 1. Mean \pm SD of metabolic and physiological responses to pesticide exposure and/or temperature rising.....	262

LISTE DES ACRONYMES

AA : acides aminés	GSI : indice gonadosomatique
AE : énergie disponible	GST : glutathion-S-transferase
AG : acides gras	HHI/HPI: axe hypothalamo – hypophysaire/pituitaire- interrénal
ACTH : adrénocorticotropine	HSI : indice hépatosomatique
ATP : adénosine triphosphate	LH : hormone lutéinisante
BSA : bovine serum albumin	IGS : indice gonadosomatique
CAT : catalase	IHS : indice hépatosomatique
CEA : allocation énergétique cellulaire	MDA : malondialdéhydes
CL(E)50 : concentration létale (efficace) sur 50% des individus	MI : indice musculaire
CoA : coenzyme A	NOEC : concentration sans effet observés
CRH : corticotropines	NQE : normes de qualité environnementales
DCE : directive cadre sur l'eau	H ₂ O ₂ : peroxyde d'hydrogène
EC : énergie consommée	HSP : heat shock protein
ETS : système de transport d'électrons	RIA : radioimmuno assay
FCF : indice de condition de Fulton	RMN/NMR : résonance magnétique nucléaire
FSH : hormone folliculo-stimulante	ROS : espèces réactives de l'oxygène
GC : glucocorticoïdes	SAU : surface agricole utilisée
GAS : « general adaptation syndrome »	SODs : superoxydes dismutases
GH : hormone de croissance	SNC : système nerveux central
GnRH : hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires	SNS : système nerveux sympathique
GPx : glutathion peroxidase	TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique
GR : glutathion reductase	TG : triglycérides
GSH : glutathion réduit	VGE : valeurs guides environnementales

Introduction générale

Les écosystèmes aquatiques sont impactés de bien des manières par les activités anthropiques : altération des habitats par les interventions mécaniques directes et les perturbations du régime hydraulique, dégradation des caractéristiques physico-chimiques de l'eau par des pollutions plus ou moins diffuses ou la transformation des bassins versants et des zones riveraines, changements des communautés par l'introduction/disparition d'espèces sous l'action directe ou indirecte de l'homme, etc. [1].

Le développement agricole et industriel des sociétés humaines a conduit à une explosion des émissions anthropiques de substances chimiques dans les écosystèmes terrestres et aquatiques. Les systèmes aquatiques sont le réceptacle finale de nombre de ces polluants et des contaminations chroniques des eaux de surfaces sont rapportées par les agences de surveillance de l'eau [2,3]. Parmi ces substances, nombreuses sont celles qui présentent des effets toxiques pour les organismes vivants et sont qualifiées de polluants. Aujourd'hui encore, l'évaluation de la qualité de l'eau, des risques environnementaux et la mise en place de normes reposent le plus souvent sur des études portant sur la toxicité de substances isolées. Pourtant ces résultats sont peu représentatifs du comportement des polluants dans les écosystèmes, notamment en raison des interactions possibles entre les contaminants eux-mêmes [4]. Il existe aujourd'hui un nombre incalculable de « cocktails » chimiques potentiels dans l'environnement et les données qui seraient nécessaires à l'évaluation de leur toxicité sont souvent soit manquantes soit de qualité insuffisante.

La France est le premier pays Européen en termes de surface agricole et le quatrième consommateur mondial de pesticides et notamment d'herbicides. Malgré une utilisation de pesticides à l'hectare relativement parcimonieuse par rapport à d'autres pays, la grande majorité des points de suivi de la qualité de l'eau montrent une contamination générale des cours d'eau français par ces molécules [3]. Les pesticides les plus fréquemment détectés dans les rivières sont des herbicides. Alors que les effets potentiellement néfastes des insecticides sur les espèces non ciblées font l'objet d'un large consensus au sein de la communauté scientifique, la toxicité des herbicides sur les vertébrés aquatiques reste largement controversée. Deux revues récentes, publiées par Solomon et al. (2013 [5]) et Van der Kraak et al. (2014 [6]), relèvent de nombreux manques et faiblesses dans les études portant sur l'effet des herbicides sur les poissons et les amphibiens. Ces faiblesses incluent l'utilisation de concentrations non représentatives des contaminations environnementales, l'absence de relation dose-réponse, ou encore l'absence d'effets adverses observés à l'échelle de l'organisme entier (i.e. sur la reproduction, la

croissance ou la survie). En conséquence de quoi les auteurs concluent que les herbicides ne présentent pas de toxicité avérée sur ces organismes aux concentrations présentes dans l'environnement.

Au-delà de ces critiques, la grande majorité de ces études se concentre sur les effets d'une seule molécule, en générale des herbicides « phares » tels que le glyphosate, l'acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4D), le diuron, l'atrazine or encore le S-métolachlore. Très peu d'études ont été menées sur les effets de mélanges complexes et réalistes, que ce soit sur des espèces aquatiques ou marines. En 2011, Polard et al. [7] ont montré que la contamination de l'eau par des herbicides à la suite de phénomène de ruissellement important avait des effets mutagéniques chez le carassin commun, *Carassius carassius*. Par ailleurs, Marchand et al. (2006 [8]) et Evrard et al. (2010 [9]) ont montré que des mélanges de plusieurs herbicides à des concentrations réalistes entraînent des réponses moléculaires chez une espèce estuarienne, le flet européen (*Platichthys flesus*), incluant des perturbations du métabolisme énergétique, du système immunitaire, du métabolisme des lipides et des acides aminés. Chez les amphibiens, une étude de Hayes et al. en 2006 [10] a mis en exergue un effet plus important du mélange d'herbicides et fongicides à des concentrations environnementales que celui de chaque polluant pris individuellement, incluant des effets sur la croissance, le développement, la métamorphose et l'immunité de plusieurs espèces. Il est donc fort probable que le manque d'étude sur la toxicité des cocktails d'herbicides conduise à une sous-estimation importante du risque de ces contaminants pour la faune sauvage [10].

Dans le même temps, le changement climatique a été identifié comme l'un des principaux moteurs de fonctionnement des écosystèmes dans les prochaines décennies [11]. L'effet de la température sur les espèces aquatiques a été étudié à partir des années 70 en réponse aux pollutions thermiques de l'eau résultant du rejet des eaux de refroidissement par les industries. 30 ans plus tard, la question a fait un retour en force après la publication des rapports du GIEC prévoyant une augmentation globale de la température de l'eau. Outre ses effets directs sur les organismes, le changements des patterns de température peut modifier l'occurrence et le comportement des polluants dans l'environnement [12–14]. Les variations naturelles ou anthropiques de la température peuvent également modifier la sensibilité des organismes aux polluants et conduire à des effets de stress multiples. Inversement, les expositions chimiques peuvent diminuer la résistance des organismes et leur capacités adaptatives aux changements environnementaux [13]. Par conséquent, l'importance des effets croisés entre le climat et les pollutions de contaminants a été identifié, à la fois sur la distribution et l'abondance des espèces et sur le fonctionnement des écosystèmes [15].

Les poisons sont des indicateurs sensibles de la qualité des écosystèmes aquatiques. Ils sont également des modèles d'études importants pour comprendre les mécanismes par lesquels les facteurs de stress externes sont susceptibles de perturber les fonctions biologiques des autres vertébrés [16]. En raison de

leur sensibilité aux changements chimiques, physiques et biologiques de leur environnement, l'étude des mécanismes physiologiques impliqués dans la réponse au stress des poissons fait l'objet d'un intérêt croissant [16,17]. Le stress est un mécanisme important qui permet aux organismes de répondre à un facteur de stress biotique ou abiotique par des compensations biochimiques, énergétiques, physiologiques et comportementales [17–20]. Toutefois, si le stress perdure ou s'il atteint une intensité supérieure aux capacités d'adaptation de l'organisme, des conséquences sur la croissance, la performance, la reproduction et la survie des individus peuvent se manifester. L'interaction entre les contaminants et la température de l'eau est particulièrement problématique pour les espèces ectothermes comme les poissons dans la mesure où la température affecte directement le métabolisme énergétique et intervient dans la grande majorité des processus biochimiques et physiologiques [21–24]. En modifiant les capacités métaboliques des organismes, la température peut modifier la capacité des organismes à répondre efficacement aux contaminations chimiques, et *vice-versa* [13,25,26]. La grande majorité des études montrent ainsi un effet synergétique de la température sur la toxicité des polluants, notamment chez les espèces aquatiques [12–14]. Toutefois, malgré les enjeux en termes d'évaluation des risques pour l'environnement, les études portant sur les effets croisés entre l'augmentation de la température et la contamination de l'eau par les pesticides sur les poissons sont assez rares. Ce constat est encore plus alarmant si l'on considère le peu d'études portant sur l'interaction entre la température et les herbicides ou les fongicides, seuls ou en cocktails.

Les objectifs généraux de cette étude sont par conséquent d'évaluer :

- (1) l'effet d'une contamination par un mélange d'herbicides et de fongicides à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental sur une espèce modèle en toxicologie aquatique, le carassin doré (*Carassius auratus*);
- (2) les effets croisés du mélange de pesticides et de la température sur ces poissons.

Pour cela, une démarche d'intégration des réponses de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle a été réalisée afin de comprendre les processus physiologiques mis en jeu et de prédire leur répercussions potentielles à des niveaux d'organisation biologiques plus élevés. Ces mesures incluent des approches moléculaires ciblées (i.e. biomarqueurs de stress oxydant) ou sans a priori (i.e. approches omiques), l'évaluation du statut métabolique des poissons à l'échelle de la cellule, des organes et de l'individu, ainsi que des analyses comportementales. Afin de réaliser cette étude multi-stress et multi-réponses, une approche *in vivo* en conditions contrôlées a été privilégiée afin de limiter les interférences liées à l'ensemble des autres facteurs environnementaux pouvant impacter la physiologie des poissons.

CHAPITRE 1.

Etat de l'art

1. LA REPONSE AU STRESS

Le « stress » est un terme aujourd'hui couramment employé dans nos sociétés mais qui porte souvent à confusion. L'objectif de cette partie est de définir les notions de stress, de facteur de stress et de réponse au stress, notamment au travers des concepts de la réponse « Fight or Flight » de Cannon (1916 [27]), de syndrome d'adaptation générale de Selye (1946 et 1950 [18,28]) et de cascade de réponse de Barton (2002 [17]). Sans être exhaustif, cette partie présente également plusieurs aspects de la réponse générale de stress décrits chez les poissons à différentes échelles biologiques. Le rôle clé du métabolisme énergétique dans la réponse et la tolérance au stress est également discuté.

1.1. DEFINITION DU STRESS

Dans le langage courant, le terme de « stress » renvoie à différentes idées [29] :

- (1) **le stimulus** engendré par une situation dangereuse pour l'organisme ou perçue comme telle ;
- (2) **la réaction** à ce stimulus comprenant l'ensemble des perturbations – ou réponses – physiologiques, hormonales et comportementales initiées par l'organisme pour faire face et maintenir sa stabilité interne ;
- (3) **la maladie** résultant de la stimulation prolongée des réponses de l'organisme.

De cette confusion vient la perception commune mais fautive que le stress est en lui-même néfaste pour les organismes [17]. En réalité le stress est une réponse adaptative nécessaire permettant aux organismes de maintenir leur homéostasie interne face aux diverses contraintes de leur environnement grâce à une suite complexe d'ajustements biochimiques, physiologiques et comportementaux [30]. Toutefois, lorsque le facteur de stress s'installe dans le temps ou devient trop intense, ces réponses adaptatives peuvent être compromises ou mal adaptées, et entraîner des effets délétères sur les organismes [18].



Figure 1. Facteurs de stress chez les poissons.

Les poissons peuvent être soumis à un grand nombre de stress physiques, chimiques, ou biologiques. Ici de gauche à droite : pollution de l'eau, fortes densités dans les fermes d'élevages et prédation. Crédit photo : [505], [506], [507]

1.2. LES FACTEURS DE STRESS

On peut séparer les stress abiotiques – d'ordre physique ou chimique – et les stress biologiques ou « ressentis » [31]. Les stress physiques sont liés à des modifications rapides ou au-delà des limites de tolérance de l'organisme des conditions abiotiques du milieu telles que la température, la pression osmotique ou encore l'oxygénation de l'eau. Les stress chimiques sont quant à eux généralement dus à une détérioration de la qualité de l'eau en raison d'une acidification du milieu ou de la contamination par des polluants (Figure 1). Les pressions exercées par les congénères (compétition, relations de dominance et instauration de hiérarchie sociale...), la prédation, le parasitisme ou encore les manipulations expérimentales (confinement, manipulation...) sont considérées comme des stress biologiques.

1.3. LA REPONSE AU STRESS : CADRE THEORIQUE

Bien que le « stress » soit une réalité biologique pour tous les organismes depuis l'apparition de la vie, l'étude des mécanismes mis en jeu et de ses conséquences est un axe de recherche scientifique relativement récent.

En 1865, le médecin et physiologiste français Claude Bernard montre que les organismes ont la capacité de réguler leur milieu interne pour maintenir leur stabilité et rester en équilibre : "*Tous les mécanismes vitaux, quelques variés qu'ils soient, n'ont toujours qu'un but, celui de maintenir l'unité des conditions de la vie dans le milieu intérieur*" [32]. C'est le concept fondamental d'**homéostasie**¹, qui sera

¹ Le terme en lui-même ne sera inventé que des années plus tard par Walter Cannon.

abondamment utilisé aussi bien en biologie qu'en sociologie ou dans les sciences des systèmes et la cybernétique.

Par la suite, plusieurs chercheurs vont s'intéresser au stress émotionnel et ses conséquences physiologiques. Charles Darwin publie en 1872 « L'expression des émotions chez les hommes et les animaux » [33]. Il est suivi par un physiologiste américain, Walter Cannon, qui décrit à partir de 1911 les conséquences physiologiques des émotions violentes (i.e. peur, colère...). Il publie un concept qui deviendra célèbre : « fight or flight », en référence aux deux réactions possibles face à une agression réelle ou ressentie : « combattre ou fuir » [27]. Il invente également en 1926 le terme d'« homéostasie » à partir du grec *homoios* (« similaire à ») et *stasis* (« position, rester debout ») [34] et y introduit la notion de coût métabolique. L'homéostasie est ainsi définie comme la capacité des organismes soumis à une contrainte extérieure à développer une réponse adaptative, dont le coût énergétique est supporté par des réponses physiologiques coordonnées permettant de fournir l'énergie requise et de maintenir la stabilité du milieu interne [19].

A partir de 1936, Hans Selye, médecin spécialiste en endocrinologie, définit le stress comme "*la réponse non spécifique de l'organisme à toute demande d'adaptation qui lui est faite*". En 1946 et 1950, il publie le concept de « syndrome d'adaptation générale » qui décrit l'ensemble des réactions neurologiques, endocriniennes et physiologiques déclenchées par un facteur de stress [18,28].

Bien que de nombreuses avancées scientifiques aient été faites depuis et de nouvelles définitions complémentaires proposées, ces concepts n'ont jamais été remis en questions et constituent les fondements de la recherche sur le stress aussi bien en physiologie animale qu'en psychologie humaine, tant et si bien que W. Cannon est le 81^{ème} auteur du XX^{ème} siècle le plus cité en psychologie [35].

Il est par ailleurs intéressant de noter que la réponse au stress, ses mécanismes ainsi que les molécules mises en jeu sont extrêmement similaires entre les différentes espèces et ont été fortement conservés au cours de l'évolution, ce qui n'est toutefois guère étonnant dans la mesure où la réponse au stress est fondamentale pour la survie des organismes [36].

1.3.1. Le syndrome d'adaptation générale

Le syndrome d'adaptation générale (« General Adaptation Syndrome » GAS) comporte trois phases, quelle que soit la nature du stress [18,28] :

- (1) **Une phase d'alarme** : la cascade de réponse au stress est initiée par le système nerveux central (SNC) qui perçoit et reconnaît la « menace », que celle-ci soit réelle ou non. Le SNC active en parallèle le système nerveux sympathique (SNS) et l'axe Hypothalamo-Hypophysaire-Interrénal (HHI) qui produisent des « hormones de stress », respectivement les catécholamines (e.g. l'adrénaline) et les glucocorticoïdes (e.g. le cortisol). il s'agit d'une réponse immédiate de l'organisme qui vise à

favoriser une réaction rapide de fuite grâce à une mobilisation énergétique importante vers les muscles. C'est en fait la réponse « Fight or Flight » de Cannon décrite ci-dessus à cela près que, en dehors des facteurs de stress biologiques (prédation, compétition...), le « combat » n'est pas une réponse possible face aux stress chimiques, physiques ou infectieux.

- (2) **Une phase de résistance** : elle se met en place lorsque l'organisme ne peut fuir la source de stress. Cette phase est plus spécifique que la première et les réponses engendrées dépendent en partie de la nature du stress. Il s'agit d'une phase essentiellement « adaptative » destinée à maintenir une certaine homéostasie de l'organisme. Elle est notamment basée sur l'induction de systèmes de défenses favorisant la neutralisation ou l'élimination de molécules toxiques, la protection des constituants cellulaires ou la réparation des dommages engendrés.
- (3) **Une phase d'épuisement** : lorsque les capacités « adaptatives » de défense et de résistance de l'organisme sont dépassées, l'homéostasie physiologique et énergétique ne peut être maintenue. Cette phase aboutit à une diminution des capacités de l'organisme à se nourrir, grandir et se reproduire, pouvant être associée à une détérioration du fonctionnement de certains organes et à un affaiblissement des mécanismes de défenses immunitaires.

Ces trois phases du syndrome d'adaptation général impliquent des réponses à la fois biochimiques, physiologiques et comportementales, décrites sous le nom de cascade de réponse au stress [17].

1.3.2. La cascade de réponses au stress

Barton (2002 [17]) a décrit trois grands types de réponses au stress chez les poissons : les réponses primaires, secondaires et tertiaires (cf. Figure 2). Ces réponses peuvent résulter des effets directs du stress ou faire partie d'une cascade de réponses adaptatives permettant à l'organisme de fuir ou de résister au stress. La réponse primaire correspond à la sécrétion des hormones de stress, les catécholamines et les glucocorticoïdes, par le système endocrinien. Les réponses secondaires font référence à l'ensemble des modifications moléculaires, cellulaires et physiologiques induites par le stress (e.g. induction des systèmes de défense, perturbations de l'osmorégulation, changements métaboliques et immunitaires...). Les réponses tertiaires concernent les conséquences de la réponse au stress à l'échelle de l'individu comme les modifications comportementales, les effets sur la croissance, la reproduction ou encore la résistance aux maladies. Ces réponses ont fait l'objet de plusieurs reviews dont celles de Mommsen et al. (1999 [37]), Norris (1997 [38]), Hontela (1997, 2005 [39,40]), Sapolsky et al. (2000 [41]), et Barton (2002 [17]).

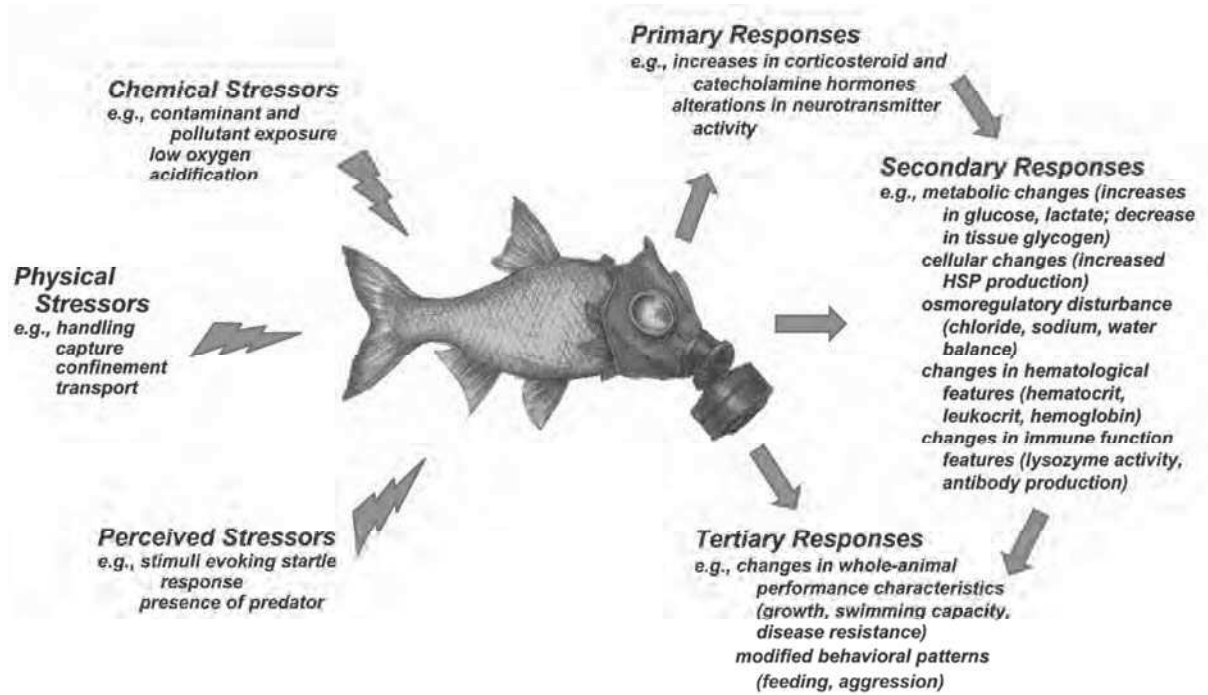


Figure 2. La réponse au stress chez les poissons.

L'exposition à un stress entraîne des modifications biochimiques, physiologiques et comportementales pouvant résulter de l'effet direct du stress ou qui participent d'une cascade de réponses successives primaire-secondaire-tertiaire permettant la fuite de l'individu ou sa défense face au stress. Adapté de Barton 2002 [4]. Illustration poisson [508].

1.4. LA REPONSE PRIMAIRE : ASPECTS NEUROENDOCRINIENS

La réponse primaire est dite « neuroendocrinienne ». Sous l'effet d'un stress environnemental, le SNC active en parallèle le système nerveux sympathique et l'axe Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien ou Interrénal (HHI) chez les poissons, conduisant à la sécrétion d' « hormones de stress » (Figure 3) [17,18,37–40].

L'équivalent chez les poissons de la glande surrénale est le tissu interrénal situé dans la région antérieure des reins et composé de cellules interrénales et chromaffines [37–40]. L'activation du système nerveux sympathique conduit à la sécrétion de **catécholamines** (adrénaline, noradrénaline et dopamine) par les cellules chromaffines. Cette réponse, extrêmement rapide, entraîne une augmentation immédiate de la concentration de ces hormones dans le sang [42]. En parallèle, l'activation de l'axe HHI conduit à la sécrétion du facteur de libération des corticotropines (CRH) par l'hypothalamus. Le CRH agit sur l'hypophyse qui sécrète l'adrénocorticotrope (ACTH). Cette hormone va à son tour induire la sécrétion des **corticostéroïdes** ou **glucocorticoïdes (GCs)** par les cellules interrénales [37,39,40]. Chez les poissons téléostéens, la principale hormone glucocorticoïde est le cortisol. Cette réponse, plus lente que la première, entraîne une augmentation de la concentration plasmatique en cortisol dans les minutes et les heures qui suivent le stimulus.

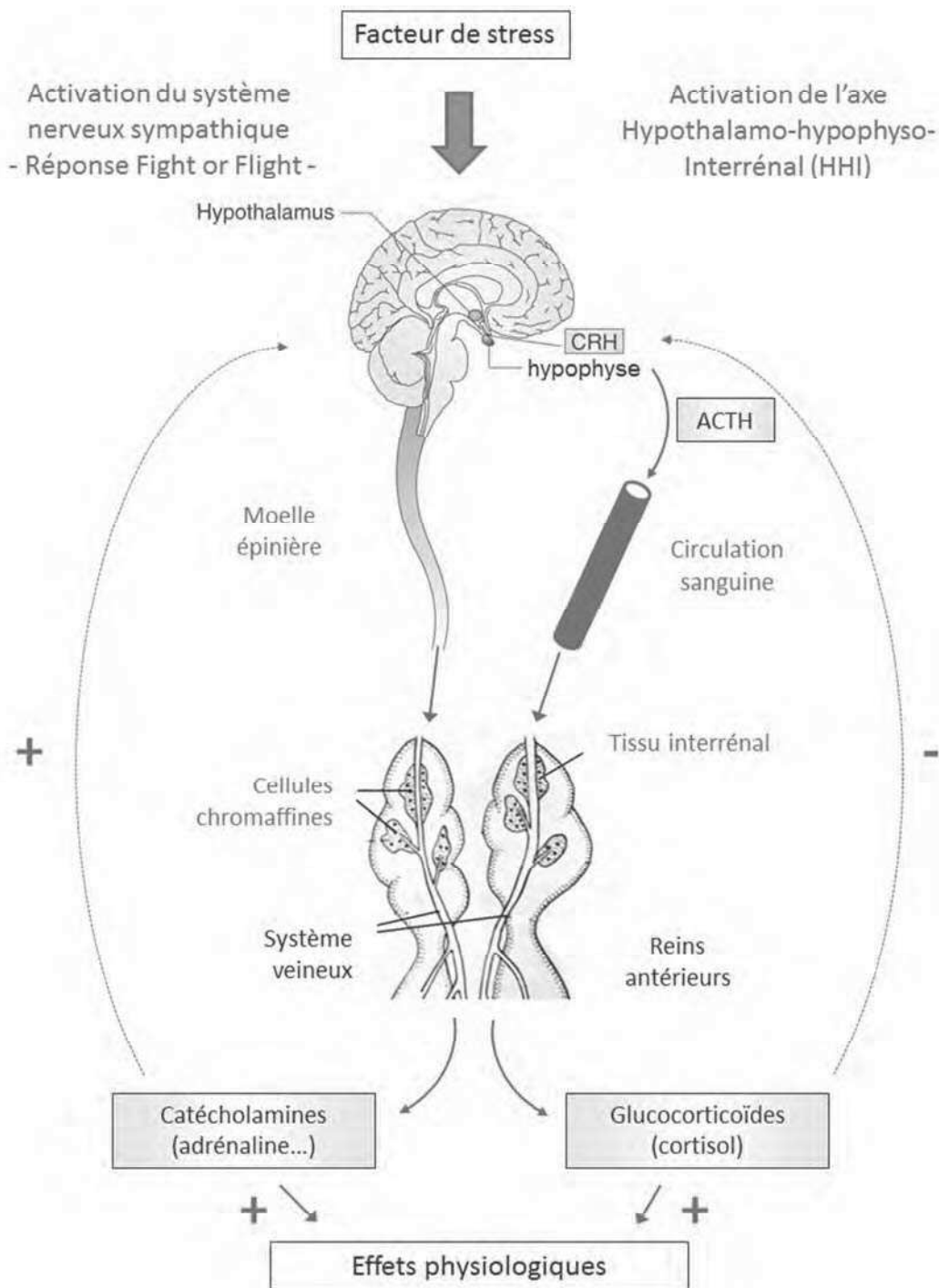


Figure 3. Sécrétions des catécholamines et des glucocorticoïdes chez les poissons sous l'effet d'un stress.

Le stress est détecté par le système nerveux central (SNC), qui active en parallèle le système nerveux sympathique (SNS, en violet) et l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Interrénal (HHI, en rouge). L'activation du SNS conduit à la libération dans la circulation sanguine de catécholamines qui permettent la mise en place de la réponse « Fight or Flight ». En parallèle, le SNC envoie un signal neuronal à l'hypothalamus, qui sécrète le facteur de libération des corticotropines (CRH) qui active l'hypophyse. Celui-ci libère dans le sang l'adrénocorticotropine (ACTH) qui va entraîner l'excrétion des glucocorticoïdes par les cellules interrénales. Des effets de rétrocontrôles positifs (+) et négatifs (-) régulent la production des hormones de stress.

Les sécrétions de catécholamines et de cortisol sont régulées par des rétrocontrôles (Figure 3). Il semble que les catécholamines aient un rétrocontrôle positif, l'augmentation de la concentration plasmatique de l'une des trois catécholamines stimulant le relargage dans le sang des deux autres hormones [42]. En revanche, le cortisol est régulé par un rétrocontrôle négatif. Lorsque la concentration en cortisol augmente, elle inhibe la sécrétion de CRH par l'hypothalamus et d'ACTH par l'hypophyse, ce qui diminue la synthèse de cortisol [38,39].

Ces hormones de stress vont entraîner un certain nombre de réponses coordonnées de l'échelle moléculaire à l'individu. Ces réponses « secondaires » et « tertiaires » permettent aux organismes de fuir ou de résister au stress.

1.5. LES REPONSES SECONDAIRES

Elles comprennent l'ensemble des réponses moléculaires et cellulaires ainsi que les ajustements physiologiques induits par le stress. Ces réponses peuvent être initiées par les hormones de stress ou directement par le stress lui-même [17]. Sans être exhaustif, certaines de ces réponses sont présentées ici.

1.5.1. Aspects moléculaires

Le développement récent des techniques d'analyses moléculaires a permis d'améliorer considérablement nos connaissances de la réponse moléculaire des organismes soumis à un stress. Chez les poissons, les méthodes omiques (i.e. génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique) ont entre autres été utilisées pour évaluer la réponse aux stress chimiques [43–46], à la température [47–50], aux chocs osmotiques [51,52] ou encore à l'hypoxie [53]. Si les profils de réponses varient selon l'espèce et la nature, l'intensité ou la durée du stress, ces études ont permis d'observer l'existence d'une réponse générale de stress au niveau moléculaire. Cette réponse générale implique notamment des modifications du métabolisme énergétique, du fonctionnement des mitochondries, du cycle de vie et de la structure cellulaire ainsi que des systèmes de défense (e.g. protéines chaperonnes, systèmes antioxydants) et de réparation des dommages [54].

Un aspect important de cette réponse générale au stress est l'induction de systèmes de défense contre le stress oxydant. Le stress oxydant est lié à la surproduction cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, e.g. anion superoxyde $O_2^{\bullet-}$, radical hydroxyle $\bullet OH$ et peroxyde d'hydrogène H_2O_2). En conditions normales, les ROS jouent un rôle important dans la régulation des processus cellulaires et notamment le maintien du potentiel redox et la transmission de signaux cellulaires [55]. Ils sont également utilisés pour combattre les invasions de l'organisme par des microorganismes [56,57]. Les ROS sont cependant susceptibles de causer des dommages sur les lipides membranaires, les protéines ou l'ADN et entraîner

ainsi des dommages cellulaires et tissulaires [58]. En raison de leur potentiel nocif, une régulation très fine de la production et de la dégradation des ROS est réalisée dans les cellules. Toutefois, dans certaines situations, la balance synthèse/élimination peut être perturbée. La plupart des facteurs de stress sont ainsi susceptibles d'entraîner la formation excessive de ROS chez les organismes aquatiques, incluant les stress chimiques [56,59,60], la température [48,56,61], le niveau d'O₂ et de CO₂ dans l'environnement [56,62,63], les changements de salinité [56,64] ou encore les stress biologiques comme la prédation [65] et les infections parasitaires [66]. On parle alors de « stress oxydant ». De nombreux mécanismes entrent dans la formation des ROS par le stress : augmentation de métabolisme énergétique, perturbation de la balance cellulaire en oxygène ou du fonctionnement des mitochondries, perte d'électrons par les métaux, détoxification des xénobiotiques etc. Ces mécanismes sont discutés dans Luschchak (2011 [56]) et Regoli et Giuliani (2014 [57]).

La surproduction de ROS active la cascade Nrf2-Keap1 qui régule l'expression de nombreux gènes cytoprotecteurs dont les rôles incluent la détoxification des ROS et la régulation de la réponse inflammatoire [57,67]. Cette cascade constitue l'un des plus importants mécanismes de protection cellulaire et tissulaire contre les stress oxydants et toxiques [67,68]. Les systèmes de défense antioxydants comprennent des enzymes qui catalysent la réduction des ROS (e.g. catalase, superoxydes dismutases ou glutathion peroxidases), et des molécules non enzymatiques qui les neutralisent (e.g. glutathion réduit, acide ascorbique, vitamine E et peroxyrédoxines) [56,57,69,70]. Les ROS entraînent également l'activation d'autres cascades de signaux cellulaires (e.g. cascade MAPK) qui régulent la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose, la réponse inflammatoire ou encore la carcinogenèse [57].

D'autres systèmes de protection des composantes cellulaires et/ou de réparation des dommages interviennent dans la réponse générale de stress. Parmi eux on trouve les molécules chaperonnes (e.g. heat shock proteins HSPs). Cette famille de protéines, très conservées au cours de l'évolution, intervient pour protéger les protéines, les réparer ou les dégrader lorsque les dommages sont trop importants [71–75]. Bien que le nom de ces protéines vienne de leur première observation chez des drosophiles exposées à un choc thermique, les HSPs sont sur-régulées dans les cellules des poissons en réponse à un large éventail de facteur de stress physiques, chimiques et biologiques [71,73]. Les mécanismes conduisant à l'induction des HSPs sont encore mal connus mais font intervenir des facteurs de transcription. Plusieurs études montrent également une induction de certaines HSPs par les catécholamines [76,77], tandis que le cortisol semble avoir des effets inhibiteurs [77–79].

La modulation de l'expression des gènes et de l'abondance des protéines sous l'effet d'un stress entraîne des conséquences cellulaires, physiologiques et systémiques. Toutefois les liens entre les

changements moléculaires et les réponses observées aux niveaux d'organisation biologique supérieurs sont encore aujourd'hui mal compris [54].

1.5.2. Aspects cellulaires

1.5.2.1. Modulation des voies énergétiques sous l'effet du stress

Le maintien de l'homéostasie énergétique subodore une coordination des voies métaboliques de dégradation et de stockage des substrats énergétiques selon le contexte métabolique. L'action combinée, synergétique ou antagoniste de différents facteurs de régulation permet une régulation fine et spécifique des flux de substrats énergétiques au niveau moléculaire ainsi qu'à l'échelle de l'organisme entier. Les réactions métaboliques intracellulaires sont ainsi modulées par différentes enzymes dont l'activité et/ou l'expression sont elles-mêmes sous le contrôle de deux hormones, l'insuline et le glucagon. Sous l'effet du stress, la sécrétion des catécholamines et des glucocorticoïdes va modifier la régulation de ces voies métaboliques afin de fournir l'énergie nécessaire aux différentes réponses adaptatives [37]. Un bref rappel des principes généraux du métabolisme énergétique est présenté dans la Boite 1 (p. 36).

L'un des rôles principaux des hormones de stress est de mobiliser l'énergie nécessaire tant pour les réponses de fuite, de combat ou de résistance au stress. La régulation du métabolisme énergétique sous l'effet d'un stress est présentée en détails dans plusieurs reviews [37,41,80–82]. Brièvement, les catécholamines puis le cortisol vont entraîner l'augmentation de la production de glucose dans le foie puis son relargage dans le sang afin de fournir de l'énergie facilement utilisable aux organes et tissus périphériques (i.e. muscles, cœur...). Pour cela, les hormones de stress vont coordonner l'activation/inhibition de certaines voies métaboliques à l'échelle de l'organisme entier (Figure 4 et Boite 1) :

- la dégradation dans le foie des réserves en glycogène pour produire du glucose (cette action, initiée par les catécholamines, est par la suite inhibée par le cortisol),
- l'inhibition de l'activité des enzymes de la glycolyse dans le foie,
- l'augmentation de l'activité des enzymes impliquées dans la gluconéogenèse hépatique à partir de substrats glucoformateurs (e.g. acides gras, certains acides aminés...),
- la dégradation des lipides et protéines dans les tissus adipeux et musculaires pour fournir des substrats à la gluconéogenèse hépatique.

BOITE 1. LE METABOLISME ENERGETIQUE : PRINCIPES GENERAUX

Le maintien de l'homéostasie énergétique au niveau de l'organisme est primordial pour assurer le bon fonctionnement des différents organes et systèmes assurant la maintenance de l'organisme. Le cerveau ne possède que peu de réserves énergétiques propres mais consomme jusqu'à 25% de la production quotidienne d'ATP. Son fonctionnement dépend donc entièrement des mécanismes de régulation du taux plasmatique en glucose (i.e. la glycémie). Afin de maintenir la glycémie stable, des voies métaboliques dites hypo et hyperglycémiantes seront activées selon le contexte métabolique et les besoins énergétiques des tissus périphériques.

Les substrats de réserves : le glycogène est la principale forme de stockage des sucres simples (glucose), stocké dans le foie et les muscles. Les triglycérides (TG) sont les principaux lipides de stockage, accumulés dans les vacuoles des adipocytes, ou sous forme d'inclusion (gouttelettes) dans le cytoplasme d'autres cellules des tissus adipeux péri-viscéral et sous-cutané, du foie et des muscles. Les protéines sont stockées principalement dans les muscles.

Les substrats circulants : du métabolisme glucidique (glucose, lactate, pyruvate et glycérol), du métabolisme lipidique (acides gras AG, corps cétoniques ou cétones et triglycérides) ou du métabolisme protéique (acides aminés AA).

Les voies hypoglycémiantes (diminution du glucose plasmatique):

Glycogénogenèse : constitution du glycogène à partir du glucose.

Glycolyse : dégradation du glucose pour produire du pyruvate.

Les voies hyperglycémiantes (augmentation du glucose plasmatique):

Glycogénolyse : dégradation du glycogène pour former du glucose.

Gluconéogenèse : formation de glucose à partir d'autres substrats énergétiques tels que les AA, les AG ou le lactate.

Protéolyse et dégradation oxydative des AA : dégradation des protéines pour former des AA puis des α -cétoacides entrant dans le cycle de Krebs ou la gluconéogenèse.

Lipolyse et β -oxydation: dégradation des TG pour former du glycérol ou des AG puis de l'acétyl-CoA entrant dans le cycle de Krebs ou la gluconéogenèse.

Cétogenèse : formation de corps cétoniques à partir des AG et de certains AA.

Catabolisme du pyruvate : décarboxylation oxydative en acétyl-CoA (aérobie) ou fermentation (anaérobie).

Cycle de Krebs et phosphorylation oxydative : catabolisme de l'acétyl-CoA pour former notamment du NADH utilisé par la chaîne respiratoire pour produire de l'énergie (ATP).

Le foie est l'organe principal de régulation de l'homéostasie énergétique. Le glucose y est formé à partir du glycogène ou de précurseurs glucoformateurs (AG, AA, lactate...) produits par lui-même ou d'autres organes. En cas d'épuisement du glycogène, il produit des corps cétoniques pour alimenter le cerveau en substrats énergétiques.

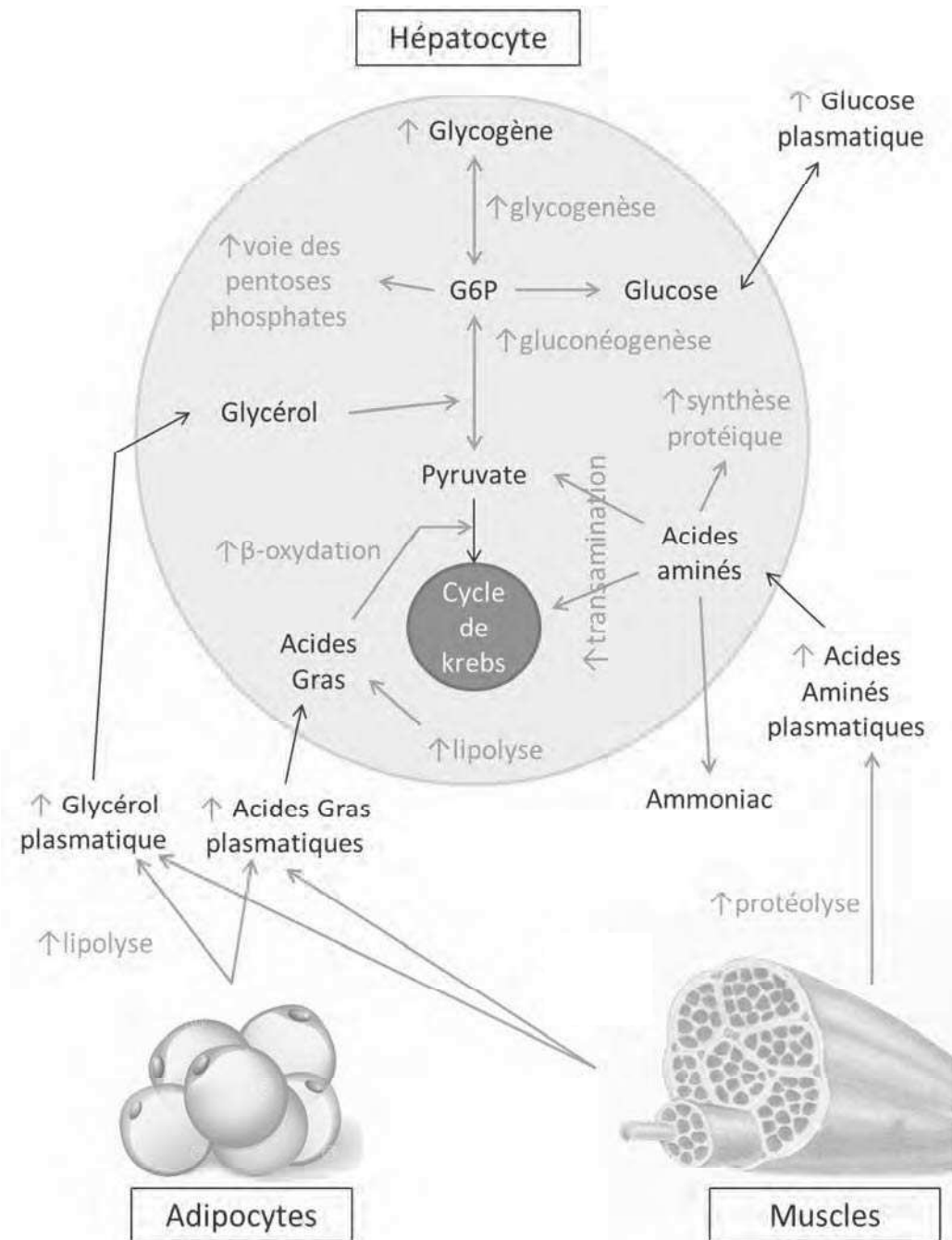


Figure 4. Effet du cortisol sur le métabolisme énergétique.

Sous l'effet du cortisol, les réserves énergétiques protéiques et/ ou lipidiques présentes dans les muscles et les tissus adipeux sont dégradées pour former des acides aminés, du glycérol et des acides gras. Ces molécules sont libérées dans le sang et captées par les hépatocytes (i.e. cellules du foie). Ces substrats sont alors utilisés essentiellement pour produire du glucose via la gluconéogenèse. Le glucose ainsi produit est libéré dans le sang pour fournir les différents organes en énergie. Vert : voies métaboliques affectées par le cortisol. ↑ : augmentation de la voie métabolique ou du métabolite. Adapté de Mommsen et al. (1999 [37]).

Il faut noter que le métabolisme des poissons présente certaines spécificités par rapport aux autres vertébrés. Si le rôle des protéines dans le métabolisme énergétique est généralement considéré comme marginal chez les mammifères et les oiseaux, elles constituent en revanche une source d'énergie très importante chez les poissons [31]. Plusieurs études ont discuté d'un phénomène d'intolérance aux glucides chez les poissons [83]. Ces études ont ainsi montré une diminution de la croissance et une hyperglycémie prolongée lorsque l'alimentation des poissons est trop riche en glucides [83,84]. En réalité, les glucides ne présentent pas le même intérêt nutritionnel selon l'espèce. Les carnivores de températures froides (e.g. les salmonidés) consomment très peu de glucides et les métabolisent mal. La glycogénèse est relativement faible et la métabolisation des glucides se traduit par la production de lipides [83,84]. Au-delà de 20% du poids de la ration alimentaire, les glucides entraînent une hyperglycémie prolongée après les repas associée à une diminution de la croissance [84]. En revanche, les espèces herbivores des milieux tropicaux et des eaux tempérées (e.g. les carpes, poissons-chats ou tilapias) peuvent consommer jusqu'à 50% de glucides [83,84]. Du fait de l'alimentation riche en protéines des poissons, les ressources protéiques sont mobilisées en priorité lorsque la demande énergétique augmente. Le glycogène constitue un combustible énergétique mineur, le glycogène musculaire étant métabolisé plus rapidement que le glycogène hépatique. La gluconéogenèse à partir des acides gras et d'acides aminés tels que l'alanine et l'aspartate est également plus importante que chez les mammifères.

1.5.2.2. Modification de la capacité et de la densité des mitochondries

Les mitochondries sont des organites cellulaires qui jouent un rôle central dans de nombreuses fonctions, incluant le métabolisme énergétique, la réponse au stress, le cycle de vie cellulaire et l'immunité innée (voir les reviews de Galluzzi et al. 2012 [85], Smith et al. 2012 [86] et Venditti et al. 2013 [87]). La plasticité des mitochondries joue ainsi un rôle central dans l'acclimatation aux stress environnementaux [88].

Les rôles métaboliques des mitochondries incluent la production de l'énergie chimique de la cellule, la biosynthèse des hèmes nécessaires notamment pour la synthèse de l'hémoglobine, et des hormones stéroïdiennes (e.g. cortisol, androgènes et œstrogènes) [85]. Elles sont également le site de stockage principal d'ion calcium Ca^{2+} et modulent les flux de calcium à travers toute la cellule [86]. Le Ca^{2+} joue un rôle important non seulement dans la régulation du métabolisme énergétique mais également dans la transduction de signaux et l'activation des processus de mort cellulaire [85].

Le rôle le plus important des mitochondries dans le métabolisme énergétique est la production de l'énergie chimique de la cellule, l'ATP [85]. En résumé, en présence d'oxygène, le pyruvate est importé dans les mitochondries et entre dans le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs conduit à l'accumulation de NADH réduit dans la matrice mitochondriale qui est ensuite ré-oxydé grâce au système de transport

d'électron (ETS) localisée dans la membrane des mitochondries. Le gradient de proton produit est utilisé par l'ATP synthase pour produire de l'ATP. Ce système permet de produire près de 95% de l'ATP total de la cellule [89]. D'autres voies métaboliques se déroulent également dans les mitochondries : la β -oxydation des acides gras en acétyl CoA qui entre dans le cycle de Krebs, le métabolisme des acides aminés qui entre dans le cycle de Krebs directement ou au niveau du pyruvate, certaines étapes de la gluconéogenèse et la cétogenèse [85].

Chez les ectothermes, la plasticité mitochondriale joue donc un rôle central dans la réponse du métabolisme énergétique aux stress environnementaux [88]. Elles assurent la production d'énergie nécessaire à la réponse au stress notamment en augmentant l'activité ETS et donc la production d'ATP [86,90]. De nombreuses études ont ainsi montré que chez les espèces aquatiques ectothermes, l'activité de l'ETS augmente avec la température et une exposition à des polluants [90–93]. De plus, la dépendance de l'activité ETS à la température est probablement l'une des causes des effets croisés de la température et des contaminants sur les organismes [90,91]. Des modifications de la densité des mitochondries sont également observées chez les poissons lors de changements thermiques, probablement pour compenser la diminution du niveau d'oxygène cellulaire et assurer une production énergétique suffisante [94,95].

De plus, les mitochondries sont en conditions normales la source la plus importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Elles possèdent par conséquent un grand nombre de systèmes antioxydants [85,87]. Sous l'effet d'un stress oxydant modéré, qu'il soit endogène (i.e. produit par les mitochondries elles-mêmes) ou exogène (i.e. venant de l'extérieur de la mitochondrie), les mitochondries augmentent la production des systèmes antioxydants et de molécules chaperonnes qui protègent les protéines, permettant ainsi de rétablir l'homéostasie cellulaire [85,87,96].

1.5.2.3. Modification du cycle de vie cellulaire et apoptose

Si le stress oxydant persiste et/ou dépasse les capacités défensives mitochondriales et cellulaires, des dommages peuvent apparaître sur l'ADN, les protéines ou l'intégrité des membranes. Les mitochondries et/ou les cellules peuvent alors passer d'une stratégie défensive à l'activation de processus d'arrêt de cycle cellulaire ou d'apoptose (i.e. mort cellulaire programmée) [85–87].

Les dommages sur l'ADN mitochondrial ou les lipides et protéines membranaires entraînent normalement une autophagie des mitochondries. L'autophagie est un processus de dégradation des structures cytoplasmiques (e.g. comme les mitochondries), permettant en temps normal de renouveler les composantes intracellulaires âgées ou endommagées. Les mitochondries endommagées sont en effet potentiellement dangereuses pour la cellule. Lorsque leur membrane perd son intégrité structurelle, elles peuvent relarguer beaucoup de ROS ainsi que des inducteurs de mort cellulaire dans le

cytoplasme. L'autophagie peut alors être ciblée uniquement sur elles (i.e. mitophagie). La mitophagie peut être sur-régulée par les mitochondries elles-mêmes en réponse à un stress, de sorte à protéger la cellule [85,87].

Si la membrane des mitochondries perd son intégrité structurelle sans que celles-ci soient détruites par la mitophagie, les protéines de l'espace inter-membranaire mitochondrial (e.g. les cytochromes c) sont relarguées dans le cytoplasme [85–87]. Elles entraînent l'activation de mécanismes caspase-dépendants ou indépendants résultant dans l'exécution de la mort cellulaire [85–87]. Ce phénomène d'apoptose dit intrinsèque (i.e. initiée par la cellule elle-même) suit généralement l'échec de la cellule à rétablir son homéostasie. L'ADN mitochondrial endommagé est quant à lui excrété dans l'espace extracellulaire et permet l'activation de la réponse inflammatoire permettant l'élimination des cellules présentant des mitochondries endommagées [85].

Au niveau cellulaire, les dommages sur l'ADN nucléaire entraîne l'activation de la protéine p53, impliquée dans l'activation de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose, d'où son importance cruciale chez les organismes multicellulaires dans la prévention des cancers [97]. La p53 peut induire l'arrêt du cycle cellulaire et l'activation de mécanismes de réparation de l'ADN. Lorsque ces réparations sont réalisées, la division cellulaire reprend. En revanche, si les dommages engendrés sont au-delà des capacités de réparation de la cellule, la p53 enclenche le processus d'apoptose intrinsèque[98].

De nombreux autres mécanismes conduisent à l'arrêt du cycle cellulaire et à la mort cellulaire, incluant des processus d'apoptose extrinsèque (i.e. apoptose induite par les cellules cytotoxiques du système immunitaire) [98]. Dans tous les cas, ces processus permettent de maintenir la stabilité cellulaire et génétique de l'organisme et d'éliminer les cellules potentiellement dangereuses [98–102].

1.5.3. Aspects physiologiques généraux

1.5.3.1. La réponse « Fight or Flight »

En phase d'alarme, la réponse « Fight or Flight » (i.e. « combattre ou fuir ») est initiée par une décharge du système nerveux sympathique (SNS) qui engendre un certain nombre d'ajustements physiologiques coordonnés permettant à l'organisme de se battre ou de fuir [20,27,103].

Ces ajustements sont sous l'effet d'un double contrôle du SNS : direct par le biais de l'innervation sympathique de différents organes et indirect sous l'action des catécholamines [104].

Le SNS entraîne par le biais de l'innervation des organes vasculaires et respiratoires l'accélération des battements cardiaques et de la ventilation respectivement. Chez les poissons, les catécholamines jouent également un rôle dans le contrôle de la fréquence cardiaque mais interviennent peu dans la ventilation [104]. Le SNS assure en parallèle la contraction des vaisseaux sanguins dans certaines parties du corps et

la dilation des vaisseaux alimentant les muscles, permettant d'augmenter le flux sanguin (et donc de glucose) vers les muscles. Les catécholamines augmentent également l'affinité de l'hémoglobine pour le dioxygène et par conséquent la quantité d'oxygène dans le sang [104]. Toutes ces réponses ont pour objectif d'augmenter la vitesse et la force de l'organisme et de permettre ainsi une action musculaire violente.

1.5.3.2. Effets sur le système immunitaire

Les catécholamines et les glucocorticoïdes ont également des effets à la fois activateurs et suppresseurs des fonctions immunitaires [41,105].

Les catécholamines ont des effets activateurs, surtout lorsque le stress est d'origine infectieuse. Elles activent notamment l'expression des gènes pro-inflammatoires de la réponse immunitaire (e.g. IL1B, IL6 et TNF) via des récepteurs β -adrénergiques [106].

Les glucocorticoïdes de la deuxième vague, comme le cortisol, ont des effets dynamiques et biphasiques sur l'activité des systèmes de défense immunitaires [41]. Aux faibles concentrations, ils augmentent la sensibilité des récepteurs aux promoteurs de la réponse immunitaire, augmentant la réponse inflammatoire [41]. En revanche, aux fortes concentrations, le cortisol a des propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives permettant de limiter le risque d'auto-immunité. Le cortisol agit notamment en inhibant (1) la synthèse, la sécrétion ou l'action des cytokines et autres promoteurs de la réponse immunitaire et inflammatoire, (2) le chimiotactisme² des globules blancs (e.g. lymphocytes, monocytes et granulocytes), (3) l'accumulation de granulocytes dans les zones infectées, et (4) en augmentant la mort cellulaire des cellules précurseurs des lymphocytes T et B [41].

1.5.3.3. Effets sur l'osmorégulation

Le cortisol agit sur l'osmorégulation des poissons, notamment au niveau des branchies [40,81,107]. Chez les espèces aquatiques, il augmente les flux de sodium et le transfert de sodium à travers les branchies, le mucus du système digestif et les reins en augmentant l'activité de la Na^+/K^+ ATPase [38]. Le cortisol permet l'acclimatation des espèces anadromes à l'eau de mer, comme les salmonidés, en stimulant la différenciation cellulaire des cellules chloridiennes et l'activité de la Na^+/K^+ ATPase branchiale [37]. Le cortisol augmente également l'absorption du calcium dans l'ensemble du corps, suggérant que le cortisol joue un rôle dans l'acclimatation à l'eau douce [38].

² Déplacement des cellules mobiles comme les globules blancs sous l'effet d'un gradient chimique extracellulaire. Concernant le système immunitaire, ce signal chimique peut provenir d'une cellule altérée (produit d'oxydation de dégradation de la membrane) ou d'autres globules blancs. Il permet notamment de recruter les cellules immunitaires afin d'éliminer les agents infectieux, les cellules endommagées ...

1.6. LES REPONSES TERTIAIRES

Les réponses tertiaires concernent les effets à l'échelle de l'organisme impactant la performance et la fitness des individus : comportement, reproduction, croissance et résistance aux maladies. Ces effets sont induits directement par les hormones de stress (essentiellement le cortisol) ou résultent de perturbations physiologiques (i.e. réponses secondaires) comme la modification du métabolisme énergétique.

1.6.1. Aspects comportementaux

Le stress a des effets importants sur le comportement des poissons [108]. Dans la phase d'alarme, des comportements d'évitement peuvent se mettre en place si le stress est détecté par l'organisme. Le comportement d'évitement permet de réduire l'exposition au stress et de conserver une performance « normale » une fois le stress évité (Figure 5). De nombreuses études ont été menées sur des poissons exposés à des polluants ou à des stress physiques, montrant dans la plupart des cas des réactions d'évitement à des niveaux de stress en dessous des limites de tolérance létales [108]. Toutefois, la réponse d'évitement n'est possible que si un habitat alternatif est disponible, si le stress est suffisamment intense et/ou brutal pour être détecté et dépend des capacités de détection et de déplacement de l'espèce [108].

D'autres types de comportement peuvent être affectés par le stress. Chez les mammifères, les hormones de stress ont un effet anorexique et diminuent le comportement alimentaire dans l'heure qui suit le stimulus, y compris chez des animaux ayant subi un jeûne [41]. Cette action permet de diminuer les dépenses énergétiques liées à la recherche alimentaire pendant la première phase de réponse au stress. Après quelques jours, le cortisol augmente l'appétit et permet de retrouver un comportement alimentaire normal [41]. A l'inverse, chez les poissons, le cortisol est généralement considéré comme un inhibiteur du comportement alimentaire [109–111]. Des résultats contradictoires existent toutefois entre les études [109]. De manière générale, les stress environnementaux, physiques et sociaux inhibent le comportement alimentaire et l'absorption de nourriture chez les poissons par le biais de l'activation de l'axe HPI. Cet effet est toutefois modulé par le statut nutritionnel des poissons, leur rang social et leur stade de développement [109,110,112].

Le stress peut également affecter la locomotion des poissons [113,114], la prise de risque [113] et les comportements sociaux, notamment l'agressivité et les relations de dominance-soumission [37,113,115–117]. Les causes de ces changements comportementaux sont complexes et probablement multifactorielles. Elles incluent la perturbation du métabolisme énergétique sous l'effet du stress [114], l'effet direct du cortisol [117], ou encore l'effet d'autres hormones impliquées dans le

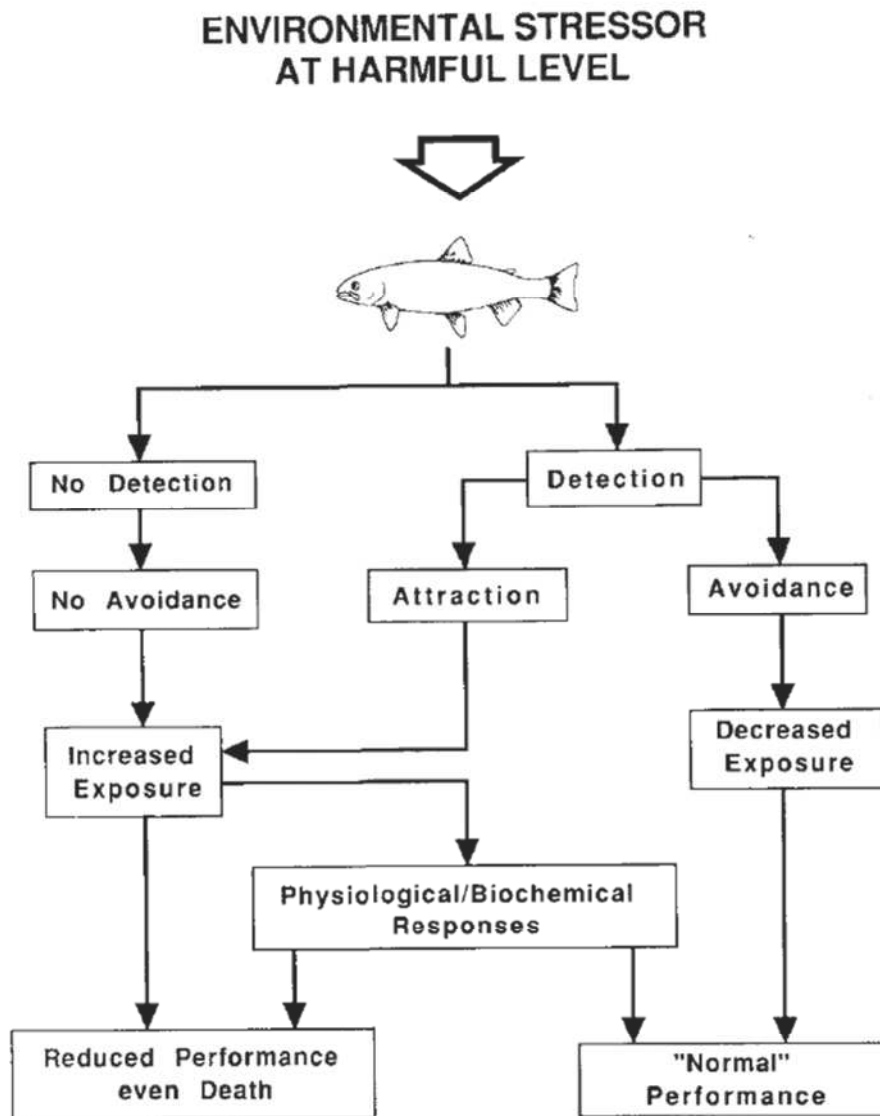


Figure 5. Conséquences de la réponse comportementale à un stress environnemental.

Lorsqu'un poisson est soumis à un stress environnemental, deux réponses comportementales sont possibles : évitement ou attraction. L'évitement permet de diminuer l'exposition au stress et de conserver des performances normales. Certains stress chimiques peuvent entraîner des comportements d'attraction. La réponse comportementale n'est possible que si le stress est détecté par le poisson et s'il a la possibilité de se déplacer vers un habitat alternatif. Dans le cas contraire, l'organisme doit mettre en place des adaptations physiologiques et biochimiques pour s'adapter au stress, avec des conséquences potentielles sur sa fitness et sa survie. Tiré de Beitinger 1990 [108].

comportement des poissons et dont la production et/ou l'activité sont affectées par le stress (e.g. arginine-vasotocine, 11-ketotestostérone ...) [117,118].

1.6.2. Conséquences générales sur la croissance, la reproduction et la santé

1.6.2.1. Effets sur la croissance

Le stress influe sur la croissance essentiellement *via* la modification du métabolisme énergétique, du comportement alimentaire, de l'efficacité de conversion de la nourriture et/ou de la stimulation hormonale [110,119–122].

La mobilisation des ressources énergétiques (i.e. pour compenser le coût énergétique des réponses d'évitement ou de résistance au stress) sous l'action combinées des catécholamines et des glucocorticoïdes ainsi que l'inhibition du comportement alimentaire expliquent en grande partie l'inhibition de croissance observée chez les poissons soumis à un stress [110,122]. Toutefois, des modifications de la concentration de l'hormone de croissance (GH) ont été montrées chez des poissons soumis à des stress aigus ou chroniques, indiquant une perturbation du contrôle endocrinien de la croissance [120,122]. Les effets du stress sur la croissance sont donc multifactoriels et impliquent différents processus selon sa durée. Si les mécanismes impliqués ne sont encore complètement élucidés [123], les effets négatifs du stress sur la croissance des poissons font l'objet d'un large consensus dans la communauté scientifique et ont été montré aussi bien *in vivo* que *in situ* [110,121,122,124].

1.6.2.2. Effets sur la reproduction et sur la descendance

Les effets négatifs du stress sur la reproduction des poissons font l'objet d'un large consensus, bien que les mécanismes mis en cause fassent encore aujourd'hui débat (voir les reviews de Schreck et al. 2001 [125], Schreck 2010 [126] et Pankhurst et Van der Kraak 2011 [121]). Globalement, le stress affecte le fonctionnement de l'axe reproducteur endocrinien, la qualité et la quantité des gamètes mais également la survie et le développement des œufs et larves de poissons. Comme pour la croissance, les effets du stress sur la reproduction peuvent être liés directement à l'effet des hormones de stress sur le contrôle endocrinien de la reproduction, ou être la conséquence d'une perturbation du métabolisme énergétique [121,125,126].

Le cortisol affecte directement les fonctions reproductrices chez un grand nombre d'espèces de poissons [17,41,121,125] (Figure 6). Plusieurs études montrent une inhibition de la sécrétion de l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) par l'hypothalamus et de gonadotrophines par l'hypophyse sous l'effet du cortisol [41,127] (Figure 6). Il diminue également la réceptivité des gonades à ces hormones, entraînant une diminution de la production d'hormones sexuelles androgéniques (e.g. testostérone) et/ou œstrogéniques (e.g. estradiol) [41,127,128].

L'augmentation du cortisol chez des truites arc-en-ciel femelles entraîne également une diminution de la concentration plasmatique en vitellogénine, une protéine essentielle pour le succès reproducteur qui est produite par le foie et stockée dans les gonades [127–129].

La diminution des hormones sexuelles sous l'effet du stress est généralement associée à une augmentation de l'incidence d'atrésie des follicules ovariens et à un retard de l'ovulation, pouvant entraîner un effet délétère irréversible sur la période de reproduction en cours [121,130]. Ces perturbations entraînent également une diminution de la taille des œufs chez les femelles, du nombre de spermatozoïdes chez les mâles, de la qualité des gamètes, de la taille et de la survie de la progéniture [121,125,128].

Une augmentation de l'incidence de malformations chez la progéniture a été observée chez des morues atlantiques (*Gadus morhua*) femelles soumises à un stress physique au cours de la saison de reproduction [131]. Par ailleurs, Kleppe et al. (2013 [132]) ont montré que le traitement en cortisol chez des morues atlantiques femelles pendant la saison de reproduction modifiait l'expression de gènes dans les œufs et les embryons. Ces gènes sont essentiellement impliqués dans la cytopoïèse (i.e. formation et développement cellulaire) et la formation du cartilage, des os et des muscles. Eriksen et al. (2006 et 2007 [133,134]) ont également trouvé une augmentation des malformations de l'opercule³ et de la colonne vertébrale ainsi qu'une diminution de la survie, de la taille, de la masse et du sac vitellin chez la

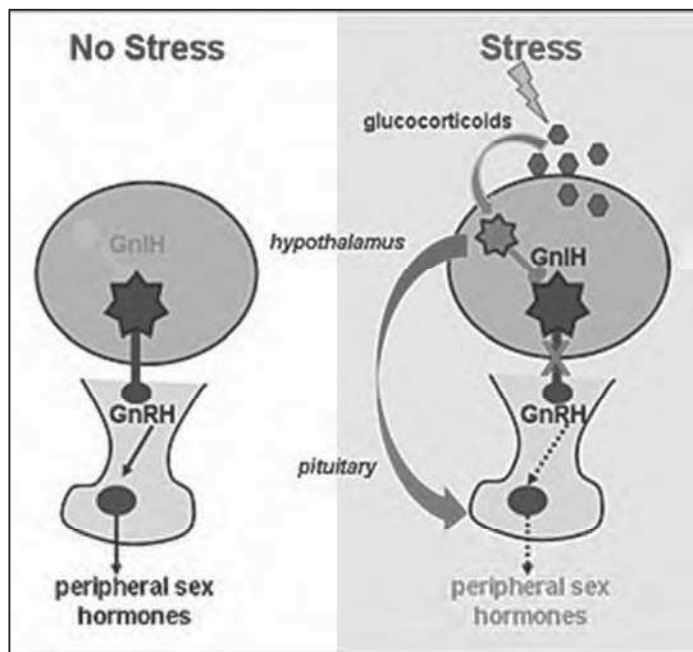


Figure 6. Effet du stress sur la reproduction.

En l'absence de stress (à gauche), l'hypothalamus sécrète l'hormone de libération des gonadotrophines hypophysaires (GnRH) qui stimule l'hypophyse. Celle-ci va alors produire les hormones gonadotrophines (hormone lutéinisante LH et l'hormone folliculo-stimulante FSH). Ces hormones stimulent la production de testostérone et d'estradiol et affectent le comportement reproducteur. Le stress (à droite) entraîne la production de glucocorticoïdes qui agissent directement sur l'hypothalamus en supprimant la production de GnRH (croix rouge). Elles stimulent également la production de GnIH (étoile rouge) qui réduit la production de GnRH par l'hypothalamus et de gonadotrophines par l'hypophyse.

Source : Elizabeth Kirby/UC Berkeley in [509]

³ Repli cutané, soutenu par des os dermiques, qui recouvre latéralement la cavité branchiale chez les poissons osseux

progéniture de saumons atlantiques femelles traitées au cortisol⁴. De plus, les descendants de ces femelles présentaient une tolérance plus faible aux stress thermiques modérés que les contrôles. Plusieurs études ont également montré que le traitement en cortisol des femelles ou l'exposition des œufs à une concentration physiologique de cortisol entraînent des changements comportementaux chez la progéniture, incluant des modifications de l'activité [135,136], du comportement alimentaire [136], de l'agressivité [136,137] et du comportement exploratoire [137]. Ces résultats semblent indiquer que la tolérance au stress dépend en partie d'effets transgénérationnels sans lien avec l'héritabilité génétique [136].

1.6.2.3. Effet sur la résistance aux maladies

Le cortisol a une action anti-inflammatoire et immunosuppressive et diminue par conséquent la résistance des poissons aux maladies [41,138,139]. Toutefois, les effets sur la résistance aux maladies dépendent de la nature, de la durée et de l'intensité du stress mais également de l'espèce [140]. Chez les juvéniles de saumon royal (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposés à un stress aigu très court (i.e sortie de l'eau pendant 30s ou manipulations pendant 4 heures), la production de cellules productrices d'anticorps et la résistance au pathogène *Vibrio anguillarum* diminuent 4 heures après le stress, pour revenir à la normale au bout de 24 heures [141]. Chez la truite fario (*Salmo trutta*) ayant subi une implantation intrapéritonéale de cortisol, une augmentation chronique très faible de la concentration de cortisol augmente le taux de mortalité lié à des infections bactériennes et fongiques [138]. Par ailleurs, Fast et al. (2008 [140]) ont exposé des saumons atlantiques (*Salmo salar*) à un stress chronique de prise en main quotidienne de 15s pendant 4 semaines et ont observé une augmentation de l'expression de gènes pro-inflammatoires dans un premier temps, puis une diminution de la stimulation des leucocytes (i.e globules blancs) en réponse à des antigènes extracellulaires, et finalement une diminution de la survie des leucocytes exposés à une bactérie pathogène extrêmement virulente chez les salmonidés, *Aeromonas salmonicida*.

1.6.3. Aspects énergétiques

1.6.3.1. Allocation de l'énergie et compromis énergétiques

La croissance, la reproduction ainsi que les diverses activités de maintenance de l'organisme (ventilation, osmorégulation, battements cardiaques ...) nécessitent des apports importants en énergie, fournis par les nutriments et les réactions cataboliques associées [142,143]. L'allocation de l'énergie à

⁴ Dans les études sur les effets du stress chez les poissons, l'implantation en intrapéritonéal d'une pompe osmotique libérant du cortisol est une technique souvent utilisée pour simuler les effets d'une augmentation du cortisol plasmatique sous l'effet d'un stress chronique.

ces différentes activités varie au cours de la vie des organismes, d'un tissu à l'autre, mais également en fonction du contexte environnemental [142,143]. La gestion des ressources et la modification des voies énergétiques permettent de moduler et d'orienter l'énergie selon les besoins spécifiques des cellules, tissus et organes au prix de compromis – ou trade-off – énergétiques entre la maintenance, le développement, la croissance et la reproduction [142–145].

Lorsque les organismes sont soumis à un stress, l'énergie normalement allouée à la croissance et à la reproduction est investie dans les processus de tolérance et de résistance au stress (maintenance) [114,144,146,147] (cf. Figure 7). A long terme, ces compromis énergétiques peuvent entraîner une diminution des réserves énergétiques, de la croissance et de la reproduction [144]. Par ailleurs, le statut nutritionnel des organismes (i.e. organismes à jeun ou alimentés) ainsi que les conditions abiotiques telles que la température influent sur la quantité d'énergie disponible, et donc sur les compromis énergétiques [25,143,148,149].

1.6.3.2. Le concept de capacité métabolique de Fry

En 1947, Fry développe le concept de capacité métabolique pour expliquer et mesurer les effets de l'environnement sur le comportement des poissons [145]. Dans ce concept, les ressources énergétiques que sont l'oxygène et les nutriments issus de la digestion sont métabolisés pour former l'énergie chimique disponible pour les différentes activités de l'organisme (Figure 8). La puissance énergétique de maintenance, ou capacité métabolique standard, est destinée aux activités obligatoires telles que la ventilation, les battements cardiaques, l'osmorégulation ou l'entretien des structures de l'organisme.

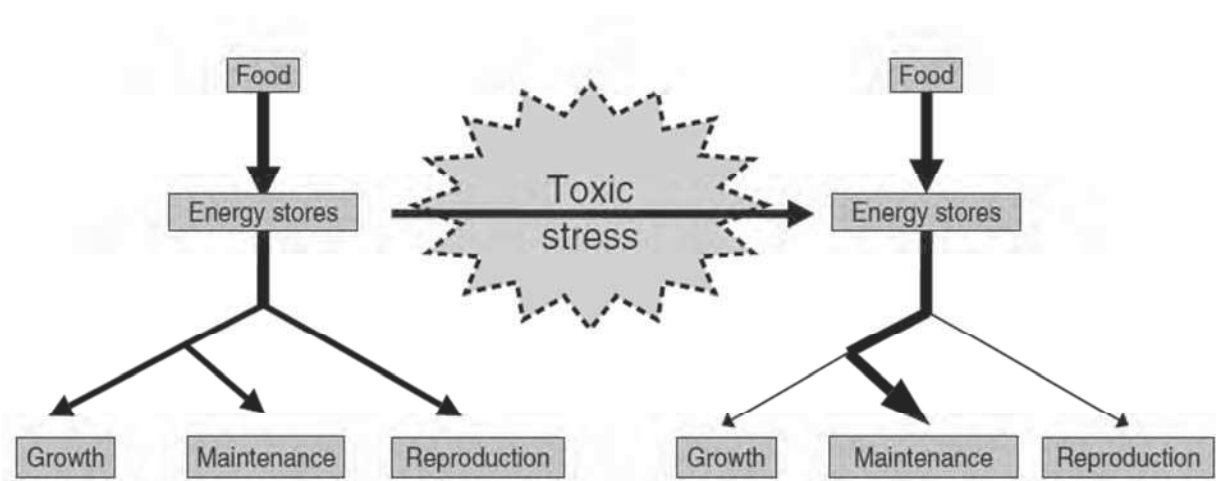


Figure 7. Effet d'un stress sur l'allocation des ressources énergétiques

Seion l'hypothèse de coût métabolique, l'exposition à un stress entraîne une augmentation de l'énergie nécessaire au maintien de l'homéostasie (maintenance). Il y a donc moins d'énergie disponible pour la croissance et la reproduction. Tiré de Smolders 2005 [144].

Cette énergie peut augmenter, par exemple lorsque l'organisme est soumis à un stress, mais ne peut pas diminuer en dessous d'un seuil déterminant la survie de l'individu. La puissance énergétique de routine est utilisée pour les activités discrétionnaires (nage, recherche alimentaire, digestion...) et peut être modulée selon les besoins énergétiques, tout comme le surplus d'énergie alloué à la croissance somatique et gonadique.

Le métabolisme basal (SMR pour « Standard Metabolic Rate ») correspond à l'énergie dépensée pour permettre une activité minimale (ventilation, battements cardiaques...) et l'entretien des structures de l'organisme. Il est mesuré par la consommation d'oxygène lorsque l'individu est au repos, à jeun, en dehors de la période de reproduction ou de source de stress. Il correspond à la capacité métabolique standard ou énergie de maintenance (Figure 8).

Le métabolisme actif (AMR pour « Active Metabolic Rate ») correspond à l'énergie maximale pouvant être dépensée par un organisme. Il est mesuré lorsque l'individu fournit une activité intense, par exemple une nage soutenue. Il correspond à la capacité métabolique totale (puissance énergétique de

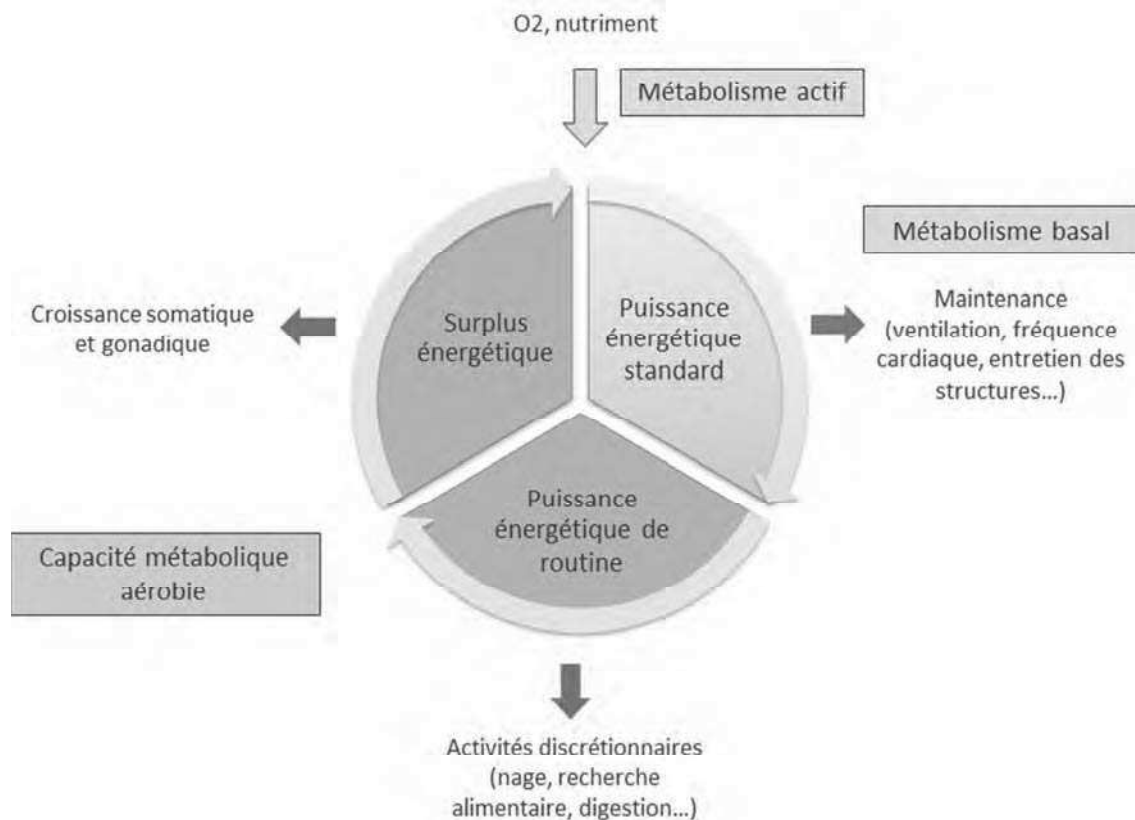


Figure 8. Représentation schématique du concept de capacité métabolique de Fry.

L'énergie disponible sous forme d'oxygène et de nutriment est métabolisée pour former la puissance énergétique globale de l'individu. Cette puissance énergétique est d'abord allouée à la maintenance (puissance énergétique standard) puis aux activités discrétionnaires (puissance énergétique de routine). Le surplus énergétique est investi dans la croissance somatique et/ou gonadique. Le métabolisme actif correspond à l'énergie maximale disponible pour l'organisme, le métabolisme basal correspond à l'énergie dépensée pour les activités de maintenance et la capacité métabolique aérobie est l'énergie disponible pour les activités discrétionnaires, la croissance et la reproduction (i.e métabolisme actif – métabolisme basal). Adapté de Cannas (2011 [510])

maintenance plus puissance énergétique de routine plus surplus énergétique Figure 8).

La capacité métabolique aérobie (AMS pour « Aerobic Metabolic Scope ») est la différence entre le métabolisme basal et le métabolisme actif. Elle correspond donc à l'énergie disponible pour les activités discrétionnaires, la croissance et la reproduction (Figure 8). Elle est également appelée « capacité pour l'activité » (« scope for activity »).

On peut classer les facteurs environnementaux en fonction de leurs effets sur le métabolisme basal et actif et sur la capacité métabolique aérobie :

- **les facteurs de contrôle** (e.g. température) modifient le métabolisme basal et actif en agissant directement sur les voies métaboliques notamment via l'augmentation de la cinétique des réactions biochimiques cataboliques ;
- **les facteurs limitants** (e.g. oxygénation de l'eau et ressources alimentaires) diminuent le métabolisme actif en limitant l'oxygène et les nutriments nécessaires pour produire de l'énergie ;
- **les facteurs létaux** (e.g. stress chimiques ou physiques extrêmes) arrêtent totalement le métabolisme et conduisent les individus à la mort ;
- **les facteurs masquants** (e.g. stress modérés) diminuent la capacité métabolique aérobie en augmentant le métabolisme basal ;
- **les facteurs directifs** (e.g. température, oxygénation...) entraînent une réponse physiologique et/ou comportementale dirigeant l'individu vers un habitat ou un état physiologique plus adaptés, avec un coût énergétique variable.

La capacité d'adaptation au stress ainsi que le maintien sur le long terme des performances de l'organisme dépendent du maintien de la capacité métabolique aérobie [54]. De ce constat est née l'idée que la tolérance aux stress est déterminée par les capacités métaboliques des organismes.

1.6.3.3. Détermination métabolique de la tolérance au stress

La balance énergétique est fondamentale dans l'adaptation au stress, incluant la modulation des voies métaboliques, l'augmentation de la capacité et/ou de la densité des mitochondries et, à une plus grande échelle, la mise en place de compromis énergétiques entre les différentes activités de l'organisme. *In fine*, la tolérance des organismes aux stress environnementaux dépend en grande partie de l'énergie disponible, de l'efficacité d'acquisition et de conversion de la nourriture mais également de la capacité à mobiliser les ressources énergétiques pour compenser le coût métabolique de l'adaptation [150,151]. Cette contrainte systémique du maintien de la capacité métabolique aérobie détermine la tolérance au stress des organismes, et par conséquent leur chance de survie, avant même que les fonctions moléculaires et cellulaires soient perturbées [54].

Le coût bioénergétique du maintien de l'homéostasie et de l'induction des systèmes de défense et de réparation des dommages augmente avec l'intensité et la durée du stress, entraînant des stratégies de compensation métaboliques différentes (Figure 9) [150]. Lorsque le stress est modéré (Figure 9-bI), la demande énergétique pour la maintenance augmente, diminuant *de facto* l'énergie disponible pour la croissance, la reproduction, l'activité et le stockage de l'énergie sous forme de réserves. Si les processus d'assimilation ou de métabolisation de l'énergie sont perturbés par le stress (Figure 9-bII), l'énergie disponible diminue. Dans les deux cas la capacité métabolique aérobie diminue. Il s'agit d'une **stratégie de compensation métabolique** permettant à l'organisme de s'adapter au stress au dépend de processus non vitaux comme la croissance, la reproduction et l'activité. Les réserves énergétiques sont également utilisées pour fournir de l'énergie aux différents processus impliqués.

Lorsque le stress est extrême (Figure 9c), soit la demande énergétique pour la maintenance augmente au-delà des capacités métaboliques aérobies (cI), soit la perturbation du métabolisme aérobie entraîne une diminution de l'énergie disponible en dessous de la demande énergétique (cII). Dans les deux cas, le métabolisme aérobie ne peut couvrir la demande énergétique. La capacité métabolique aérobie disparaît et le métabolisme passe en anaérobiose partielle pour couvrir le coût de la maintenance. C'est une **stratégie de conservation**, permettant une survie à court terme de l'organisme jusqu'à ce que les conditions reviennent à la normale. Lorsque la compensation par le métabolisme anaérobie ne suffit pas, les organismes peuvent entrer en « **arrêt métabolique** », une suppression réversible de tous les taux métaboliques au-dessus du métabolisme basal. L'arrêt métabolique se caractérise notamment par une diminution de l'activité, l'arrêt de l'investissement dans la reproduction et la croissance, une diminution du catabolisme des carbohydrates et des acides aminés, ainsi que l'augmentation des réserves de glycogène.

Lorsque le déséquilibre entre la demande énergétique et l'énergie disponible ne peut plus être compensé, l'arrêt du métabolisme conduit à la mort des individus. C'est la limite létale de la tolérance au stress.

De ce point de vue, la balance énergétique détermine les limites de tolérance des organismes aux stress [150,151]. L'analyse combinée de différents marqueurs liés au métabolisme énergétique permet de déterminer la stratégie métabolique employée par l'organisme et donc ses limites de tolérance.

1.7. CONCLUSIONS SUR LES REPONSES AU STRESS

L'ensemble de ces réponses secondaires et tertiaires sont généralement temporaires et cessent lorsque les hormones de stress retournent à leur niveau de base. Toutefois, lorsque les organismes sont soumis à un stress chronique, le rétrocontrôle négatif exercé par le cortisol (i.e. qui permet normalement la diminution de la sécrétion du cortisol) peut être perturbé [29]. Dans ce cas, le prolongement de la

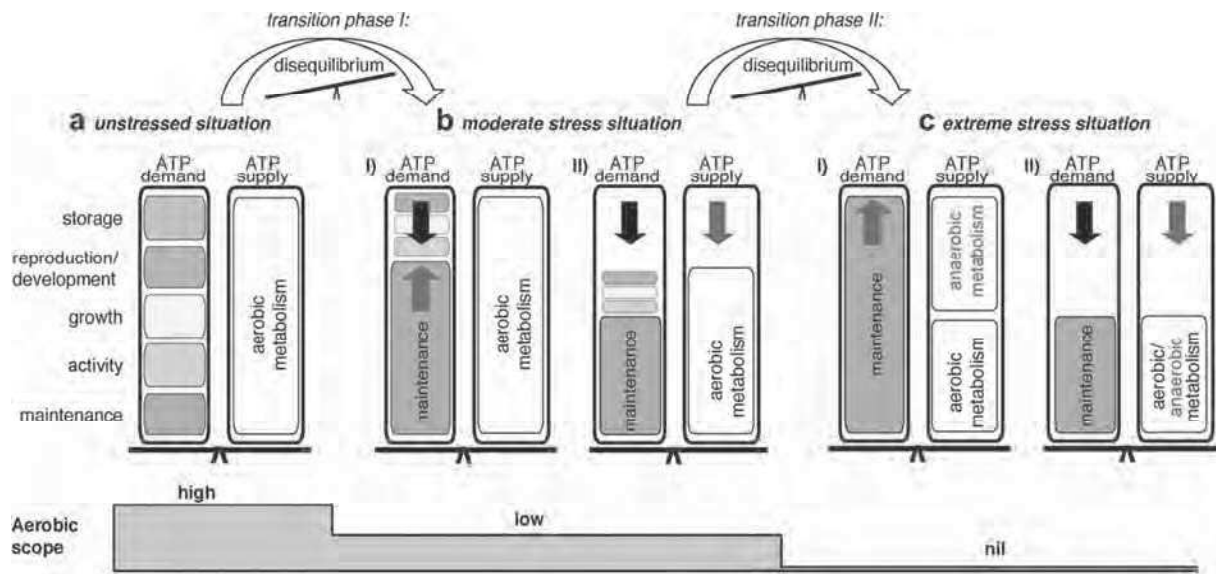


Figure 9. Stratégies métaboliques en réponse à un stress modéré ou extrême.

(a) en situation normale, l'énergie de l'organisme est allouée à la maintenance, l'activité, la croissance, la reproduction ou le développement. Le surplus est stocké sous forme de réserves. L'énergie sous forme d'ATP est fournie par le métabolisme aérobie (i.e. cycle de Krebs et phosphorylation oxydative).

(b) compensation métabolique en cas de stress modéré : la demande énergétique pour la maintenance augmente (bI) et/ou l'assimilation ou la métabolisation de l'énergie diminue (bII). Dans les deux cas la capacité métabolique aérobie (aerobic scope, en bas du schéma) diminue. Les réserves énergétiques sont utilisées et l'énergie allouée aux fonctions non vitales comme la croissance et la reproduction diminue.

(c) stratégie de conservation en cas de stress extrême : la demande énergétique pour la maintenance dépasse la quantité d'énergie disponible (cI) et/ou la perturbation du métabolisme énergétique aérobie entraîne une forte diminution de l'énergie disponible (cII). Dans les deux cas, la capacité métabolique aérobie disparaît, et le métabolisme anaérobie vient compenser le manque d'énergie. Si cela ne suffit, l'organisme entre en « arrêt métabolique » (i.e. arrêt total de tous les taux métaboliques au-dessus du métabolisme basal).

Tiré de Sokolova et al. 2012 [150].

réponse au stress sur le long terme peut entraîner des effets importants sur la compétence et la survie des poissons. Les populations sauvages de poissons soumises à des stress chroniques présentent ainsi souvent une diminution du taux de croissance, de l'espérance de vie et de la reproduction [124], avec des conséquences potentielles sur les communautés et le fonctionnement des écosystèmes. De plus, les potentiels effets transgénérationnels du stress et leurs conséquences sur les populations sont relativement peu étudiés [136,137,152].

Par ailleurs, si le stress induit une réponse non spécifique dite « généraliste », certaines réponses sont modulées en fonction de nombreux paramètres inhérents au stress lui-même – intensité, durée, fréquence – ou à l'organisme [31]. Ainsi, le taux basal de cortisol ainsi que le niveau de sécrétion induit par le stress sont fortement variables d'un individu à l'autre [121,153]. Outre le rôle de l'héritage parental [154], ils sont fortement influencés par les expositions précédentes au stress [155,156], la densité des individus [157], la saison et le rythme circadien [158], le sexe [159] et le statut de reproduction [153], le stade de développement [112,160] et les interactions sociales [157,161,162].

L'habituation des organismes (Boite 2) à une source de stress est un facteur à prendre en considération dans les études écologiques ou écotoxicologiques [29]. Acclimatation, facilitation et adaptation sont des processus qui permettent, à différentes échelles de temps, à un organisme de faire face à un changement brutal ou graduel de son environnement. Ce sont des facteurs confondants, notamment dans les études *in situ*, qui modifient la capacité d'un organisme à répondre à un stress subséquent.

BOITE 2. ACCLIMATATION VS ADAPTATION

Acclimatation : modifications physiologiques et chimiques qui permettent à un organisme exposé de façon répétée ou chronique à un stress de ne plus le considérer comme nuisible et de diminuer sa réponse. Ce processus, relativement rapide, est généralement temporaire, réversible et les modifications ne sont pas transmises à la descendance.

Facilitation : processus par lequel l'acclimatation à un stress augmente la réponse de l'organisme à de nouveaux facteurs de stress.

Adaptation : capacité d'un organisme à changer certaines de ses caractéristiques physiques ou chimiques pour s'ajuster aux modifications de son habitat. Il s'agit d'un phénomène long et qui intervient dans les processus évolutifs : les modifications sont généralement non réversibles et se transmettent à la descendance.

Rq : par abus de langage, la réponse au stress est très souvent appelée *réponse adaptative* ou *adaptive response* en anglais, même s'il s'agit d'une réponse réversible. Cette terminologie étant employée dans l'ensemble de la littérature scientifique, il en est de même dans ce manuscrit.

RESUME

Les organismes soumis à un stress mettent en place une réponse adaptative coordonnée incluant de nombreux processus endocriniens, moléculaires, cellulaires, physiologiques et comportementaux permettant à l'organisme de fuir ou de résister au stress. Sans être exhaustif, ces modifications incluent :

- **Au niveau moléculaire/cellulaire** : effets sur la production et/ou l'action des hormones, modulation de l'expression de gènes, modification du métabolisme énergétique cellulaire, induction de systèmes de défense et de réparation des dommages, modification du nombre et/ou de la capacité des mitochondries, arrêt du cycle cellulaire ou apoptose...;
- **Au niveau des tissus/organes** : modification du fonctionnement de certains organes (i.e. le cœur, le foie, les organes digestifs, les organes reproducteurs ou du système immunitaire...), diminution des réserves énergétiques... ;
- **à l'échelle de l'individu** : effet sur les traits afférents à la compétence, la survie et la fitness des organismes, incluant le comportement, l'activité, la condition générale, la croissance, la reproduction et la résistance aux maladies.

Lorsque le stress est modéré et court, les effets sur la santé des organismes sont faibles. En revanche, un stress chronique ou aiguë entraîne des effets délétères sur la santé, la survie et la fitness des individus.

Les processus physiologiques et comportementaux nécessaires pour permettre la survie de l'individu soumis à un changement de son environnement ont un coût énergétique important. L'augmentation de la demande énergétique peut conduire à une réallocation de l'énergie des fonctions impliquées dans les performances et la fitness, comme la reproduction et la croissance, vers la maintenance et la réparation des dommages occasionnés. Lorsque le stress est extrême, les organismes passent d'une stratégie de **compensation métabolique** à une stratégie de **conservation** permettant une survie limitée dans le temps jusqu'à ce que les conditions reviennent à la normale.

La tolérance à un stress et le maintien sur le long terme des performances de l'organisme dépendent donc en grande partie de la balance énergétique et de la capacité métabolique des organismes.

2. LES PESTICIDES

Depuis la mise sur le marché de la première substance de synthèse dans les années 40, les pesticides ont permis de lutter contre de nombreux risques biologiques pour la santé humaine et d'augmenter notablement la quantité de nourriture disponible pour une population mondiale toujours croissante. Toutefois, en raison de l'augmentation de leur utilisation, la question de leurs impacts potentiels sur l'environnement et la santé humaine s'est posée rapidement aussi bien dans la sphère scientifique que publique. Cette partie présente une synthèse sur l'utilisation des pesticides en France et dans le monde, la contamination de l'environnement en résultant et sur les conséquences potentielles chez les poissons.

2.1. ROLES ET UTILISATIONS DES PESTICIDES

Le mot « pesticide » vient du latin « *caedere* » (tuer) et « *pestis* » (fléau). Comme leur nom l'indique, les pesticides sont essentiellement utilisés pour lutter contre les organismes considérés comme pathogènes ou nuisibles (i.e. végétaux, bactéries, champignons ou animaux). On peut classer ces pesticides selon leurs cibles (i.e. herbicides pour les plantes, fongicides pour les champignons, insecticides pour les insectes...), leurs usages (i.e. agriculture, jardins et plantes ornementales, traitement du bois, médecine humaine ou vétérinaire...) ou encore selon leurs familles chimiques et leurs modes d'actions [163] (Tableau 1). Il faut d'ailleurs noter que des molécules appartenant à une même famille chimique peuvent avoir des cibles et des modes d'actions différents (e.g. les carbamates Tableau 1). Les pesticides regroupent ainsi plus de 500 molécules très diverses de point de vue de leur propriétés physico-chimiques, de leurs cibles, de leurs modes d'actions mais également de leur comportement dans l'environnement et de leur toxicité sur les espèces « non-cibles⁵ ».

⁵ Les espèces non-cibles sont toutes les espèces vivantes affectées directement ou indirectement par les pesticides alors qu'elles ne sont pas ciblées par ces pesticides, e.g. insectes pollinisateurs, oiseaux, organismes aquatiques ou encore l'Homme.

Tableau 1. Exemples de pesticides classés selon leurs familles chimiques et leurs cibles principales.
Tiré de Inserm 2013 [163].

Familles chimiques	Exemples de substances actives	Classement selon cible
Organochlorés	DDT, Chlordane, Lindane, Dieldrine, Heptachlore	Insecticides
Organophosphorés	Malathion, Parathion, Chlorpyrifos, Diazinon	Insecticides
Pyréthroïdes	Perméthrine, Deltaméthrine	Insecticides
Carbamates	Aldicarbe, Carbaryl, Carbofuran, Méthomyl	Insecticides
	Asulame, Diallate, Terbucarbe, Triallate	Herbicides
	Benthiavalicarbe	Fongicides
Dithiocarbamates	Mancozèbe, Manèbe, Thirame, Zinèbe	Fongicides
Phtalimides	Folpel, Captane, Captafol	Fongicides
Triazines	Atrazine, Simazine, Terbutylazine	Herbicides
Phénoxyherbicides	MCPA, 2,4-D, 2,4,5-T	Herbicides
Chloroacétamides	Alachlore, Métolachlore	Herbicides
Pyridines-bipyridiliums	Paraquat, Diquat	Herbicides
Aminophosphonates glycine	Glyphosate	Herbicides

Les pesticides sont classés comme des produits phytopharmaceutiques (essentiellement en agriculture) ou des biocides (en médecine humaine et vétérinaire et le traitement des matériaux, avec les antibiotiques et les désinfectants). La même substance active peut ainsi être utilisée à la fois comme phytopharmaceutique et comme biocide, bien que dans des formulations différentes.

La grande majorité des pesticides produits et utilisés dans le monde sont des phytopharmaceutiques. Selon la directive 91/414/CEE, les produits phytopharmaceutiques sont définis comme les substances actives ou les préparations contenant ces substances actives qui sont notamment destinées à :

- Protéger les végétaux contre les organismes nuisibles (en curatif ou en préventif) ;
- Réguler la croissance des végétaux ;
- Assurer le stockage et la conservation des produits végétaux ;
- Détruire les végétaux indésirables.

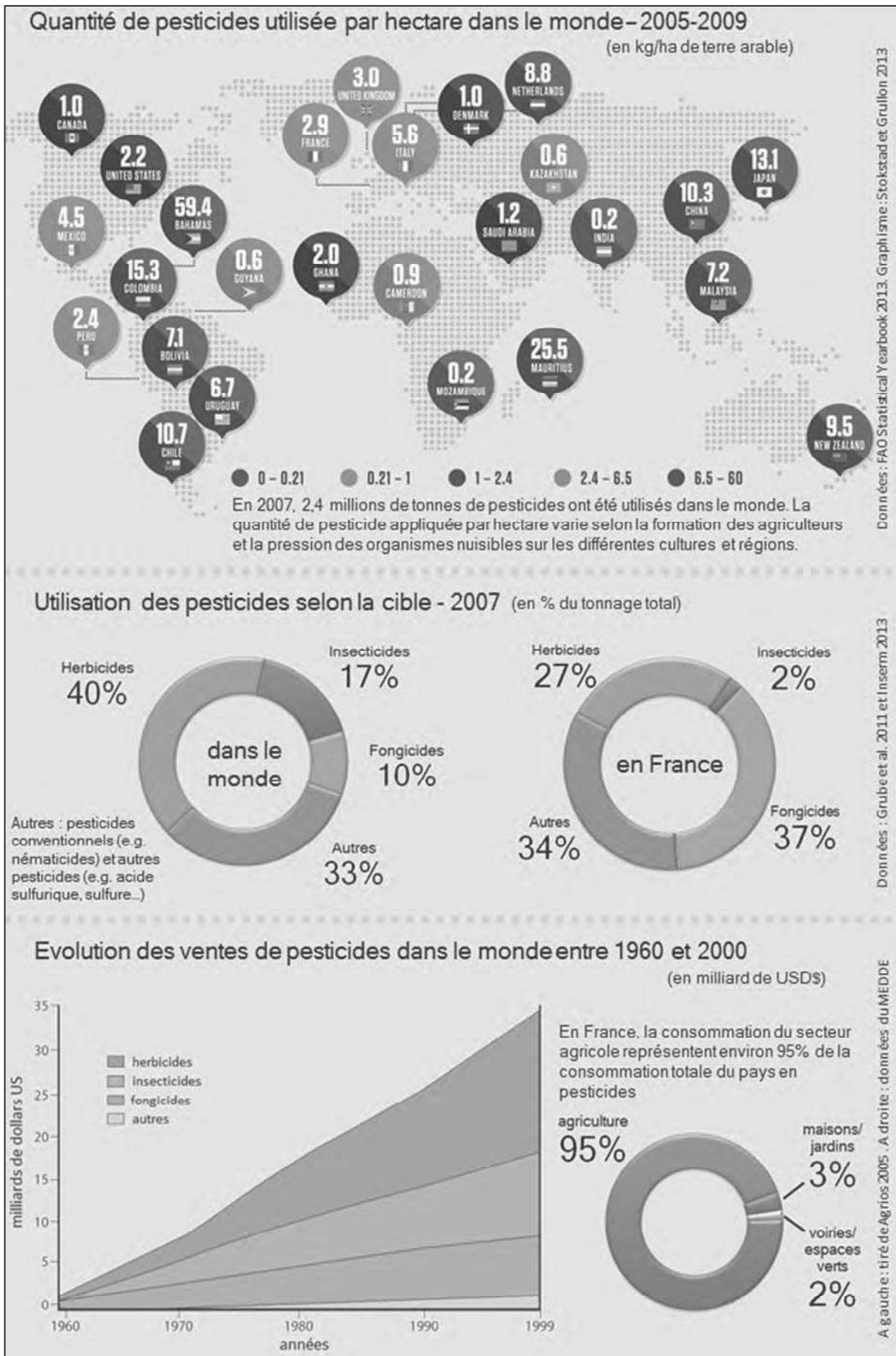
Ces produits phytopharmaceutiques, aussi appelés produits phytosanitaires, sont essentiellement utilisés en agriculture et, dans une moindre mesure, en zone non agricole pour l'entretien des voiries, des espaces verts et des jardins/habitations de particuliers. Environ 2,5 millions de tonnes de pesticides sont utilisés en moyenne par an dans le monde, dont 40% d'herbicides, 17% d'insecticides et 10% de

fongicides (Figure 10) [164]. Leur usage ainsi que la quantité de pesticides utilisée par hectare varient toutefois énormément entre les pays, notamment en fonction de la formation et des moyens financiers des agriculteurs, du type de culture prédominante et de la pression des organismes nuisibles [163,164]. Aux Etats-Unis, où les cultures de maïs, soja et blé prédominent, les herbicides sont largement majoritaires [165]. En revanche, en France, les fongicides utilisés notamment pour le traitement des vignes dominent le marché des phytosanitaires [163] (Figure 10). Après une augmentation régulière des ventes jusque dans les années 90s (Figure 10) [166], le tonnage de pesticides consommé commence à se stabiliser voire à diminuer dans certains pays à partir des années 2000, dont la France [167]. L'utilisation d'insecticides a ainsi diminué, notamment en raison de l'utilisation croissante de semences génétiquement modifiées (e.g. variétés avec toxines Bt) et/ou de l'augmentation de l'efficacité des produits vendus [163,165].

La France est le premier pays agricole de l'Union Européenne en terme de surfaces agricoles utiles (SAU de 30 millions d'hectares dont 18 de terres arables [168]) et de chiffre d'affaire (39 milliards d'euros de production végétale en 2014 [169]) devant l'Italie et l'Allemagne. La France est également le 4^{ème} plus grand consommateur mondial de pesticides avec des ventes annuelles entre 60 et 80 000 tonnes, dont 95 % utilisées pour l'agriculture [170]. Environ 500 substances actives entrant dans la composition de plus de 8000 produits commercialisés sont utilisées dans l'agriculture française. L'utilisation de pesticides par hectare de terre arable⁶ est dans la moyenne européenne avec 2,9 kg/ha/an de substance active [163,164,170] (Figure 10). Toutefois, si l'on prend en compte l'ensemble des terres cultivées (SAU hors prairies), l'utilisation moyenne est de 5,4 kg/ha/an [170]. Les vignes et l'arboriculture fruitière, qui ne représentent que 4% de la SAU, consomment ainsi jusqu'à 20% du tonnage de pesticides vendus [163,171] (Figure 11). Cette valeur place la France dans les cinq pays européens les plus consommateurs de pesticides à l'hectare, bien qu'il existe des disparités importantes entre les régions [170] (Figure 11).

Sur ces pesticides appliqués dans les cultures, une quantité non négligeable se disperse dans l'environnement. Selon certains auteurs, moins de 0,3% des substances déversées atteindrait réellement les organismes cibles, le reste contaminant les sols, l'eau et l'atmosphère [172,173]. Toutefois, la dispersion et le comportement des pesticides dans l'environnement dépend de nombreux paramètres inhérents aux substances elles-mêmes (i.e. solubilité, pression de vapeur, durée de demi-vie...), au mode d'application (e.g. dispersion aérienne *versus* rampes d'épandage au sol) mais également à l'environnement (e.g. type de sol, climat, distances aux rivières...) [174,175].

⁶ Dans la surface agricole utile (SAU) on distingue les terres arables (grandes cultures maraîchères et céréalières et terrains en jachère), les prairies et les cultures permanentes (vignes et autres arbres fruitiers).



Données : FAO Statistical Yearbook 2013, Graphisme : Stokstad et Grullon 2013

Données : Grube et al. 2011 et Inserm 2013

A gauche : tiré de Agrios 2005. A droite : données du MEDDE

Figure 10. Infographie sur l'utilisation des pesticides dans le monde.
 Adapté de Stokstad et Grullon 2011 [511] avec des données issues de FAO 2013 [164], Grube et al. 2011 [165], Inserm 2013 [163], Agrios 2005 [166] et du MEDDE [512].

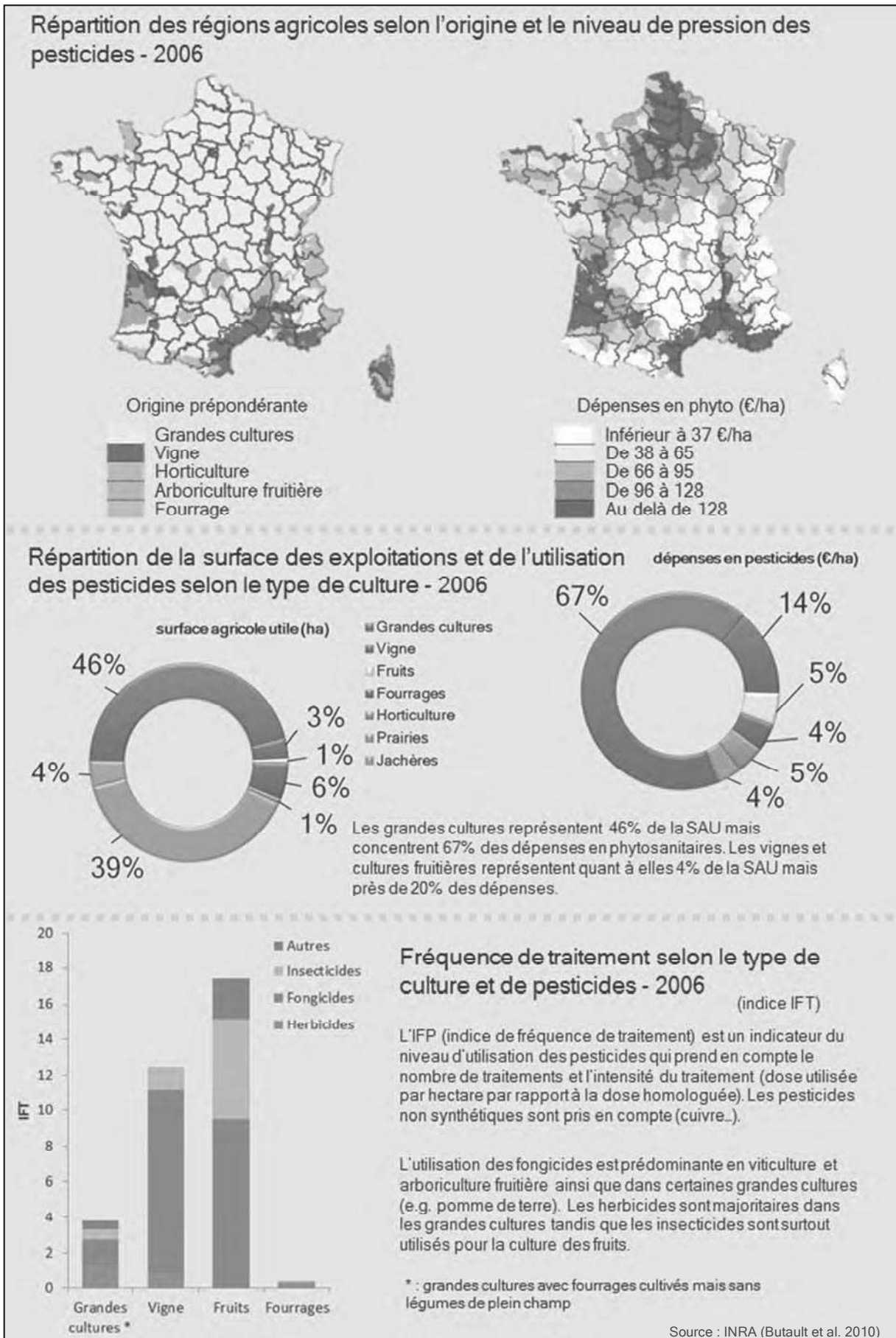


Figure 11. Infographie sur l'utilisation des pesticides en France.

Source des données : INRA [171]. Graphisme adapté de Stokstad et Grullon 2011 [511]. SAU : surface agricole utile.

2.2. CONTAMINATION DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES ET EVALUATION DES RISQUES

Les phytosanitaires se dispersent dans l'environnement au moment de l'application, selon différentes voies de transfert. Ils peuvent se volatiliser et être transportés avant de retomber sous forme de dépôts secs ou humides. Ils vont également s'adsorber dans le sol et s'infiltrer vers les eaux souterraines. Les phytosanitaires contaminent les eaux de surface essentiellement par des phénomènes de ruissellement des eaux de pluies. Certains fongicides qui sont utilisés comme biocides contaminent les milieux aquatiques *via* les eaux traitées issues de stations d'épuration, où ils ne sont que très partiellement dégradés [176]. Les pesticides présents dans les boues d'épuration issues de ces stations contaminent les milieux aquatiques *via* le ruissellement [177,178].

2.2.1. La contamination des écosystèmes aquatiques en France

La contamination des eaux de surface (cours d'eau et plans d'eau) et souterraines françaises par les pesticides fait l'objet d'une surveillance depuis de nombreuses années par les agences et offices de l'eau. L'analyse des données issues de ce réseau de surveillance est mise à disposition du public sur le site internet de la Commission au Développement Durable sous l'égide du Ministère de l'Ecologie, du Développement Durable et de l'Energie [179]. Toutefois, les données des agences de l'eau dépendent de la stratégie du suivi (nombre de points de surveillance, fréquence et périodes de prélèvements, nombres de substances recherchées...) et des performances analytiques qui varient d'une région à l'autre. Ainsi, sur les 594 substances recherchées à l'échelle nationale, seulement 275 sont en réalité analysées en moyenne par points de suivi [179].

En 2012, des pesticides ont été détectés dans 89% des points de suivi des cours d'eau métropolitains (sur 2706 points de mesures), contre 56% dans les départements d'outre-mer (hors Guyane). Sur les 594 pesticides recherchés en France métropolitaine (substances actives et produits de dégradation), 51 % ont été détectés au moins une fois. En termes de nombre de molécules différentes détectées, 26 % des prélèvements présentaient plus de 20 substances [179] (Figure 12). Les régions les plus contaminées en pesticides sont des régions de grandes cultures ou viticoles : le Sud-Ouest, le Nord-est, les Pays de la Loire et la vallée du Rhône. En 2012, 24,7 % des points de suivi des cours d'eau de France métropolitaine présentaient des concentrations totales moyennes supérieures à $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ et 40 stations dépassaient $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ [179] (Figure 12).

Du fait de leur utilisation majoritaire dans l'agriculture française, il n'est pas étonnant de retrouver essentiellement des herbicides et des fongicides dans les cours d'eau (Figure 13). Ainsi, en 2012, les pesticides les plus fréquemment détectés dans les cours d'eau de France métropolitaine sont majoritairement des herbicides, dont certains pourtant interdits depuis plusieurs années [179].

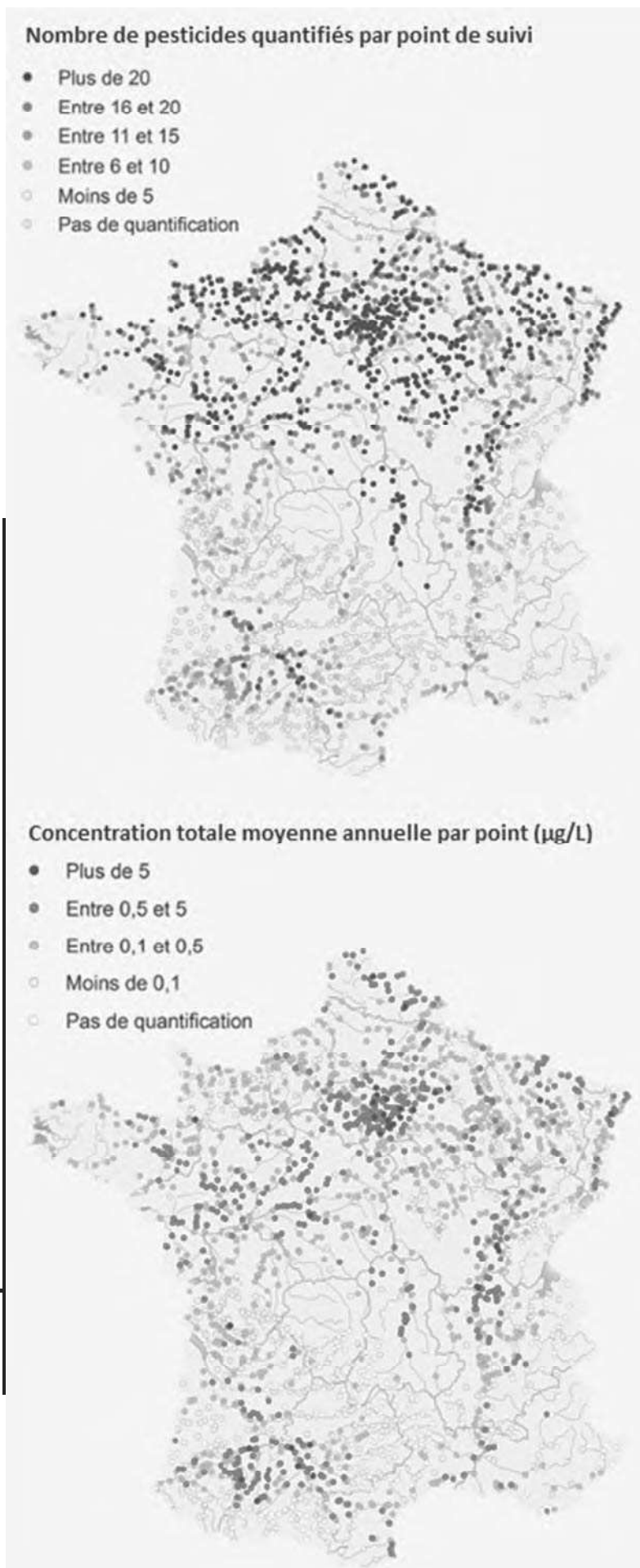


Figure 12. Nombre de pesticides quantifiés (en haut) et concentration totale en pesticides (en bas) dans les cours d'eau français en 2012.

Sources : agences et offices de l'eau, 2014. Traitement : SOeS, 2014. Site du Ministère de l'Ecologie, du Développement durable et de l'Energie - CGDD [179].

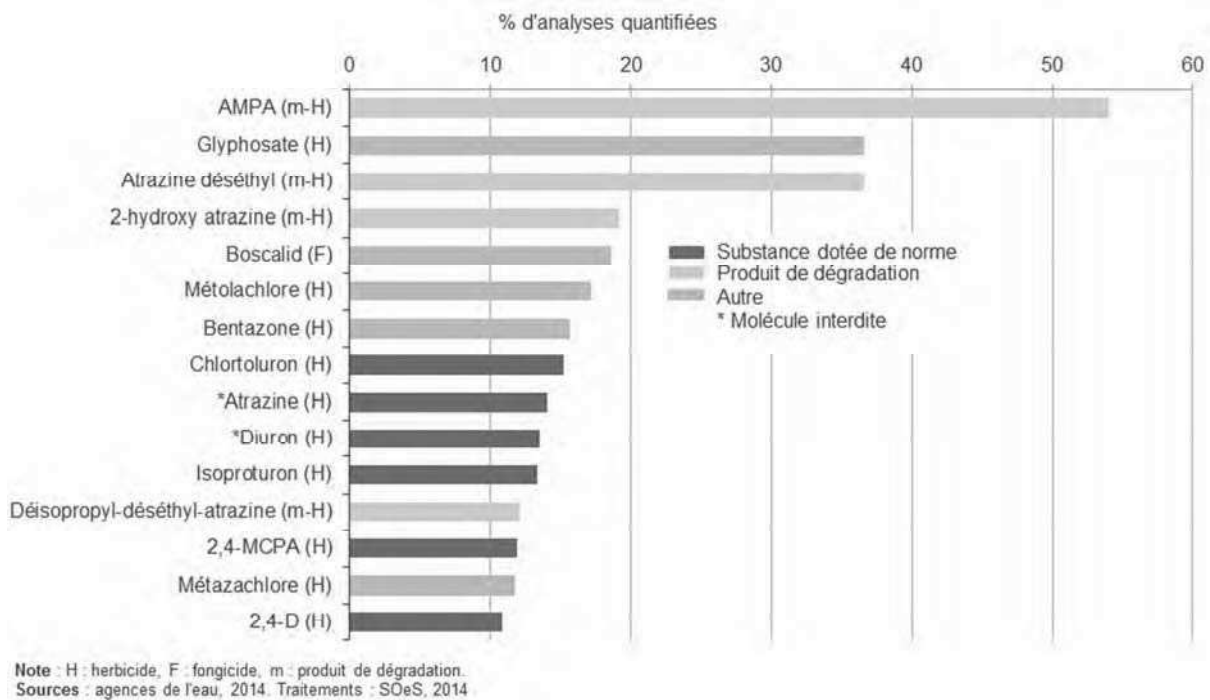


Figure 13. Les pesticides les plus quantifiés dans les cours d'eau de métropole en 2012

Source : site du Ministère de l'Écologie, du Développement durable et de l'Énergie - CGDD [179].

Le glyphosate et son produit de dégradation, l'AMPA, sont les deux substances les plus fréquemment détectées avec une présence quantifiée dans plus de 35% et 50% des points de suivi respectivement. L'atrazine déséthyl, un des produits de dégradation de l'atrazine (herbicide interdit depuis 2003), est détecté dans plus de 35% des points de suivi. L'atrazine même est détectée dans près de 15% des points de suivi. Les autres herbicides les plus fréquemment détectés en 2012 sont le métolachlore, le chlortoluron, le diuron (interdit depuis 2009), l'isoproturon ou encore le 2,4-MCPA. Le boscalid, un fongicide utilisé aussi bien dans les vignes que dans les cultures céréalières, fait partie des 5 molécules les plus fréquemment détectées avec une quantification dans 19 % de points de suivi.

2.2.2. Evaluation des risques pour les écosystèmes aquatiques et aspects législatifs

Le risque pour les écosystèmes aquatiques est pris en compte dans deux directives européennes qui concernent les pesticides : l'autorisation de commercialisation dans l'Union Européenne et les Etats membres des produits phytosanitaires et la Directive-Cadre sur l'Eau (DCE) sur la qualité écologique et chimique des masses d'eaux.

L'autorisation de mise sur le marché des « produits de protection des plantes » (i.e. phytosanitaires) est régie par la directive EC 1107/2009 qui remplace depuis 2011 la directive 91/414/CEE de 1991. Cette dernière subordonnait l'autorisation de mise sur la marché des phytosanitaires à une évaluation des risques sur la santé humaine, la santé animale et l'environnement. Dans le cadre de cette ancienne

directive, l'évaluation des risques pour les organismes aquatiques nécessitent la réalisation de tests de toxicité aiguë monospécifiques sur différents groupes (e.g. algues, spermaphytes, crustacés, diptères et/ou poissons). Une étude de la sensibilité de différentes espèces était ensuite réalisée au sein du groupe taxonomique le plus sensible. Des tests plurispécifiques en micro ou mésocosmes permettaient également de déterminer les effets sur des écosystèmes modèles. En prenant en compte la concentration d'exposition maximale prédite dans l'environnement, ces analyses permettaient d'évaluer le risque pour les systèmes aquatiques. Si celui-ci était jugé inacceptable, la molécule était interdite.

La nouvelle directive EC 1107/2009 ne concerne plus seulement les substances actives mais également les synergistes, phytoprotecteurs, co-formulants et adjuvants entrant dans la composition des produits commercialisés. En revanche elle ne prend plus en compte le « risque » (qui dépend des modalités d'exposition à la molécule, i.e. fréquence d'utilisation, période, quantité, mode d'épandage...) mais uniquement le « danger » des molécules. Selon ces nouveaux critères, ne seront pas autorisées ou seront exclues les substances mutagènes (classe 1 et 2), cancérigènes ou reprotoxiques, les perturbateurs endocriniens, les substances persistantes, bioaccumulables et toxiques (PBTs) et les substances très persistantes et très bioaccumulables (vPvB). Certaines dérogations seront toutefois mises en place en cas de « problème phytosanitaire grave qui ne peut être maîtrisé par d'autres moyens », si l'exposition est jugée « négligeable » ou si un moyen de substitution est envisagé. Toutes les substances actuellement sur le marché devront ainsi être réexaminées selon ces différents critères.

La Directive-Cadre sur l'Eau 2000/60/CE, adoptée en 2000, vise à prévenir et réduire la pollution des eaux souterraines ou de surfaces, que celles-ci soient douces, saumâtres ou salées. Elle impose notamment aux Etats membres d'identifier l'état écologique et chimique des eaux européennes et d'adopter des plans de gestion adaptés à chaque bassin hydrographique afin d'atteindre le « bon état ». Elle impose également des normes de concentrations maximales en polluants et une liste de substances prioritaires à surveiller dans les masses d'eau. Historiquement, la norme de potabilité de l'eau en France établie en 1980 est de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour la plupart des pesticides et de $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour la somme des pesticides. Ce sont également les valeurs maximales définies par le SEQ-eau⁷ pour permettre la vie des organismes aquatiques et la production d'eau potable sans traitement spécifique pour les pesticides. Au-delà de $2 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour un pesticide et de $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour la somme, l'eau ne « peut plus satisfaire les équilibres écologiques ou la production d'eau potable ». Mis en place au début de l'année 2000 et utilisé

⁷ Le SEQ-eau (système d'évaluation de la qualité des eaux) définit des classes de qualité des eaux en fonction des altérations et des usages. Appliqué depuis le 1^{er} janvier 2000 par l'ensemble des gestionnaires de l'eau français.

par tous les gestionnaires de l'eau, le SEQ-eau est aujourd'hui progressivement abandonné au profit des Normes de Qualité Environnementale (NQE) définies dans le cadre de la DCE⁸.

Les NQE réglementaires portent sur les substances « prioritaires » définies à l'échelle de l'Europe mais également sur d'autres molécules dites « pertinentes » qui sont déterminées au niveau national (Tableau 2). Les concentrations moyennes annuelles et maximales acceptables dans les eaux douces pour chaque molécule sont calculées à partir de tests de toxicité aiguë et chronique sur les algues, les daphnies et les poissons. Les tests de toxicité aiguë permettent de déterminer le C(E)L₅₀ ou concentration efficace ou létale pour 50% de la population, selon le paramètre mesuré (e.g. inhibition de croissance, mortalité...). Les tests de toxicité chroniques permettent quant à eux de déterminer la NOEC (concentration sans aucun effet observable) pour chaque groupe taxonomique. Plus la C(E)L₅₀ ou la NOEC sont faibles, plus l'organisme est sensible à la molécule. Pour calculer les NQE, les résultats des tests chroniques sont utilisés en priorité s'ils sont disponibles. La NOEC la plus faible ou par défaut la C(E)L₅₀ la plus basse est utilisée, et un facteur de sécurité défini par les directives européennes est appliqué afin d'abaisser le risque.

Au regard de ces NQE, les pesticides ne constituent pas une source de déclassement importante des masses d'eau françaises [3]. En 2012, seulement 5 % des stations présentaient des dépassements de normes NQE pour les pesticides, et généralement pour une seule substance [179]. Sur les 7 molécules responsables de ces dépassements, 4 sont des herbicides dont certains interdits depuis plusieurs années ou classés comme « substances dangereuses » par la DCE⁹: le 2,4 MCPA, le diuron (interdit depuis 2009), l'isoproturon (substance dangereuse prioritaire), et l'atrazine (interdit depuis 2003). Les trois autres molécules sont des insecticides interdits : les hexachlorocyclohexanes, l'endosulfan et le chlorpyrifos. La persistance importante des composés interdits explique en grande partie les contaminations actuelles. Toutefois, les normes NQE ne prennent pas en compte les pesticides les plus quantifiés en France métropolitaine (i.e. l'AMPA, le glyphosate, l'atrazine-déséthyl et le S-métolachlore) et ne reflètent donc pas totalement la contamination réelle des cours d'eau [3].

⁸ Les NQE sont fixées dans la première directive fille de la DCE publiée en 2008 (2008/105/EC) et révisées en 2013 dans la deuxième directive fille de la DCE (2013/39/EC). Elles sont disponibles sur le site de l'INERIS <http://www.ineris.fr/substances/fr/>.

Tableau 2. Exemples de Normes de Qualité Environnementale (NQE) et de Valeurs Guides Environnementales (VGE) pour quelques pesticides.

Les Normes de Qualité Environnementale (NQE) sont déterminées à l'échelle de l'Europe (origine : UE 2013, directive européenne 2013/39/EC) pour les substances « prioritaires » définies par la DCE. Elles ont une valeur réglementaire pour l'ensemble des Etats membres. Les Valeurs Guides Environnementales (VGE) sont déterminées pour les substances « pertinentes » de la DCE et dont la liste est établie au niveau national. L'INERIS propose les VGE au Ministère chargé de l'Ecologie qui peut les transposer en arrêtés nationaux. Les NQE et VGE sont calculées à partir des tests de toxicité aiguë et chronique effectués sur des algues, des invertébrés (e.g. daphnies) et des poissons. Plus la CL/CE50 ou la NOEC est faible (valeur en **gras**), plus le groupe taxonomique est sensible à la molécule. *Abréviations*. DCE : Directive-cadre sur l'eau ; Cmoy : concentration moyenne ; Cmax : concentration maximale ; CL/CE50 : concentration létale/efficace à 50% ; NOEC/CE10 : concentration sans effet observable/concentration efficace à 10%. *Chiffres*. (1) : concentration totale pour l'ensemble des isomères. *Etoiles*. * : substances « prioritaires dangereuses » de la DCE, ** : substances « prioritaires ». Source : Portail des Substances Chimiques, INERIS <http://www.ineris.fr/substances/fr>.

molécule	NQE ou VGE ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			tests de toxicité aiguë (mg.L^{-1})			tests de toxicité chronique (mg.L^{-1})		
	origine	Cmoy annuelle acceptable	Cmax acceptable	CL/CE50 algue	CL/CE50 invertébré	CL/CE50 poisson	NOEC/CE10 algue	NOEC/CE10 invertébré	NOEC/CE10 poisson
Insecticides									
hexachlorocyclohexanes ^{1*}	UE 2013	0,02	0,04	0,01	0,04	0,01	0,08	0,005	0,03
endosulfan*	UE 2013	0,005	0,01	-	0,15	0,0001	0,56	0,01	5,00E-05
chlorpyrifos**	UE 2013	0,03	0,1	0,05	1,40E-05	0,0013	0,03	5,60E-05	0,00014
Herbicides									
2,4-MCPA	INERIS 2013	0,5	13	0,13	>58,7	50	0,005	11	12
Aclonifen**	UE 2013	0,12	0,12	0,0069	1,2	0,67	0,0012	0,016	0,005
Atrazine**	UE 2013	0,6	2	0,02	5,29	3,96	-	-	-
Diuron**	UE 2013	0,2	1,8	0,0019	1,4	6,7	0,00196	0,1	0,41
Isoproturon**	UE 2013	0,3	1	0,01	0,58	18	0,0032	0,12	1
Linuron	INERIS 2009	0,1	-	0,01	0,12	3	0,01	0,18	0,1
Pendiméthaline	INERIS	<i>en cours</i>		0,01	0,28	0,14	0,003	0,01	0,01
Fongicides									
Boscalid	INERIS 2014	0,1	11,6	1,34	5,33	2,7	0,14	0,79	-
Pentachlorophénol**	UE 2013	0,4	1	0,08	0,08	0,01	0,1	0,0018	0,001
Tébuconazole	INERIS 2011	1	1,44	0,144	0,46	2,3	0,0342	0,01	0,01

2.2.3. Le problème des crues de printemps

Un autre exemple de la limite de ces normes et analyses est le phénomène de ruissellement intense suivant les fortes pluies de printemps qui est connu pour augmenter de façon transitoire mais importante la concentration de certains herbicides dans les cours d'eau [7,180,181]. Ce phénomène concerne essentiellement les herbicides de pré-levée qui sont appliqués directement sur le sol au printemps. Ces herbicides à large spectre, incluant le glyphosate, l'atrazine ou encore le S-métolachlore, sont utilisés pour supprimer les adventices avant la levée des cultures (i.e. émergence des plantules de la plante cultivée). L'application entraîne une concentration importante des herbicides dans la couche supérieure du sol qui est lessivée lors des fortes pluies survenant durant cette période. Les herbicides sont alors entraînés par ruissellement ou par les réseaux de drainage jusque dans les cours d'eaux. Dans l'Orgeval, une rivière du Bassin de la Seine, l'atrazine pouvait ainsi passer, avant son interdiction, d'une concentration inférieure à $0,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ à plus de $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ dans les jours qui suivaient les pluies de printemps (Figure 14) [167]. Des effets similaires sont observés pour le glyphosate ou le 2,4-MCPA [167]. Dans le bassin versant de la Save (région Sud-ouest), caractérisé par une agriculture importante de maïs, blé et tournesol, les concentrations de plusieurs herbicides de pré-levée et de fongicides augmentent fortement à la suite de fortes pluies, dépassant pour certains $1 \mu\text{g.L}^{-1}$ [180,182,183]. Ces pics de concentrations, en raison de leur caractère transitoire, ne sont généralement pas pris en compte dans les suivis de la qualité de l'eau [7]. L'augmentation importante de ces concentrations sur plusieurs jours est pourtant susceptible d'avoir des effets toxiques sur les organismes aquatiques, dont les poissons [7,181,184].

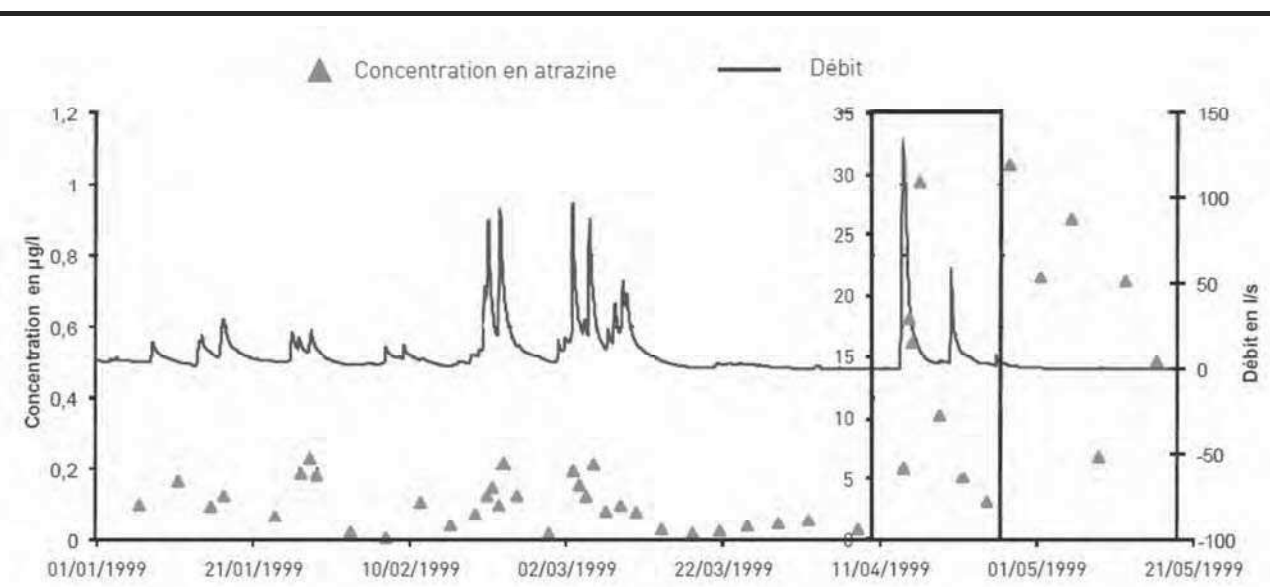


Figure 14. Concentration de l'atrazine et débit de l'eau en sortie d'un réseau de drainage sur l'Orgeval (Bassin de la Seine, 77).

2.2.4. Effets des pesticides sur les écosystèmes et communautés aquatiques

Du fait de leur importante dispersion dans l'environnement, les pesticides sont susceptibles d'entrer en contact avec de nombreuses espèces non-cibles. Il est important de noter que si les pesticides sont « ciblés » pour agir sur un groupe précis d'organismes vivants (i.e. végétaux, insectes, champignons...), ils ne sont en fait jamais totalement spécifiques de ces espèces. Ils agissent chimiquement sur les fonctions vitales ou la reproduction de ces organismes, notamment *via* la perturbation de la signalisation nerveuse ou hormonale, la respiration cellulaire, la division cellulaire ou la synthèse de protéines ou lipides [163]. Or, du fait de leur origine commune, tous les organismes vivants partagent des processus métaboliques, cellulaires et physiologiques en partie communs. Des perturbations de la reproduction des oiseaux [185], une diminution des populations d'amphibiens [186] et de l'état de santé des poissons [187] ou encore le développement de pathologies cancéreuses ou neurologiques chez l'homme [163,188] ont ainsi été identifiés comme des conséquences probables de l'exposition à des pesticides.

Les études réalisées sur des modèles d'écosystèmes aquatiques (i.e. micro ou mésocosmes) comprenant plusieurs groupes taxonomiques et niveaux trophiques permettent d'étudier la réponse des communautés aquatiques à des expositions aux pesticides. Relyae (2005 [189]) a ainsi testé l'effet d'insecticides et d'herbicides à des concentrations environnementales sur des mésocosmes contenant des algues et 25 espèces d'animaux incluant du zooplancton (i.e. cladocères et copépodes), des insectes (i.e. demoiselles et libellules), des gastéropodes (i.e. escargots) et des têtards de différentes espèces de grenouilles et de crapauds. Les résultats montrent une diminution de la richesse spécifique pouvant atteindre 30% sous l'effet des insecticides et des herbicides. Si les insecticides affectent essentiellement le zooplancton et les insectes, les herbicides montrent des effets importants sur les populations d'amphibiens, conduisant à la disparition complète des têtards de certaines espèces. Maltby et al. [190] ont publié en 2009 une étude comparative sur la sensibilité des producteurs primaires (algues et macrophytes), des arthropodes et des poissons exposés seuls ou en mésocosmes à 42 fongicides différents. Les résultats montrent que la sensibilité des différents groupes n'est pas fonction du niveau trophique mais dépend du mode d'action des fongicides. Les végétaux sont ainsi surtout sensibles aux inhibiteurs de synthèse de stérols tandis que les arthropodes et les poissons sont majoritairement impactés par les fongicides à action multi-sites.

Au-delà des effets toxiques directs sur les organismes, ces études ont également montré que les pesticides peuvent impacter indirectement les communautés aquatiques animales. Certains insecticides affectent ainsi de façon positive ou négative certains groupes taxonomiques en diminuant les ressources alimentaires pour certaines espèces et en modifiant les pressions de prédation et de compétition pour les ressources alimentaires [191–193]. Les herbicides vont également avoir des effets indirects sur les

communautés aquatiques *via* la diminution de la biomasse des plantes aquatiques, qui entraîne à son tour une diminution de l'oxygénation de l'eau et une augmentation du niveau de dioxyde de carbone, la modification des taux d'ammoniac et de phosphore, l'apparition de blooms algaux et la destruction d'habitat [194]. Ces effets sur les ressources et la qualité physico-chimique du milieu sont susceptibles d'impacter l'ensemble des organismes aquatiques et par conséquent le fonctionnement de l'écosystème [195]. La diminution de la biomasse végétale et du phytoplancton affecte également la ressource alimentaire des consommateurs primaires, impactant ainsi en cascade sur l'ensemble de la chaîne trophique aquatique à des concentrations souvent bien inférieures à celles entraînant un effet direct [196]. De manière similaire, les fongicides impactent les communautés de champignons aquatiques (i.e. hyphomycètes) qui jouent un rôle clé dans la dégradation de la litière végétale (i.e. feuilles mortes, morceaux de bois, graines et fleurs venant du couvert végétal environnant) et son appétence pour les macro-invertébrés [197]. La dégradation de la litière végétale est un processus critique à l'échelle écosystémique dans les cours d'eau forestiers dans la mesure où ceux-ci sont largement tributaires de la ressource en carbone fournie par les débris végétaux [198].

Les pesticides sont donc susceptibles d'impacter indirectement les populations de poissons sauvages. Une étude de de Noyelles et al. (1989 [199,200]) a ainsi montré que la destruction des macrophytes dans des bassins traités à l'atrazine entraînait une diminution de 50 à 80% de la biomasse de crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*), un poisson de la famille des Centrarchidés. Cet effet est lié (1) à la diminution des macro-invertébrés associés à ces macrophytes et proies des crapets et (2) à l'augmentation de la prédation des juvéniles de crapet par les adultes en l'absence de protection fournie par les plantes.

En effets directs, les pesticides peuvent affecter la survie, la reproduction ou la croissance des vertébrés aquatiques [10,196,201]. Chez les poissons, ils peuvent induire de la neurotoxicité, des dommages oxydants, de la génotoxicité, perturber l'olfaction et le système immunitaire et altérer l'intégrité des organes [7,196,202,203]. La toxicité des herbicides et fongicides à des concentrations environnementales sur les vertébrés aquatiques est toutefois largement controversée [5,6,200,204].

2.3. EFFETS DIRECTS DES HERBICIDES ET FONGICIDES SUR LES POISSONS

Les effets des insecticides sur les poissons sont relativement bien documentés, et leur toxicité fait l'objet d'un large consensus dans la communauté scientifique. En revanche, la toxicité pour les vertébrés aquatiques des herbicides et fongicides, qui constituent la grande majorité des pesticides détectés dans les eaux de surface en France, fait encore aujourd'hui l'objet d'un débat. Deux reviews, parues en 2013 et 2014, sur les effets des herbicides en général [5] et de l'atrazine en particulier [6] sur les poissons et amphibiens relèvent de nombreux manques et faiblesses dans les études portant sur l'effet des

herbicides. Ces faiblesses incluent l'utilisation de concentrations non représentatives des contaminations environnementales, l'absence de relation dose-réponse, le manque de transparence des résultats, des faiblesses dans le design expérimental, les résultats contradictoires entre études ou encore l'absence de marqueurs d'effet à l'échelle de l'organisme entier (i.e. sur la reproduction, la croissance ou la survie). Avec une analyse basée sur l'attribution d'un score par jugement d'expert à chaque étude (analyse « Weight-of-Evidence »), les auteurs concluent que les herbicides ne présentent pas de toxicité avérée sur les poissons et les amphibiens aux concentrations présentes dans l'environnement. A l'inverse, une méta-analyse réalisée par Rohr et McCoy (2010 [205]) sur les effets de l'atrazine sur les amphibiens et les poissons aboutit à la conclusion inverse. De plus, une étude de Hayes et al. publiée en 2006 sur plusieurs espèces d'amphibiens exposées à un mélange d'herbicides et fongicides à des concentrations environnementales montre des effets importants sur la croissance, le développement, la métamorphose et l'immunité [10]. L'auteur conclut que le manque d'étude sur la toxicité des cocktails d'herbicides et fongicides conduits probablement à une sous-estimation importante du risque de ces contaminants pour la faune sauvage [10].

2.3.1. Aspects neuroendocriniens

2.3.1.1. **Sécrétion de cortisol et induction d'une réponse générale de stress**

Comme décrit dans la première partie de ce chapitre, l'exposition des poissons à un stress chimique, physique ou biologique entraîne la production de cortisol. Cette hormone de stress est impliquée dans la mise en place des réponses secondaires et tertiaires au stress et constitue donc un élément fondamental de la réponse adaptative au stress. Quelques études ont mis en évidence une augmentation du cortisol plasmatique chez des poissons exposés à des herbicides (atrazine [206], glyphosate [207] et 2,4D [208]) ainsi qu'à des fongicides (IPBC [209], dithane [210]), indiquant que les poissons subissent un stress physiologique. Chez des saumoneaux atlantiques (*Salmo salar*) exposés pendant sept jours à des concentrations sublétales en atrazine, une augmentation significative du cortisol est observée à partir d'une concentration de $6,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ [206]. Chez le poisson-chat argenté (*Rhamdia quelen*) exposé à $3,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de glyphosate pendant 40 jours, une augmentation du cortisol plasmatique est observée au bout de 20 jours [207]. A l'inverse, plusieurs études n'ont montré aucune augmentation du cortisol chez le sabalo (*Prochilodus lineatus*) exposé pendant 24h à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'atrazine [211] ou pendant 96h à 10 mg.L^{-1} de Roundup® (formulation commerciale du glyphosate) [212]. Ces réponses contradictoires peuvent être en partie expliquées par des différences spécifiques dans la réponse au stress. En effet, plusieurs études ont montré l'absence de réponse du cortisol chez le sabalo exposé à des concentrations importantes de gazole [213] ou de diflubenzuron (i.e. insecticide) [214].

La réponse métabolique des poissons, et notamment la concentration plasmatique en glucose, est également largement utilisée chez les poissons pour évaluer l'induction d'un stress physiologique par un polluant. Quelques études ont cherché à évaluer la réponse métabolique des poissons aux herbicides et fongicides. Une augmentation du glycogène hépatique et une diminution du glycogène musculaire a été montrée chez le poisson-chat argenté exposé pendant 96h à 0,2 mg.L⁻¹ de Roundup® [215] et pendant 12h à 0.5 mg.L⁻¹ de clomazone [216], ainsi que chez le boga (*Leporinus obtusidens*) exposé à 3 mg.L⁻¹ de Roundup® [217]. Des modifications des concentrations tissulaires en glucose et en protéines ont également été montrées dans ces études. Des modifications similaires du métabolisme énergétique sont également observées chez des poissons exposés au 2,4D [218] ou au tébuconazole [219]. Bien que le cortisol plasmatique n'ait pas été dosé dans ces études, les réponses métaboliques observées indiquent vraisemblablement l'induction d'une réponse générale de stress. Toutefois, là encore, des résultats contradictoires sont apportés par d'autres publications. Par exemple, chez le carassin doré (*Carassius auratus*) exposé pendant 96h à 1, 10 ou 100 mg.L⁻¹ de 2,4D, aucun effet sur le métabolisme musculaire des carbohydrates ou des protéines n'a été observé [220].

A quelques exceptions près, la plupart de ces études portent sur des expositions à de fortes concentrations en pesticides, de l'ordre du mg.L⁻¹, non réalistes d'un point de vue environnemental. La disparité des réponses ainsi que leur aspect réversible dans certains cas amènent les auteurs à des conclusions très différentes sur le danger de ces molécules pour les poissons [220,221].

2.3.1.2. Perturbation endocrinienne et conséquences physiologiques

Par ailleurs certains fongicides et herbicides sont suspectés d'être des perturbateurs endocriniens, avec des conséquences sur l'induction de la réponse endocrinienne au stress ou la reproduction.

Plusieurs études ont ainsi montré qu'une exposition à des herbicides affecte la sécrétion de cortisol en réponse à un stress aigu consécutif. Chez des *Prochilodus lineatus* exposés à l'air libre pendant 3 minutes, les poissons pré-exposés à 10 µg.L⁻¹ d'atrazine pendant 24 heures montrent une diminution de la sécrétion de cortisol en réponse au stress aigu par rapport aux poissons non pré-exposés [211]. L'absence de réponse du cortisol à un stress additionnel a également été observé chez le poisson-chat argenté exposé à de l'atrazine [222,223]. Cette inhibition de la réponse endocrinienne au stress pourrait être liée à un effet toxique de l'atrazine sur les cellules interrénales [222,224] ou à une régulation de l'activité de l'axe HHI au niveau de l'hypothalamus ou de l'hypophyse [225]. Un effet inhibiteur de la réponse endocrinienne au stress a également été montré pour le glyphosate [222,226]. En revanche, les herbicides semblent avoir un faible potentiel de perturbateur endocrinien en ce qui concerne les hormones sexuelles, du moins chez les poissons [5,227]. Les effets oestrogéniques ou androgéniques de l'atrazine et du glyphosate ont été évalués chez l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), sans qu'aucun effet ne soit observé [228]. En revanche plusieurs études montrent un effet anti-androgénique du linuron

[229]. Le linuron inhibe notamment les effets stimulants de la testostérone sur le développement des organes reproducteurs des rats mâles [230] et la production de spiggin dans les reins des poissons (i.e. protéine impliquée dans le comportement reproducteur) [231,232].

Les propriétés de perturbation endocrinienne des fongicides inhibiteurs de la synthèse des stérols ont également été montrées dans plusieurs études sur les poissons [223,233–236]. Ces fongicides inhibent la synthèse des stérols *via* l'inactivation d'enzymes déméthylases appartenant à la famille des cytochromes P450 qui sont hautement conservées chez les champignons, les plantes ou les animaux [190]. Chez les poissons comme les mammifères, le cortisol et l'ensemble des hormones stéroïdiennes sont synthétisés à partir du cholestérol sous le contrôle d'enzymes du cytochrome P450. L'inhibition de certaines de ces enzymes a été démontrée dans les cellules humaines exposées au tébuconazole [237] et chez des poissons exposés au fadrozole [235]. Le fadrozole entraîne notamment l'inhibition de la cytochrome P450 aromatase, une enzyme clé impliquée dans la conversion des androgènes en estrogènes [235]. Koakoski et al. (2014) ont ainsi montré qu'une exposition aiguë au tébuconazole chez le poisson-chat argenté entraînait une inhibition chronique de la sécrétion de cortisol [223]. Chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*) exposé à du prochloraz 24h après la fertilisation et pendant 60 jours, une concentration de 202 $\mu\text{g.L}^{-1}$ entraîne une augmentation du nombre de mâles, modifie l'incidence d'intersexes et le stade de maturation des gonades et diminue la concentration de vitellogénine chez les deux sexes [236]. A l'inverse, dans la même étude, des concentrations plus faibles de l'ordre de 16 et 64 $\mu\text{g.L}^{-1}$ augmentent la concentration en vitellogénine chez les mâles. Chez le méné à tête de boule (*Pimephales promelas*) exposé à du fadrozole pendant 21 jours, une diminution dose-dépendante de la fécondité est observée pour des concentrations allant de 2 à 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [235]. Chez les femelles, elle est associée à une diminution dose-dépendante de l'E2 et de la vitellogénine, une diminution de la maturité des oocytes et une augmentation de l'atrésie des follicules préovariens. Chez les mâles exposés, le fadrozole entraîne une augmentation de la concentration plasmatique en testostérone et en 11-kétotestérone, ainsi que l'accumulation de spermatozoïdes dans les gonades.

La perturbation endocrinienne de la synthèse des hormones stéroïdiennes, i.e. cortisol et/ou hormones sexuelles, peut avoir des conséquences importantes sur la fitness et la survie des poissons en affectant des traits physiologiques et comportements liés à l'adaptation au stress et à la reproduction [235].

2.3.2. Effets moléculaires et conséquences cellulaires et tissulaires

2.3.2.1. Induction d'un stress oxydant et conséquences moléculaires

Les pesticides, incluant les herbicides et les fongicides sont des molécules pro-oxydantes dans la mesure où elles engendrent une surproduction de ROS dans les cellules de l'organisme qui y est exposé [60]. Les mécanismes de production des ROS par les pesticides sont variés et dépendent de la molécule, incluant

une perturbation de la chaîne de transfert d'électron et/ou du métabolisme mitochondrial, des cycles redox, le métabolisme intracellulaire des pesticides, la photosensibilisation, l'inhibition des systèmes de défense antioxydants ou encore une activité anticholinergique [60].

Il existe plusieurs moyens de mettre en évidence l'induction d'un stress oxydant sous l'effet d'un stress chimique, incluant la mesure de l'activité des enzymes antioxydantes (e.g. superoxydes dismutases, catalase, glutathion-S-transférase, glutathion réductase, glutathion peroxydase...) ou la concentration des systèmes antioxydants non enzymatiques (e.g. glutathion réduit, acide ascorbique, thiols...). Une réponse de ces systèmes a été montrée chez des poissons exposés à des concentrations sublétales d'atrazine [238–240], de simazine [241], de glyphosate [242–244], de metribuzin [245], de 2,4-D [246], de quinclorac [247] ou encore de tébuconazole [219,248] (Tableau 3). La réponse des systèmes antioxydants dépend de l'organe étudié (e.g. foie, branchies, cerveau...), de l'espèce, du temps d'exposition et de la concentration en pesticide dans l'eau. Le foie est ciblé dans la majorité de ces études, dans la mesure où il joue un rôle important dans la détoxification des polluants, et montre généralement une sensibilité plus grande au stress oxydant induit par les herbicides que les branchies [240] ou le cerveau [244]. Par ailleurs, pour une même espèce, un même contaminant, et un même organe, chaque système de défense présente un pattern de réponse différent, notamment en termes de seuil d'induction de la réponse. Chez le poisson zèbre exposé à de l'atrazine pendant 14 jours, une induction des superoxydes dismutases est observée à partir de $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ tandis que la catalase n'est induite qu'à partir de $1000 \mu\text{g.L}^{-1}$ [238]. De plus, la réponse de ces systèmes de défense présente souvent une relation biphasique avec la concentration en pesticides. Par exemple, chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) exposée pendant 40 jours à de l'atrazine, la catalase augmente en réponse à une concentration de 4,28 et $42,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ puis diminue à une concentration de $428 \mu\text{g.L}^{-1}$ [240]. Une diminution des systèmes de défense par rapport aux poissons témoins indique généralement que les capacités de défenses cellulaires sont dépassées.

Ces études évaluent également les conséquences de ce stress oxydant sur les protéines, les lipides et/ou l'ADN (Tableau 3). Une augmentation de la quantité de malondialdéhydes, un produit de la peroxydation des lipides, a ainsi été montrée chez le poisson zèbre exposé pendant 14 jours à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'atrazine [238] ou pendant 28 jours à $30 \mu\text{g.L}^{-1}$ [239]. Les protéines carbonyles sont également un marqueur de stress oxydant [249,250], une augmentation étant observée notamment chez le carassin doré exposé à 100mg.L^{-1} de 2,4D pendant 96 heures [246] ou chez la carpe commune exposée à $36,23 \mu\text{g.L}^{-1}$ de tébuconazole pendant 7 jours [248]. Les dommages à l'ADN sont généralement évalués par un essai comète qui permet de mesurer les cassures induites par les contaminants sur les brins d'ADN. Cette technique a surtout été utilisée pour évaluer les conséquences du stress oxydant induit par les herbicides à base de glyphosate [243,251]. Chez

des anguilles (*Anguilla anguilla*) soumises à une concentration en Roundup® de 58 µg.L⁻¹, une augmentation des dommages à l'ADN dans le foie et les branchies est ainsi visible dès le premier jour d'exposition [251].

Ces résultats montrent que les herbicides et les fongicides sont susceptibles d'induire un stress oxydant chez les poissons, ciblant essentiellement le foie, et pouvant entraîner des dommages à l'ADN, une peroxydation lipidique et une oxydation des protéines. Toutefois, à l'exception de quelques études sur l'atrazine [238–240] et le glyphosate [251], l'évaluation du stress oxydant induit par les herbicides ou les fongicides sur les poissons portent sur des concentrations fortes non réalistes d'un point de vue environnemental.

2.3.2.2. Génotoxicité et cytotoxicité

Les substances génotoxiques sont des molécules qui compromettent l'intégrité structurelle ou fonctionnelle de l'ADN. La génotoxicité résulte notamment de l'oxydation de l'ADN par les ROS [252], de l'interaction directe entre le polluant et l'ADN [253] et/ou de l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN sous l'effet de l'exposition aux contaminants [254]. Elle peut également être mise en relation avec des effets aux échelles biologiques supérieures incluant des conséquences sur la reproduction, la mortalité des embryons, des anomalies de développement, le développement de cancer et des modifications de la génétique des populations [255,256].

Chez les poissons, plusieurs études ont montré le potentiel génotoxique des herbicides, y compris à des concentrations environnementales, incluant l'atrazine [257–259], des herbicides à base de glyphosate [242,243,254,260–264], le mesotrione [265], le 2,4-D [266], le butachlor [266], le trifluralin [267], ou encore le diuron [268]. Par ailleurs, Guilherme et al. (2014 [269]) ont cherché à évaluer les capacités de réparation de l'ADN chez l'anguille européenne après une exposition courte de 3 jours à du Roundup® et du Garlon®. La persistance des dommages à l'ADN après une période de récupération de 14 jours indique que les capacités de réparation de l'ADN chez cette espèce ne sont pas suffisantes pour permettre une restauration complète de l'intégrité de l'ADN. Le génotoxicité induite par les herbicides sur les poissons peut par conséquent entraîner une déstabilisation à long terme du génome, augmentant les risques de carcinogenèse ou de troubles de la reproduction [269].

Très peu d'études ont en revanche cherché à évaluer le potentiel génotoxique des fongicides sur les poissons [268,270]. Si des dommages à l'ADN ont été observés chez des mollusques aquatiques [271], des squamates (i.e. reptiles à écailles), des poissons [268,270] ou des cellules bovines [272] et humaines [273], le potentiel génotoxique des fongicides reste encore largement controversé [272].

Tableau 3. Réponse des systèmes antioxydants et marqueurs d'effets moléculaires de stress oxydant chez des poissons exposés aux herbicides et fongicides.

Abréviations : H : herbicide, F : fongicides, SODs : superoxydes dismutases, CAT : catalase, GST : glutathion-S-transférase, GR : glutathion reductase, GPx : glutathion peroxydase, GSH : glutathion réduit, MDA : malondialdéhyde, TBARS : substances réactives à l'acide thiobarbiturique, ROS : espèces réactives de l'oxygène ; n.d : données absentes.

molécule espèces	modalité d'exposition	organe	système antioxydant	marqueurs d'effets moléculaires	référence
Atrazine (H) <i>Danio rerio</i>	14 jours	foie	↑ SODs à partir de 100 µg.L ⁻¹	peroxydation lipidique (MDA) ↑ à partir de 100 µg.L ⁻¹	Jin et al. 2010 [238]
	1, 10, 100 et 1000 µg.L ⁻¹		↑ CAT à partir de 1000 µg.L ⁻¹		
		gonades	↓ GSH à partir de 10 µg.L ⁻¹		
<i>Cyprinus carpio</i>	28 jours	organisme	↑ SODs à 30 µg.L ⁻¹ uniquement	peroxydation lipidique (TBARS) ↑ à partir de 30 µg.L ⁻¹	Blahova et al. 2013 [239]
	0,3, 3, 30, et 90 µg.L ⁻¹		↑ GR à 0,3 et 30 µg.L ⁻¹ uniquement		
			↓ GPx à 90 µg.L ⁻¹		
			↓ CAT à toutes les concentrations		
Simazine (H) <i>Cyprinus carpio</i>	40 jours	foie	↑ CAT à partir de 4,28 µg.L ⁻¹ et ↓ à 428 µg.L ⁻¹	peroxydation lipidique (MDA) ↑ à partir de 42,8 µg.L ⁻¹	Xing et al. 2012 [240]
	4,28, 42,8 et 428 µg.L ⁻¹		↑ GPx à 4,28 µg.L ⁻¹ et ↓ à partir de 42,8 µg.L ⁻¹		
			↓ SODs à partir de 42,8 µg.L ⁻¹		
		branchies	↑ CAT à partir de 4,28 µg.L ⁻¹ et ↓ à 428 µg.L ⁻¹		
			↓ GPx à partir de 42,8 µg.L ⁻¹		
		↓ SODs à partir de 42,8 µg.L ⁻¹			
<i>Cyprinus carpio</i>	14, 28 et 60 jours	foie	↑ CAT à 2 et 4 mg.L ⁻¹ pendant 14 jours	surproduction de ROS ↑ ROS à 2 mg.L ⁻¹ pendant 60 jours ↑ ROS à 4 mg.L ⁻¹ pendant 28 jours	Stara et al. 2012 [241]
	0,06 µg.L ⁻¹		puis ↓ à partir de 60 jours		
	2 et 4 mg.L ⁻¹		↓ GPx à 2 mg.L ⁻¹ pendant 28 jours ou 4 mg.L ⁻¹ pendant 14 jours		
		branchies	↑ GSH à 2 et 4 mg.L ⁻¹ à partir de 14 jours		
			puis ↓ à 4 mg.L ⁻¹ à 60 jours		
		pas de réponse	surproduction de ROS pas d'effet		
				peroxydation lipidique (TBARS) pas d'effet	

Glyphosate (H) (formulation commerciale Roundup®)

<i>Anguilla anguilla</i>	foie	↓ SODs à 58 µg.L ⁻¹ pendant 3 jours	dommages à l'ADN (essai comète) ↑ à partir de 58 µg.L ⁻¹ dès le premier jour	Guilherme et al. 2012 [242]
	branchies	↑ CAT à partir de 116 µg.L ⁻¹ pendant 3 jours	dommages à l'ADN (essai comète) ↑ à partir de 58 µg.L ⁻¹ dès le premier jour	
<i>Channa punctatus</i>	branchies	↓ CAT à partir de 3,25 mg.L ⁻¹ dès le 1er jour	dommages à l'ADN (essai comète) ↑ pendant les 14 premiers jours à toutes les concentrations	
	branchies	↓ SODs à 3,25 mg.L ⁻¹ à partir de 7 jours et à 6,51 mg.L ⁻¹ dès le 1er jour		
		↓ GR à 4,07 mg.L ⁻¹ à partir de 21 jours et à 6,51 mg.L ⁻¹ à partir de 14 jour	revient à la normale à partir de 21 jours	
			peroxydation lipidique (TBARS) ↑ à partir de 4,07 mg.L ⁻¹ à partir du 21 jours	Nwani et al. 2013 [243]
	globules rouges	↓ CAT à 4,07 mg.L ⁻¹ à partir de 14 jours et à 6,51 mg.L ⁻¹ dès le 1er jour	dommages à l'ADN (essai comète) ↑ pendant les 14 premiers jours à toutes les concentrations	
		↓ SODs à 3,25 mg.L ⁻¹ à partir de 14 jours et à 6,51 mg.L ⁻¹ dès le 1er jour		
		↓ GR à 4,07 mg.L ⁻¹ à partir de 35 jours et à 6,51 mg.L ⁻¹ à partir de 21 jour	revient à la normale à partir de 21 jours	
<i>Pseudoplatystoma sp</i>	foie	↓ SODs à 2,25 mg.L ⁻¹ uniquement ↓ CAT à partir de 4,25 mg.L ⁻¹ ↑ acide ascorbique à 2,25 et 4,5 mg.L ⁻¹ ↑ thiols à 2,25 mg.L ⁻¹ uniquement	peroxydation lipidique (TBARS) ↑ à partir de 4,07 mg.L ⁻¹ à partir du 21 jours	Sinhorin et al. 2014 [244]
	cerveau	↓ SODs à partir de 4,25 mg.L ⁻¹ ↓ CAT à partir de 4,25 mg.L ⁻¹ ↑ acide ascorbique à 2,25 mg.L ⁻¹ uniquement ↑ thiols à 7,5 mg.L ⁻¹ uniquement	peroxydation lipidique (TBARS) ↑ à 7,5 mg.L ⁻¹ uniquement protéines carbonylées ↑ à 4,5 mg.L ⁻¹ uniquement pas d'effet	
Metribuzin (H)	foie	↑ SODs à 35,7 mg.L ⁻¹ uniquement	protéines carbonylées ↓ à toutes les concentrations	Maksymiv et al. 2015 [245]
<i>Carassius auratus</i>	formulation commerciale Sencor	↑ GST à 35,7 et 71,4 mg.L ⁻¹	peroxydation lipidique (peroxydes lipidiques) ↑ à partir de 35,7 mg.L ⁻¹	
	96 heures	↓ GR à toutes les concentrations		
	7,14, 35,7 et 71,4 mg.L ⁻¹	↓ GPx à 35,7 et 71,4 mg.L ⁻¹		
	formulation commerciale Sencor	↓ CAT à partir de 35,7 mg.L ⁻¹	protéines carbonylées ↑ à 35,7 mg.L ⁻¹ uniquement	Husak et al. 2014 [274]
	96 heures	↓ GPx à toutes les concentrations	peroxydation lipidique (peroxydes lipidiques) ↑ à 7,14 mg.L ⁻¹ et ↓ à 71,4 mg.L ⁻¹	
	7,14, 35,7 et 71,4 mg.L ⁻¹	↓ GR à toutes les concentrations		

2,4-D (H)					
<i>Carassius auratus</i>	96 heures	foie	↓ GPx à 100mg.L ⁻¹	protéines carbonylées	↑ à 100 mg.L ⁻¹
	1, 10 et 100 mg.L ⁻¹			peroxydation lipidique (peroxydes lipidiques)	↑ à partir de 10 mg.L ⁻¹
		reins	↓ SODs à 100 mg.L ⁻¹	protéines carbonylées	pas d'effet
		cerveau	↑ CAT à partir de 10 mg.L ⁻¹	peroxydation lipidique (peroxydes lipidiques)	↑ à partir de 1 mg.L ⁻¹
					pas d'effet
Quinclorac (H)					
<i>Cyprinus carpio</i>	7, 30 et 90 jours	foie	↓ CAT à 30 jours	peroxydation lipidique (MDA)	↑ à 7 et 30 jours, nulle à 90 jours
	344,6 µg.L ⁻¹ (initial)		↓ GST à 90 jours	protéines carbonylées	↑ à 30 jours et 90 jours
	pas de renouvellement (concentration égale à 0 µg.L ⁻¹ à partir du 50ème jour)	cerveau	n.d.	peroxydation lipidique (MDA)	↑ à 7 jours, ↓ à 30 jours, nulle à 90 jours
		muscle	n.d.	peroxydation lipidique (MDA)	↑ à 30 jours et 90 jours
					Toni et al. 2013 [247]
Tebuconazole (F)					
<i>Cyprinus carpio</i>	7 jours	foie	CAT et GST : pas de réponse	peroxydation lipidique (MDA)	↑ à partir de 33,47 µg.L ⁻¹
	33,47 et 36,23 µg.L ⁻¹			protéines carbonylées	↑ à 36,23 µg.L ⁻¹ uniquement
		muscle	n.d.	peroxydation lipidique (MDA)	↑ à 33,47 µg.L ⁻¹ uniquement
	96 heures		↓ GST, GSH et ASA à partir de 1,19 mg.L ⁻¹	peroxydation lipidique (MDA)	↑ à partir de 0,59 mg.L ⁻¹
	0,59, 1,19, 1,78 et 2,37 mg.L ⁻¹		↓ CAT à 1,19 mg.L ⁻¹ uniquement		
			↓ SODs à partir de 1,78 mg.L ⁻¹		
					Toni et al. 2011a [248]
					Toni et al. 2011b [219]

Plusieurs études ont également montré que certains herbicides et fongicides sont cytotoxiques (i.e. entraînent la mort cellulaire) chez les vertébrés, notamment *via* l'induction de processus d'apoptose en réponse à des dommages génétiques [257,275–278]. Dans une étude *in vitro* sur des cellules de carpe chinoise (*Ctenopharyngodon idellus*) incubée avec de l'atrazine, une fragmentation de l'ADN et des changements cellulaires sont observés, incluant une condensation du noyau, la modification de la structure des chromatines et la formation de corps apoptotiques [257]. Ces modifications, caractéristiques du processus d'apoptose, sont associées à la production de ROS, la perturbation du potentiel membranaire des mitochondries, l'augmentation de la concentration en Ca^{2+} et la diminution de l'ATP intracellulaire [257]. Des études portant sur des cellules humaines exposées à des herbicides montrent également l'induction de processus d'apoptose associée à une dégradation de l'ADN [276,277]. Toutefois, les dommages à l'ADN n'entraînent pas systématiquement une cytotoxicité. Chez des *Cnesterodon decemmaculatus* (i.e. espèce de poisson endémique d'Amérique du Sud) exposés à des concentrations sublétales d'herbicides à base de glyphosate (i.e. Panzer® et Credit®) pendant 96h, une augmentation des dommages à l'ADN est observée dans les globules rouges sans aucun signe de cytotoxicité [261].

En dehors des dommages à l'ADN, d'autres mécanismes sont susceptibles d'entraîner la mort cellulaire en réponse à une exposition à des herbicides. Le Roundup® induit une nécrose des cellules testiculaires chez le rat, i.e. une réaction inflammatoire conduisant à la rupture de la membrane cellulaire et au relargage des composantes cytoplasmiques dans l'espace extracellulaire [279]. Le 2,4-D induit quant à lui un processus d'apoptose des lymphocytes humains *via* un effet direct sur les mitochondries [280]. Des altérations mitochondriales dans les cellules hépatiques et une nécrose des cellules branchiales sont également observées chez des poissons exposés à du paraquat [281].

L'ensemble de ces études montrent que les herbicides sont susceptibles d'entraîner des effets génotoxiques chez les poissons, notamment *via* l'induction d'un stress oxydant. La persistance et la réversibilité de ces effets sont toutefois encore peu étudiées. Les conséquences du stress oxydant, des dommages directs à l'ADN ou la perturbation du fonctionnement des mitochondries induits par les herbicides et fongicides sur la viabilité cellulaire ont également été très peu étudiés chez les poissons. De plus, ces études portent le plus souvent sur l'exposition directe des cellules et utilisent généralement des concentrations non réalistes.

2.3.2.3. Conséquences sur les tissus et les organes

Le stress oxydant et/ou la perturbation de fonctionnement des mitochondries sont susceptibles de modifier le fonctionnement et le cycle de vie cellulaire, incluant l'induction des processus d'apoptose ou de nécrose [282]. Ces effets cellulaires peuvent à leur tour induire des dommages au niveau des tissus et organes [283]. Là encore, très peu d'études ont cherché à évaluer les effets au niveau tissulaire d'une

exposition à des concentrations environnementale d'herbicides ou de fongicides. Un aperçu des dommages histologiques causés par des herbicides ou fongicides, à des concentrations réalistes ou non, est néanmoins présenté dans le Tableau 4.

Ces effets dépendent de l'espèce, de la concentration et du temps d'exposition. Chez la carpe commune, une exposition à de l'atrazine à des concentrations réalistes pendant 40 jours entraîne des effets histopathologiques dans le foie, les branchies, la rate, les surrénales, le cerveau et les reins [240,284,285]. Ces effets sont plus ou moins réversibles selon l'organe et la concentration en atrazine. Après 20 jours de récupération dans de l'eau non contaminée, les poissons exposés à une dose faible ou moyenne (4,28 et 42,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement) montrent globalement une bonne récupération avec une restauration importante de l'intégrité des tissus. En revanche, à la plus forte dose (428 $\mu\text{g.L}^{-1}$), les dommages persistent après 20 jours de récupération, indiquant une perturbation du fonctionnement de ces organes à long terme. A des concentrations plus élevées de l'ordre du mg.L^{-1} , les herbicides à base de glyphosate [263,286,287], le metribuzin [245,274] et l'alachlore [288] sont également hépatotoxiques et entraînent des changements histopathologiques dans les branchies des poissons. Les dommages hépatiques incluent dans la plupart des études une vacuolisation du cytoplasme, des infiltrations lipidiques, une hypertrophie et une déformation des cellules, une altération du noyau, la présence d'œdèmes intercellulaires ou d'hémorragie ainsi que des points de nécrose [240,245,287,288]. Par ailleurs, les branchies présentent généralement des phénomènes d'hypertrophie et d'hyperplasie des cellules épithéliales, d'atrophie des filaments, une fusion des lamelles, une dégénérescence vasculaire et dans certains cas des points de nécroses [240,286,288,289]. Par ailleurs, le 2,4-D entraîne des modifications histopathologiques de la moelle épinière chez *Poecilia reticulata* [290].

Dans la majorité de ces études, l'analyse des systèmes de défense antioxydants indique l'induction d'un stress oxydant aux concentrations entraînant des dommages histopathologiques. Ces résultats vont dans le sens de dommages histologiques induits par le stress oxydant. Toutefois, à l'exception de quelques études sur l'atrazine [240,284,285,289], les publications portant sur les effets histopathologiques des herbicides et fongicides ne permettent pas de conclure sur la toxicité de ces molécules à des concentrations environnementales.

2.3.3. Effets sur le comportement

La plupart des études sur le comportement des poissons se sont focalisées sur les effets de l'atrazine, ainsi que sur l'activité, la réponse générale au stress et la réponse aux signaux olfactifs.

Tableau 4. Dommages tissulaires induits par les herbicides et les fongicides chez les poissons.

Abréviations : H : herbicide, F : fongicides, LDH : lactate déshydrogénase ; AST : aspartate transaminase ; ALT : alanine transaminase.

molécule espèces	modalité d'exposition	organe	Marqueurs de dommages tissulaires : histopathologiques/biochimiques	référence
Atrazine (H) <i>Cyprinus carpio</i>	40 jours 4,28, 42,8 et 428 $\mu\text{g.L}^{-1}$	foie	Histopathologie : \uparrow des dommages à partir de 4,28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ incluant dégénérescence hydropique vacuolisation et noyau pycnotique infiltration lipidique	Xing et al. 2012a [240]
		branchies	Histopathologie : \uparrow des dommages à partir de 4,28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ incluant hypertrophie épithéliale œdème avec décollement de l'épithélium lamellaire nécrose générale	
		rate	Histopathologie : \uparrow des dommages à partir de 4,28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ incluant perte de globules rouges dans le sinus et hémolyse dans la rate élargissement de la moelle splénique	Wang et al. 2013 [284]
		surrénales	Histopathologie : \uparrow des dommages à partir de 4,28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ incluant fibrose	
<i>Prochilodus lineatus</i>	48 heures et 14 jours 2, 10 et 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$	cerveau	Histopathologie : \uparrow des dommages à partir de 42,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ incluant perte de cellules granulaires dans l'hippocampe réduction des corps de Nissl dégénérescence des cellules de Purkinje	Xing et al. 2012b [285]
		reins	Histopathologie : \uparrow des dommages à partir de 42,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ incluant dilatation des cellules épithéliales tubulaires nécrose de l'épithélium tubulaire	
		branchies	Histopathologie : dommages modérés à 25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pendant 14 jours hypertrophie et hyperplasie des filaments et lamelles fusion partielle des lamelles rupture de l'épithélium	

Atrazine (suite) <i>Rhombia quelen</i>	96 heures 2, 10 et 100 µg.L ⁻¹	foie	Histopathologie à toutes les concentrations incluant Infiltration de leucocytes Vacuolisation du type stéatose Points de nécroses Histopathologie : effets à partir de 10 µg.L ⁻¹ incluant Modification des microcrêtes des cellules épithéliales Augmentation de la densité des cellules chloridiennes	Mela et al. 2013 [291]
Glyphosate (H) <i>Poecillia reticulata</i>	formulation commerciale Roundup® 24 heures 1,82 mg glyphosate.L ⁻¹	branchies	Histopathologie incluant œdème intercellulaire et hémorragie fusion lamellaire et atrophie des filaments hyperplasie et hypertrophie de l'épithélium inter lamellaire	Rocha et al. 2015 [286]
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	formulation commerciale Roundup® 48 heures 3,0 à 4,5 mg.L ⁻¹	branchies foie	Histopathologie : pas d'effets Histopathologie : dommages modérés à sévères selon la concentration vacuolisation cytoplasmique altération du noyau et des membranes hypertrophie et déformation cellulaire point de nécrose	Shiogiri et al. 2012 [287]
Metribuzin (H) <i>Carassius auratus</i>	formulation commerciale Sencor® 96 heures 7,14, 35,7 et 71,4 mg.L ⁻¹	foie reins	Activité plasmatique de LDH, AST et ALT ↑ LDH et AST à partir de 35,7 mg.L ⁻¹ et ↑ ALT à partir de 7,14 mg.L ⁻¹ Histopathologie : ↑ des dommages à partir de 7,14 mg.L ⁻¹ incluant sinusoïdes dilatés hypertrophie et déformation cellulaire dommages de l'endothélium vasculaire avec hémorragie diffuse Histopathologie : ↑ des dommages à partir de 7,14 mg.L ⁻¹ incluant hémorragie et dégénérescence de l'épithélium tubulaire hypertrophie du tissu hématopoïétique inter-tubulaire nécrose de l'épithélium tubulaire à 71,4 mg.L ⁻¹	Maksymiv et al. 2015 Husak et al. 2014

2,4-D (H)*Poecilia reticulata*72 et 96 heures
15, 30, 45 mg.L⁻¹moelle
épineière**Histopathologie** : ↑ des dommages avec la concentration et le temps d'exposition

formation d'œdèmes

dégénérescence des corps de Nissl

noyau pycnotique

vacuolisation

Uyanikgil et al. 2009

Alachlor (H)*Channa punctatus*48 heures
1,21 mg.L⁻¹

branchies

Histopathologie incluant

nécrose

dégénérescence vasculaire

fusion et atrophie des lamelles secondaires

foie

Histopathologie incluant

dégénérescence cytoplasmique

atrophie

formation de vacuoles

rupture des vaisseaux sanguins

rein

Histopathologie incluant

nécrose

dilatation tubulaire

hypertrophie cellulaire

cytoplasme granuleux

Butchiram et al. 2009

Captan (F)*Oncorhynchus mykiss*96 heures
0,05, à 1,00 mg.L⁻¹

branchies

Histopathologie : lésions modérées à sévères à 0,65mg.L⁻¹
hypertrophie, décollement et nécrose de l'épithélium lamellaire

hyperplasie et fusion des lamelles

reins

Histopathologie : lésions modérées à sévères à 0,65mg.L⁻¹

nécroses tubulaire

dégénérescence tubulaire et des gouttelettes hyalines

Boran et al. 2012

Captan (suite)

foie	Histopathologie : lésions modérées à sévères à 0,65mg.L ⁻¹ dégénérescence du noyau et pycnotisme nécrose des hépatocytes œdèmes intercellulaires
rate	Histopathologie : lésions peu importantes à 0,65mg.L ⁻¹ œdèmes intercellulaires nécrose des cellules spléniques

Des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposées pendant 5 jours à un mélange d'atrazine, de linuron et de métolachlore à des concentrations respectives de 10, 15 et 45 $\mu\text{g.L}^{-1}$ montrent une diminution significative de leur mobilité [292]. L'atrazine est d'ailleurs classée dans la catégorie des substances entraînant un syndrome d'hypoactivité [293]. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette diminution de l'activité. La première est une diminution de la capacité locomotrice liée à des dommages épithéliaux au niveau des branchies, pouvant entraîner une diminution de la capacité d'absorption d'oxygène. Des dommages histologiques sur les branchies des poissons ont été montrés pour l'atrazine à concentrations inférieures à 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ [240,289,294–296], ainsi que pour d'autres herbicides tels que le glyphosate [297,298]. La diminution de l'activité chez les poissons exposés peut également être liée à une modification de la capacité métabolique aérobie des individus sous l'effet du stress [145]. Toutefois ces réponses ne présentent pas de relation monotonique avec la concentration en atrazine et varient entre les espèces [5,205]. Des larves de *Sciaenops ocellatus* exposées pendant 96h à 40 ou 80 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'atrazine montrent ainsi une augmentation de la vitesse de nage et une hyperactivité [299].

D'autres comportements sont également affectés par les herbicides. Chez le carassin doré, une exposition à une concentration d'atrazine de 0,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pendant 24 heures entraîne une augmentation des réactions de démarrage rapide [300]. Ces réactions sont fréquentes chez les poissons soumis à un stress et font partie de la phase d'alarme (le syndrome d'adaptation général, Chapitre 1.1). Des réactions d'évitement ont également été observées chez des poissons exposés au 2,4-D ou au glyphosate, mais à des concentrations supérieures à la LC_{50} pour ces composés (voir la review de Solomon et al. 2013 [5] et les références citées). De même, chez le poisson zèbre exposé à un fongicide, le pyrimethanil, une réaction d'évitement dose-dépendante est observée pour des concentrations supérieures au mg.L^{-1} [301].

Chez le carassin doré, une exposition à 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'atrazine ou de diuron augmente la respiration en surface, diminue le comportement de regroupement des poissons et perturbe leur orientation en réponse à un signal d'alarme olfactif [300]. Selon ces auteurs, l'augmentation de la respiration en surface peut être liée à une perturbation des capacités du système respiratoire. Les modifications du comportement social et de l'orientation en réponse à un signal d'alarme peuvent quant à elles être attribuées à un effet direct de ces herbicides sur les capacités olfactives des poissons. Les effets des pesticides sur les capacités olfactives des poissons ont été largement étudiés dans la mesure où la perception chimique influe sur le comportement social des poissons, l'évitement des prédateurs et la recherche de nourriture [5,203]. Un faible nombre de ces études ont été réalisées sur les herbicides [5]. Une diminution de la réponse olfactive a ainsi été mise en évidence chez la truite arc-en-ciel exposée à 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ d'atrazine ou 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de Roundup® pendant 30 minutes [302]. Certains fongicides présentent également une toxicité olfactive chez les poissons. L'IPBC (3-iodo-2-propynyl butyl carbamate) à 1,28 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pendant 30 minutes entraîne une diminution de la réponse olfactive de 50% chez le saumon

argenté (*Oncorhynchus kisutch*) tandis que le mancozeb nécessite une concentration de $2,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ pour obtenir le même résultat [303].

Les effets des fongicides et de la plupart des herbicides sur le comportement des poissons restent largement inexplorés. Parmi les herbicides, si quelques études montrent un effet significatif de l'atrazine à des concentrations environnementales sur le comportement des poissons, les mécanismes expliquant l'absence de relation dose-réponse monotonique sont également inconnus. De plus, les conséquences de ces perturbations comportementales sur la survie, la croissance ou la reproduction des poissons n'ont pas été évaluées [5].

2.3.4. Effets sur la survie, la croissance, la reproduction et le développement

Les concentrations en herbicides ou fongicides entraînant une mortalité importante des poissons (i.e. LC_{50}) sont largement supérieures aux concentrations environnementales, et aucune étude ne présente des résultats consistants allant dans le sens d'un effet direct de ces polluants sur la survie des poissons [5,205]. Toutefois, des effets significatifs sont observés sur la croissance, le développement et la reproduction des poissons, bien que les études se soient presque uniquement focalisées sur les effets de l'atrazine.

Chez les larves de *Sciaenops ocellatus* exposées pendant 96h à 40 ou $80 \mu\text{g.L}^{-1}$ d'atrazine, une diminution significative du taux de croissance est observée, associée à une augmentation importante du métabolisme basal [299]. L'augmentation de la demande énergétique entraîne une augmentation de la dégradation des protéines pour produire de l'énergie, résultant en une diminution du taux de croissance [304]. Cette diminution est susceptible, selon les auteurs, de prolonger la période larvaire et par conséquent de diminuer la population de juvéniles de 24% [299].

Un autre effet important de l'atrazine concerne la smoltification des saumons. La smoltification est un ensemble de modifications physiologiques, comportementales et développementales qui accompagnent la migration des saumons des écosystèmes aquatiques vers le milieu marin. Si une exposition de 7 jours à des concentrations environnementales d'atrazine de 2 à $22 \mu\text{g.L}^{-1}$ n'a pas d'effets sur l'osmorégulation ou la survie des jeunes saumons atlantiques (*Salmo salar*), elle augmente significativement le taux de mortalité quand ils sont transférés dans de l'eau de mer [206]. Les survivants présentent également une augmentation importante du taux de cortisol plasmatique et de l'osmolarité. Toutefois, d'autres études présentent des résultats contraires [305,306].

Les études sur les effets des herbicides sur la reproduction des poissons sont rares [5,205]. Les concentrations en oryzalin, en prometon, en glyphosate ou en 2,4-D nécessaires pour induire des effets sur la concentration des hormones sexuelles, de la vitellogénine ou sur la production d'œufs sont largement supérieures aux concentrations rencontrées dans les milieux aquatiques (voir la review de

Solomon et al. 2013 [5] et les références citées). Toutefois, dans une étude de Harayashiki et al. (2013 [307]) des guppys mâles (*Poecilia vivipara*) exposés pendant 96 heures à 130 ou 700 µg.L⁻¹ de Roundup® montrent une diminution de la qualité spermatique liée à une diminution de l'intégrité des membranes, du fonctionnement des mitochondries, de l'intégrité de l'ADN, de la mobilité et de la concentration des cellules spermatiques. Plusieurs études ont également cherché à évaluer les effets de l'atrazine sur le sex-ratio, la concentration en hormones sexuelles, le développement des gonades, la fertilisation, le nombre d'œufs ou la survie des embryons, sans effets significatifs (voir la review de Solomon et al. 2013 [5] et les références citées). Ces résultats sont cohérents avec le faible potentiel de perturbation endocrinienne déterminé pour les herbicides [5]. En revanche, les fongicides qui inhibent l'aromatase perturbent la production des hormones sexuelles avec des conséquences sur le succès reproducteur des poissons [235,308]. Des études suggèrent également que la perturbation de la stéroïdogénèse entraîne des effets délétères chez les populations sauvages de poissons, incluant une diminution de la concentration en hormones sexuelles, un retard de la maturation des gonades et des altérations histopathologiques des gonades [309,310].

2.3.5. Conclusion sur les effets directs

Les études sur les effets directs des herbicides et des fongicides sur les poissons sont relativement rares si l'on compare à d'autres polluants comme les insecticides ou les métaux lourds. Des concentrations toxiques (i.e. LC₅₀) élevées impliquent un effet direct minime de ces polluants sur la survie des populations sauvages de poissons exposés à des concentrations environnementales [5]. Toutefois, quelques études montrent des effets à des concentrations réalistes sur des traits physiologiques et comportementaux liés à la reproduction, à la réponse au stress et au maintien de l'intégrité structurelle et fonctionnelle des organes. Ces études sont essentiellement ciblées sur quelques molécules phares comme l'atrazine ou les herbicides à base de glyphosate [5,6,204,205]. Les effets potentiels d'un grand nombre d'herbicides et fongicides restent ainsi largement inexplorés, ainsi que les effets des mélanges complexes de pesticides auxquels les poissons sont confrontés dans les milieux naturels.

2.4. LES MELANGES COMPLEXES DE PESTICIDES : UN ENJEU EN ECOTOXICOLOGIE

Dans le rapport d'information du Sénat réalisé en 2012 dans le cadre de la mission commune d'information sur « les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement » [170], les rapporteurs estiment que « *Sans aller plus loin, apparaît, dès ce stade, une lacune majeure : personne n'est véritablement en charge de l'évaluation de l'ensemble des risques résultant de la fabrication et de l'utilisation des pesticides dans toute sa complexité (mélanges, combinaisons, cocktails de produits...), à*

savoir l'évaluation du danger et du risque des produits pesticides sur la santé humaine dans la vie réelle et non, substance par substance, ou, produit par produit, dans les laboratoires ou les agences. Pour surprenante qu'elle soit, cette affirmation découle de la simple observation de la réalité.[...] Il apparaît donc que, quelles que soient les précautions prises au niveau scientifique, méthodologique ou technique, l'évaluation du risque des pesticides sur la santé humaine exige la mobilisation de moyens considérables bien loin d'être réunis à ce jour.»

Concernant l'évaluation des risques des contaminants pour l'environnement, l'évaluation des effets des mélanges complexes de polluants constituent l'un des grands challenges de l'écotoxicologie [311] (Tableau 5).

2.4.1.1. Généralités sur la toxicité des mélanges de polluants : additivité, synergie et antagonisme

En mélange, les effets toxiques mesurés pour chaque polluant pris individuellement peuvent s'additionner ou non, dans ce dernier cas on parle alors d'interaction. Il existe plusieurs types d'interactions possibles : potentialisation, synergie, antagonisme et action coalitive (Figure 15) [312]. Dans la potentialisation, la synergie ou l'action coalitive (Figure 15B, C et E), l'effet combiné de deux substances chimiques est supérieur aux effets attendus en additionnant les effets individuels. En revanche, dans l'interaction antagoniste (Figure 15D) l'effet combiné des deux stress chimiques est inférieur à la somme des effets individuels.

Tableau 5. Les grands challenges en écotoxicologie.

Tiré de Eggen et al. 2004 [311].

Challenges	Examples
Low concentrations of pollutants and long exposure times (chronic effects)	<ul style="list-style-type: none"> • Endocrine disruption • DNA damage/mutagenesis • Deficiencies in the immune system • Neurological effects
Multiple effects by single pollutants	<ul style="list-style-type: none"> • Multiple target sites and multiple modes of toxic action • Time- and tissue-dependent effects
Complex mixtures of pollutants	<ul style="list-style-type: none"> • Wastewater treatment plant effluents • Field runoff • Pollutants and their degradation products • Complexes of chemical compounds
Multiple stressors	<ul style="list-style-type: none"> • UV and pollutants • Temperature and pollutants • Habitat alterations and pollutants • Pathogens and pollutants
Ecosystem complexity	<ul style="list-style-type: none"> • Variations in species sensitivities • Effect of propagation from organisms to populations and ecosystems • Identification of the stressor-effect relationship

2.4.1.2. Effets des mélanges de cocktails de pesticides sur les poissons

Si l'on considère les études portant sur l'évaluation des cocktails de pesticides toutes molécules et toutes espèces confondues, 90% des études montrent des effets de type additif, que les molécules aient des modes d'action similaires ou différents (Figure 16) [312]. Entre 5 et 9 % des mélanges testés présentent toutefois une interaction synergétique entre les molécules. C'est notamment le cas chez le saumon argenté exposé à des cocktails binaires d'insecticides de la famille des organophosphates et des carbomates [313]. Selon les combinaisons d'insecticides réalisées, des réponses additives ou synergiques sont observées sur l'inhibition de l'activité de l'acétylcholine estérase (AChE), un marqueur

A. Effet additif

Par exemple : $2 + 3 = 5$

Un effet est additif lorsque l'effet combiné d'au moins deux produits chimiques est **égal à la somme des effets** de chaque produit chimique pris individuellement (aucune interaction directe).

B. Potentialisation

Par exemple : $0 + 3 > 3$

La potentialisation survient lorsqu'une substance qui n'a habituellement **pas d'effet toxique** est combinée à un produit chimique, ce qui a pour effet de rendre ce dernier **beaucoup plus toxique**.

C. Synergie

Par exemple : $2 + 3 > 5$

La synergie est un phénomène par lequel plusieurs facteurs ou influences agissant ensemble créent un **effet plus grand que la somme des effets** attendus s'ils avaient opéré indépendamment, ou créent un effet que chacun d'entre eux n'aurait pas créé isolément.

D. Antagonisme

Par exemple: $2 + 3 < 5$

L'antagonisme est le contraire de la synergie. Il survient lorsque l'effet combiné d'au moins deux composés est **moins toxique** que les effets individuels des substances.

E. Action coalitive

Par exemple : $0 + 0 = 4$

L'action coalitive est constatée lorsque chacune des substances prises individuellement ne produit **pas d'effets toxiques**, mais que leur **combinaison est toxique**.

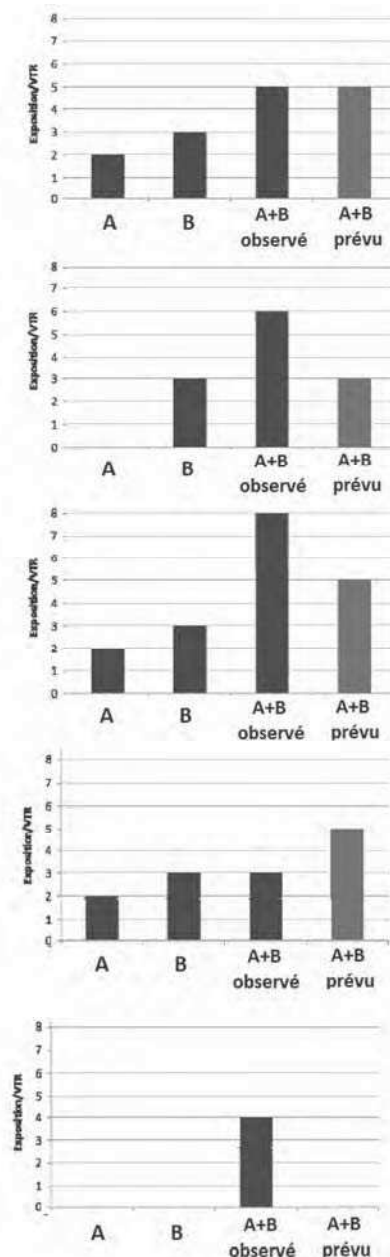


Figure 15. Interactions possibles entre les polluants

Graphiques : barres en bleu : effets observés individuels et combinés de deux molécules chimiques A et B ; en rouge : effet combiné de A et B estimé en additionnant les effets individuels. Tiré de Ribera et al. 2012 [312]

classique de l'exposition aux insecticides. Le degré de synergie augmente avec les concentrations et certaines combinaisons sont létales à des concentrations non-létales pour chaque insecticide pris séparément. Dans une étude de Hayes et al. (2006 [10]), les effets individuels et combinés d'herbicides, de fongicides et d'insecticides à faibles concentrations (0,1 et 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$) sont évalués sur le développement larvaire, la croissance, le système immunitaire, l'induction de cortisol et la différenciation sexuelle de larves d'amphibiens. Les résultats montrent un effet important des mélanges alors même que les molécules considérées individuellement n'ont que peu voire aucun d'effet. L'effet maximal étant atteint avec la combinaison des 9 pesticides, les auteurs concluent que l'évaluation des risques portant sur les pesticides pris individuellement ne permet pas d'estimer réellement la toxicité des mélanges auxquels les organismes sont exposés dans la nature.

En France, rien qu'en ce qui concerne les pesticides, des mélanges de plus de 20 substances dont une grande majorité d'herbicides et de fongicides sont détectés dans certains cours d'eau. La majorité des points de suivi montrent au moins 5 pesticides quantifiés (i.e. au-delà des limites techniques de détection). Malgré cela, très peu d'études ont cherché à évaluer les effets toxiques des cocktails d'herbicides ou de fongicides sur les organismes aquatiques, et *a fortiori* sur les poissons.

En 2011, Polard et al. ont montré que la contamination de l'eau par des herbicides dans les rivières du Sud-ouest de la France, consécutives aux fortes pluies de printemps, a des effets génotoxiques sur le carassin doré [7]. Par ailleurs, Marchand et al. (2006 [8]) ont évalué la réponse moléculaire d'une espèce estuarienne, le flet européen (*Platichthys flesus*), exposée pendant 30 jours à un cocktail d'atrazine, de diuron et d'isoproturon (concentration totale 3,2 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Cette concentration est représentative de la

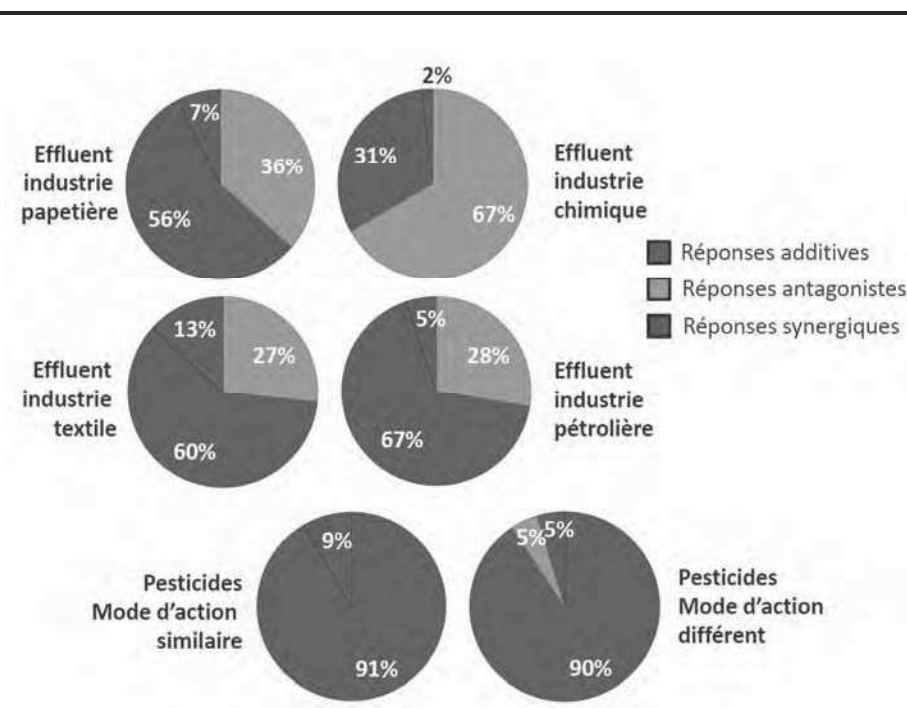


Figure 16. Proportion des différents types d'interaction selon la nature des polluants présents dans le mélange

Tiré de Ribera et al. 2012 [312]

pollution observée durant l'été dans l'estuaire de la Vilaine (Nord-ouest de la France). Le mélange d'herbicides induit des modifications dans l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique cellulaire et mitochondrial, la synthèse d'hémoglobine, la résistance aux pesticides et le cycle de vie cellulaire. Evrard et al. (2010 [9]) ont exposé la même espèce pendant 62 jours à un mélange complexe de glyphosate, AMPA, mecoprop, acétochlore et 2,4-D pour une concentration totale de $4 \mu\text{g.L}^{-1}$. L'analyse de l'expression des gènes indique des perturbations du métabolisme de la méthionine, du métabolisme et du transport des lipides, ainsi que de la réponse immunitaire et inflammatoire. Dans ces deux études, le profil d'expression des gènes est comparé entre le cocktail complexe et un cocktail simple de glyphosate et d'AMPA (i.e. principal produit de dégradation du glyphosate) ayant la même concentration totale. Si certaines réponses sont communes aux deux cocktails, l'expression de gènes impliqués dans l'induction de la réponse inflammatoire uniquement sous l'effet du cocktail complexe suggère un effet plus important de celui-ci [9]. Ces résultats montrent également qu'un cocktail d'herbicides à des concentrations environnementales est susceptible d'avoir des effets importants sur les poissons au niveau moléculaire, mais également au niveau des tissus ou des organes dans la mesure où certains des gènes identifiés peuvent être, avec précautions, utilisés comme marqueurs de dommages tissulaires et de cancérogénèse [8].

D'autres études mettent en évidence les effets délétères de cocktails d'herbicides à des concentrations environnementales sur le système immunitaire et la résistance aux pathogènes des poissons [314] ou encore sur leur comportement social [315].

2.5. CONCLUSION SUR LES PESTICIDES

De manière générale, l'évaluation des risques pour l'environnement et les écosystèmes aquatiques des pesticides ne peut reposer sur les données de toxicité des molécules considérées individuellement. Ainsi, dans une étude de 2008, Schuler et Rand montrent que si le risque individuel estimé des herbicides pour les écosystèmes aquatiques est faible, le risque estimé pour les mélanges de ces herbicides est en revanche élevé [316].

Par ailleurs, l'estimation des risques des mélanges à partir des données existantes pour chaque molécule passe souvent par le modèle d'addition des concentrations (CA), surtout lorsque le mode d'action des polluants est similaire. L'utilisation de ce modèle assume l'hypothèse qu'il n'existe pas d'interaction synergétique ou antagoniste entre les molécules. Coors et Frishe (2011 [317]) ont publié une étude exhaustive sur la toxicité sur les organismes aquatiques de formulations commerciales de 66 herbicides et 53 fongicides. Chacune de ces formulations comprend au moins deux substances actives ayant ou non le même mode d'action. Pour chaque formulation commerciale, les effets individuels et combinés des substances actives sont mesurés chez les plantes, les crustacés (i.e. daphnies) et les

poissons. Les effets combinés observés sont ensuite comparés à la toxicité prédite par le modèle d'addition des concentrations. Concernant les poissons, la toxicité aiguë et chronique prédite est sous-estimée par rapport à la toxicité réelle dans 19,2 et 50 % respectivement des formulations de fongicides, et 26,2 % et 50,0 % respectivement des formulations d'herbicides. Dans 13 % des formulations d'herbicides, la toxicité aiguë prédite est inférieure d'un facteur 100 à la toxicité observée. Ces résultats suggèrent des interactions synergétiques entre les substances concernées et/ou l'action synergétique des adjuvants présents dans les formulations. Les mécanismes pouvant expliquer une potentielle synergie entre les substances actives restent toutefois largement inexplorés.

Les herbicides et, dans une moindre mesure, les fongicides représentent le plus gros contingent de pesticides quantifiés dans les rivières françaises. Les concentrations observées sont relativement faibles par rapport à d'autres pays en Europe ou à l'échelle mondiale. Malgré cela, des effets significatifs de cocktails d'herbicides représentatifs de ces contaminations sont observés aux échelles moléculaires, physiologiques et comportementales chez les poissons exposés *in vivo*. Les études sur la toxicité des herbicides et fongicides sur les poissons sont toutefois relativement rares, portent en grande majorité sur les effets individuelles de quelques molécules phares, et utilisent le plus souvent des concentrations non réalistes.

Dans la mesure où la réponse de stress est nécessaire aux organismes pour s'adapter aux changements de leur environnement et impacte leur survie et leur fitness, la compréhension des effets des herbicides et fongicides sur la réponse de stress (i.e. activation et/ou inhibition) constitue une priorité [5]. Par ailleurs, le manque de données sur les effets de ces molécules à des concentrations environnementales et en mélange conduit potentiellement à sous-estimer leur importance [10]. La mise en place d'études sur les cocktails d'herbicides et fongicides à des concentrations réalistes est par conséquent impératif afin d'évaluer le risque de ces molécules pour les écosystèmes aquatiques [5,10].

RESUME

La France est le 1^{er} pays européen en termes de surface agricole et le 4^{ème} pays mondial en termes de consommation de pesticides. Si l'utilisation des pesticides à l'hectare est relativement faible par rapport à d'autres pays, une contamination chronique des eaux de surface est reportée chaque année par les agences de surveillance de l'eau.

Cette contamination est surtout le fait des herbicides et fongicides, qui sont généralement considérés comme faiblement toxiques pour les vertébrés aquatiques.

Les études sur la toxicité de ces molécules sur les poissons se focalisent essentiellement sur les **effets individuels à forte concentration** de quelques substances phares comme les herbicides à base de Roundup ou l'atrazine. Ces effets varient selon la molécule, le temps d'exposition, la concentration et l'espèce. Ils incluent :

- Une perturbation endocrinienne de la sécrétion de cortisol en réponse à un stress consécutif et/ou de la production des hormones sexuelles ;
- L'induction d'un stress oxydant avec des conséquences sur les composantes cellulaires (protéines, lipides et ADN) ;
- Un potentiel génotoxique et/ou cytotoxique ;
- Des dommages histopathologiques sur le foie, les branchies, les reins ou le cerveau ;
- Des modifications comportementales.

Les conséquences de ces perturbations sur la survie et la fitness des poissons sont peu étudiées et présentent souvent des réponses contradictoires. **En conséquence de quoi le risque estimé des herbicides et fongicides pour les poissons est jugé comme faible voire nul aux concentrations environnementales.**

Un petit nombre d'études sur **les effets de mélanges** suggèrent toutefois que les herbicides sont susceptibles d'induire chez les poissons des **perturbations moléculaires, physiologiques et comportementales à des concentrations environnementales.**

L'évaluation de la toxicité des mélanges complexes de polluants constitue une priorité en écotoxicologie, et à fortiori dans le cas des cocktails d'herbicides et de fongicides détectés dans les écosystèmes aquatiques.

3. LA TEMPERATURE

Chez les organismes ectothermes, la température de l'eau influence de façon importante de nombreux processus biochimiques, métaboliques et physiologiques, faisant de la température le « facteur abiotique maître » influençant la croissance, la reproduction et le comportement des poissons [119,145]. La répartition biogéographique des espèces de poissons est liée en grande partie aux exigences de chaque espèce en termes de température et d'oxygène. En réponse aux variations naturelles ou anthropiques de la température, les poissons initient une réponse adaptative au stress thermique qui inclut un grand nombre de modifications biochimiques, physiologiques et comportementales. Les causes naturelles et anthropiques de variations de la température dans les systèmes aquatiques ainsi que les principes généraux de la tolérance thermique et de la réponse adaptative des poissons à la température sont présentés ici.

3.1. SOURCES DE VARIATIONS THERMIQUES DANS LES ECOSYSTEMES AQUATIQUES

3.1.1. Variations de température d'origine naturelle

Le régime thermique des écosystèmes aquatiques est influencé par un grand nombre de facteurs [318]. Les facteurs climatiques incluent les variations de la température de l'air, les précipitations, l'évaporation, la vitesse du vent et le rayonnement solaire. A l'échelle locale, la température des eaux de surface est influencée par l'origine de l'eau (i.e. surface ou souterraine), la végétation (i.e. ombrage), la topographie (i.e. ombrage, profondeur, orientation, géologie, latitude/altitude) et l'hydrologie (débits, turbulences, volume...). Ces facteurs vont influencer directement le milieu aquatique *via* des modifications spatio-temporelles de la température moyenne, de l'amplitude thermique et de la cinétique/durée des variations de température (Figure 17). Bien que d'origine naturelle, les variations journalières et saisonnières de la température de l'eau peuvent entraîner un stress thermique chez les espèces aquatiques vivant dans ces cours d'eau (Figure 18) et nécessiter la mise en place de stratégies adaptatives comportementales et physiologiques.

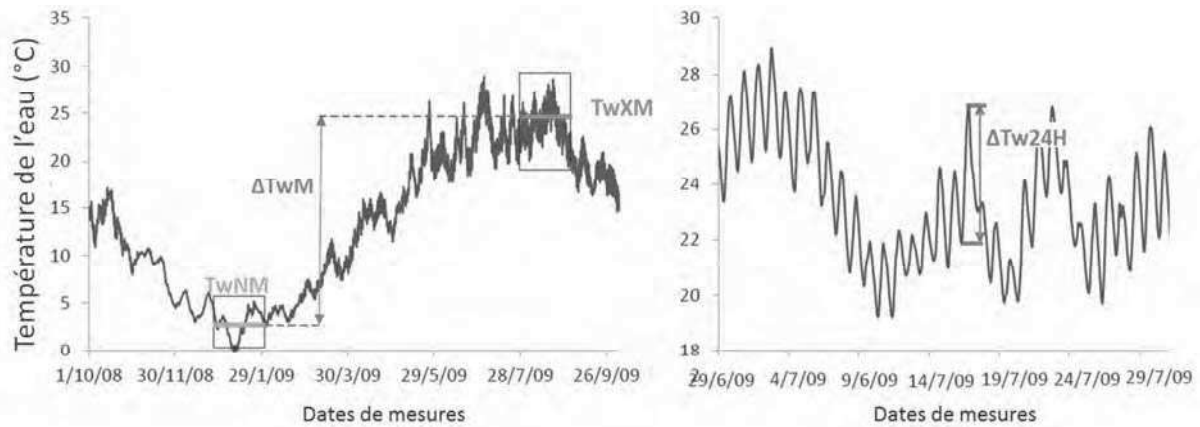


Figure 17. Variations journalières et saisonnières de la température et amplitudes thermiques.

Mesure de la température de l'eau sur la Loire en 2008 et 2009. TwNM : température minimale moyenne sur l'année. TwXM : température maximale moyenne observée au cours de l'année. ΔTwM : amplitude thermique annuelle (TwXM-TwNM). $\Delta Tw24H$: amplitude thermique journalière. Tiré de Beaufort (2015 [513]).

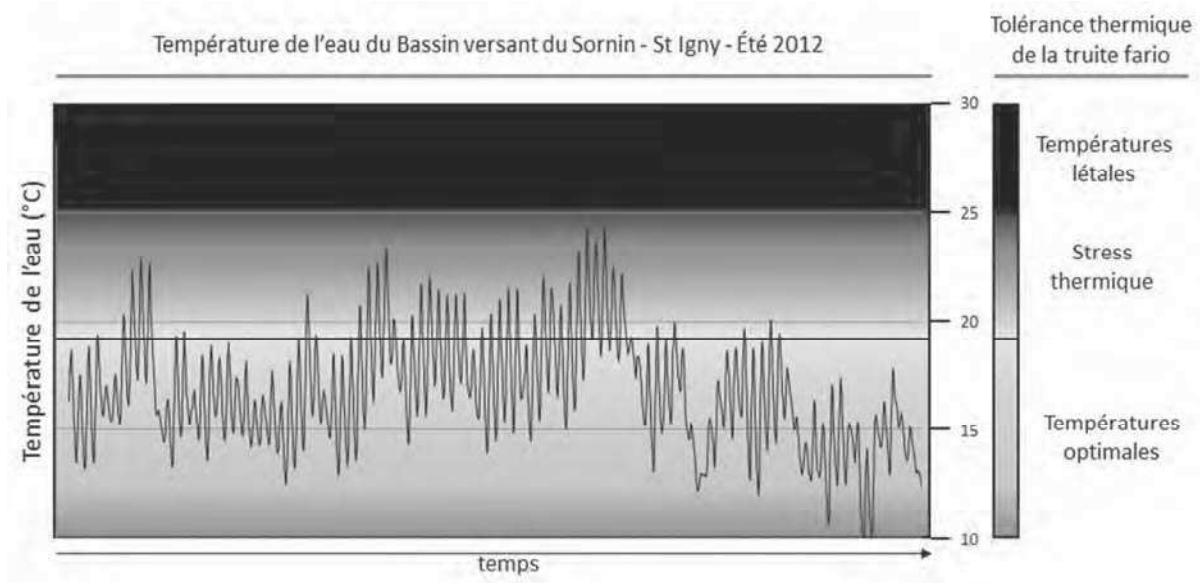
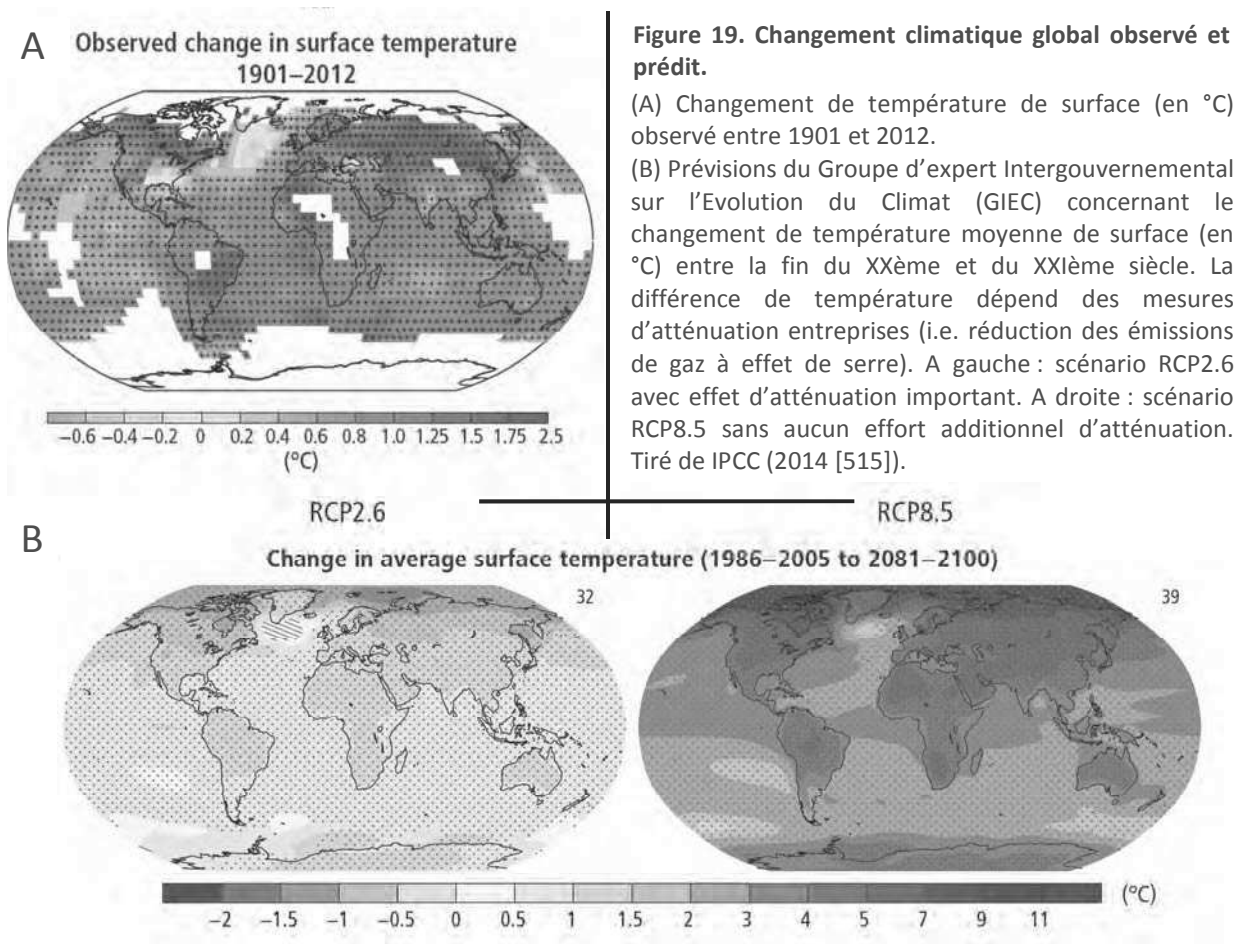


Figure 18. Températures de l'eau mesurée dans le bassin versant du Sornin (département du Rhône) au cours de l'été 2012 et tolérance thermique de la truite fario.

Températures de l'eau mesurée au cours de l'été 2012 sur un affluent du Sornin (Saint Igny, département du Rhône). Les températures inférieures à 19°C (en bleu) correspondent aux températures optimales pour la truite fario (*Salmo trutta*). Les températures entre 19 et 25°C (en rouge-orange) entraînent un stress thermique tandis que les températures supérieures à 25°C (en noir) sont considérées comme létales pour cette espèce. Adapté de FRPPMA (2013 [514]).

3.1.2. Stress thermiques d'origine anthropique

En plus des facteurs naturels, de nombreuses perturbations anthropiques peuvent modifier le régime thermique des cours d'eau, incluant la déforestation, la réduction ou l'altération du débit (i.e. irrigation, hydroélectricité), les effluents thermiques et les changements climatiques [318,319] (Figure 19). Les rejets d'eaux chauffées ou « effluents thermiques » issus des rejets urbains, des eaux de drainage et des barrages, des effluents de sidérurgie et de refroidissement des centrales électriques sont connus depuis le début du XXème siècle pour causer de véritables « pollutions thermiques » pouvant entraîner des problèmes écologiques [320–322]. Par ailleurs, la température et les changements climatiques sont considérés comme le facteur abiotique le plus important pour la distribution biogéographique, l'abondance et les communautés de poissons marins [323,324]. En milieu aquatique, plusieurs études montrent également un changement des communautés de poissons en réponse aux changements climatiques [325]. Ces perturbations sont liées au fait que la tolérance thermique des espèces correspond globalement aux limites naturelles de variations de température rencontrées dans leur milieu [326,327]. Les changements de température en dehors de ces limites naturelles entraînent par conséquent des modifications de la répartition des espèces et/ou de leur performance [327,328].



3.2. TOLERANCE THERMIQUE DES POISSONS

Les poissons sont en grande majorité des organismes ectothermes ou poïkilothermes, i.e. dont la température interne est régulée par la température ambiante. Leur température corporelle varie donc en fonction de la température de l'eau, elle-même dépendante à plus ou moins courte échéance de la température de l'air, et donc des variations journalières, saisonnières et climatiques de celle-ci. En raison de leur importance, les effets de la température et la tolérance des poissons aux changements de température ont été largement étudiés [23,119,145,329,330].

3.2.1. Températures optimales, critiques et létales

Pour chaque espèce de poissons, il est possible de définir expérimentalement les températures dites optimales, critiques et létales et de déterminer leur fenêtre de tolérance (Figure 20). Beitinger et al. (2000 [330]) ont ainsi compilé les données relatives aux fenêtres de tolérance de plus de 100 espèces de poissons appartenant à 19 familles présentes dans les systèmes aquatiques d'Amérique du Nord. Tissot et Souchon (2010 [331]) ont quant à eux synthétisé les connaissances sur les préférendums thermiques de 19 espèces de poissons d'eau douce d'Europe de l'Ouest.

Toutes espèces confondues, les limites de tolérance des poissons varient de $-1,8^{\circ}\text{C}$ (valeur minimale) à $+45^{\circ}\text{C}$ (valeur maximale) [31] (Figure 20). Pour une même espèce, plusieurs facteurs influencent la tolérance à la température, incluant l'histoire de vie et la génétique [332]. Les températures critiques maximales et minimales sont ainsi corrélées positivement avec la température d'acclimatation [332,333]. Chez le carassin doré (*Carassius auratus*), la température d'acclimatation explique ainsi environ 90% de la variance obtenue en mesurant les températures critiques [333]. Par ailleurs, les températures optimales et les fenêtres de tolérance varient selon le stade de développement des organismes [331].

Traditionnellement, les températures optimales peuvent être définies comme la gamme de températures auxquelles les poissons ne présentent pas de signe de stress, se nourrissent et se comportent normalement [331]. **Les températures critiques** sont définies comme les températures sublétales, proches des températures létales mais permettant la survie des poissons si la température de l'eau revient rapidement dans les limites de tolérance [334]. Les températures critiques maximales entraînent l'apparition de spasmes musculaires, une perte totale d'équilibre et/ou l'ouverture des opercules [330]. Ces effets indiquent une perturbation et une désorganisation générale de l'organisme, empêchant le poisson de fuir la source de stress et conduisant à la mort. Les températures critiques minimales induisent une « narcose froide » inhibant la locomotion des poissons, et par conséquent leur comportement anti-prédateur et leur capacité de fuite de la source de stress. Les températures critiques induisent ainsi une « mort écologique » des individus, dans la mesure où ils ne peuvent plus assurer les

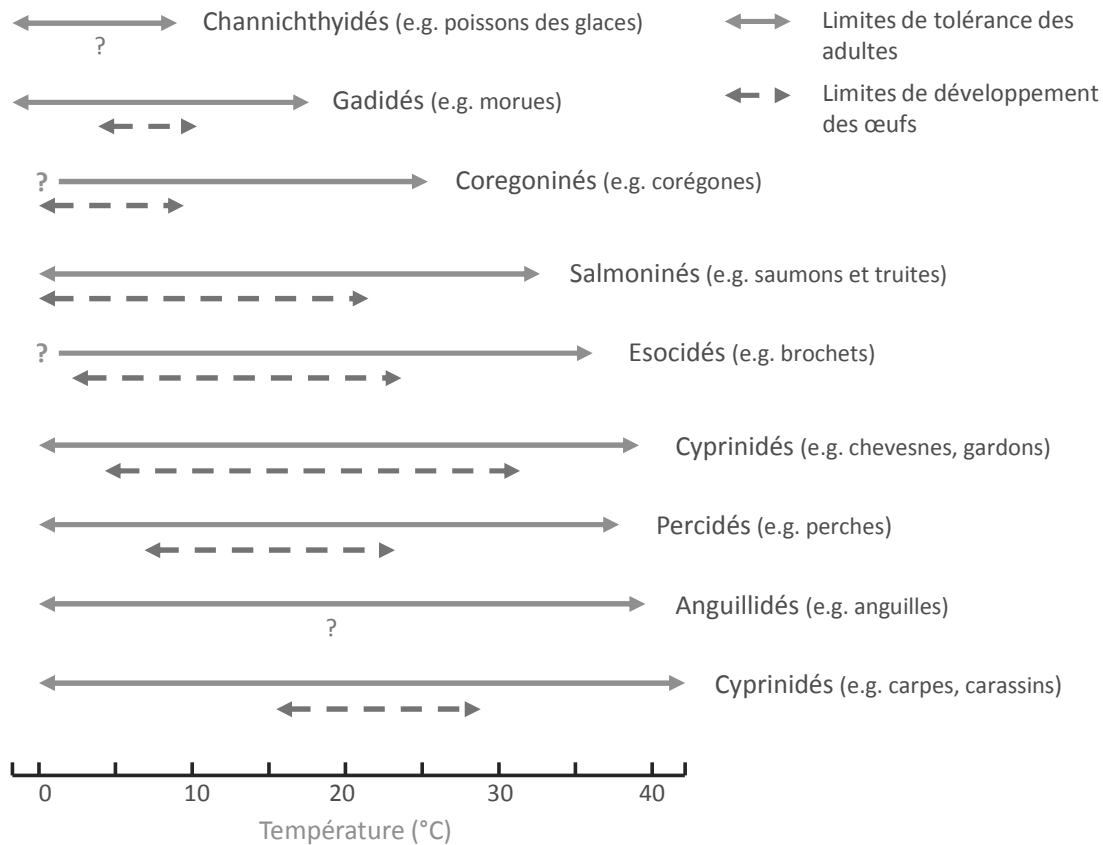


Figure 20. Limites de tolérance thermique de différents groupes de poissons.

Les limites de tolérance sont propres à chaque espèce et dépendent du stade de développement. Sont représentées ici les limites de tolérance minimales et maximales observées pour différents groupes de poissons aquatiques et marins au stade adulte (en bleu) et embryonnaire (en violet). Modifié à partir de Bruslé et Quignard (2004 [31]) avec les données de [330,331,516–518].

comportements permettant leur survie [334]. **Les températures létales** minimales et maximales entraînent la mort physiologique (i.e. arrêt des mouvements respiratoire et absence de réaction au toucher) sans récupération possible même si la température revient vers l'optimum [330].

Ces températures critiques et létales correspondent aux effets d'un stress thermique aigu désorganisant rapidement les processus physiologiques des organismes ectothermes comme les poissons [331]. On parle généralement de TL_{50} , i.e. la température entraînant la mort de 50% des individus qui est mesurée sur 100 minutes, 24 heures ou 96 heures selon les publications [331]. Elles ne prennent donc pas en compte les effets à plus long terme des changements de température, i.e. l'augmentation de la dette en oxygène et la diminution de la capacité métabolique aérobie des individus.

3.3. REPONSE ADAPTATIVE AUX CHANGEMENTS DE TEMPERATURE

Dans la gamme de températures optimales, les processus biochimiques et physiologiques impliqués dans la croissance, la reproduction, la conversion de la nourriture et le métabolisme sont optimaux

[335]. La distribution en oxygène permet de couvrir la demande cellulaire pour le métabolisme basal et la capacité métabolique aérobie de l'organisme augmente (i.e. énergie disponible pour la croissance, la reproduction, l'activité...) [145]. Par conséquent, les températures dites optimales sont les températures pour lesquelles la performance de l'individu est maximale [54].

Lorsque les températures s'éloignent de l'optimum, des perturbations moléculaires au niveau des protéines, des lipides et des acides nucléiques apparaissent. Ces perturbations sont susceptibles d'altérer le fonctionnement cellulaire et physiologique de l'organisme, et pour finir d'entraîner sa mort [336]. Les changements thermiques entraînent également une augmentation de la demande cellulaire en oxygène et la production d'espèces réactives de l'oxygène, pouvant conduire à des phénomènes d'hypoxie cellulaire et de stress oxydant. Les capacités d'acclimatation et de défense des espèces déterminent leur gamme de tolérance à la température. Les mécanismes permettant cette acclimatation aux changements saisonniers ou climatiques de température ont été largement étudiés mais restent encore aujourd'hui en partie mal compris [94].

3.3.1. Aspects moléculaires de l'acclimatation à la température

Les changements de températures ont des effets importants sur les protéines, les membranes cellulaires et les acides nucléiques [336]. Les organismes ectothermes ont un certain nombre de mécanismes permettant de protéger et de stabiliser ces molécules. En revanche, lorsque les changements de températures sont trop importants ou trop rapides, la balance entre stabilisation et déstabilisation des molécules et structures cellulaires est perturbée, entraînant des dommages et pour finir la mort des organismes [336].

La température affecte les protéines de deux manières : (1) en modifiant l'activité des enzymes et (2) en perturbant la structure tridimensionnelle des protéines. Chez les espèces qui ne sont pas adaptées à des eaux froides, une diminution des températures peut entraîner une diminution de l'activité enzymatique induisant un ralentissement de l'activité motrice, nerveuse, trophique et respiratoire ainsi que des fonctions métaboliques (contractions cardiaques par exemple) [31]. L'augmentation de la température entraîne en revanche une augmentation de l'activité enzymatique, sauf dans certains cas spécifiques, et accélère ainsi la plupart des réactions biochimiques cellulaires [31]. Afin de permettre le maintien du fonctionnement cellulaire quelle que soit la température, plusieurs mécanismes de compensation existent dont la production de formes enzymatiques adaptées à la température. Chez les espèces arctiques, des formes enzymatiques plus actives à basse température sont synthétisées, permettant dans une certaine mesure une sorte de « compensation thermique » avec un métabolisme aérobie actif aux faibles températures [31,336]. Certaines possèdent également des mécanismes de tolérance au froid incluant un système « antigél » composé notamment de peptides, de glycoprotéines et/ou de

glycérol permettant aux cellules de ne pas geler même à des températures négatives. Les changements de température entraînent également des substitutions d'acides aminés permettant de maintenir le fonctionnement et la stabilité des protéines, incluant le maintien des fonctions de liaison à un ligand (e.g. fixation et relargage de l'oxygène par l'hémoglobine) ou à un substrat pour les enzymes [336]. Enfin, l'augmentation de la température induit la synthèse de molécules chaperonnes, comme les protéines de choc thermique (i.e. les HSPs), qui protègent les autres protéines. Toutefois, l'augmentation de la température à l'extrême de la gamme de tolérance entraîne la dénaturation et par conséquent la perte de fonction des protéines.

Les effets de la température sur les membranes cellulaires ont été étudiés chez de nombreuses espèces (voir les reviews [336,337]). Les membranes sont notamment composées de phospholipides qui jouent un rôle fondamental dans la régulation de l'activité cellulaire en intervenant sur la fluidité membranaire, dont dépendent les échanges transmembranaires, la protection et l'adhérence des cellules ainsi que la communication intercellulaire. La fluidité des membranes augmente et diminue parallèlement à la température. Pour compenser ces variations de la fluidité membranaire avec la température, les cellules vont modifier le degré de saturation des phospholipides et la quantité de cholestérol. L'adaptation au froid et la préparation à l'hivernage se traduisent par une augmentation de l'activité des désaturases, enzymes qui induisent une désaturation des phospholipides. L'augmentation en acides gras polyinsaturés (PUFA) qui en résulte augmente la fluidité membranaire et diminue la « microviscosité », améliorant ainsi les échanges transmembranaires. A l'inverse, une adaptation à des températures chaudes se traduit par une diminution de l'activité des désaturases. L'augmentation de la température entraîne donc une augmentation des acides gras saturés dans les membranes et par conséquent une diminution de la fluidité membranaire. L'augmentation de la quantité de cholestérol dans les membranes permet également de diminuer la fluidité des membranes. Ces réponses permettent de maintenir le maintien du fonctionnement des membranes malgré les variations thermiques. Toutefois, aux températures extrêmes, la dénaturation des protéines ou la peroxydation lipidique sous l'effet du stress oxydant induit par la température peuvent entraîner des perturbations importantes de la structure et du fonctionnement de ces membranes. De plus, ce processus prend plusieurs heures et n'est donc possible que si les changements de température sont suffisamment lents.

La température affecte également la structure de l'ADN et des ARNs [338] et modifie l'expression des gènes [48,49,339]. Les variations thermiques perturbent notamment la stabilité de la double hélice de l'ADN et entraînent la formation de structures secondaires dans les molécules d'ARN simple brin. Bien que les mécanismes soient encore débattus, les cellules ont la capacité de moduler finement la stabilité de l'ADN et de conserver une transcription des gènes indépendamment de la température [336]. Les mécanismes proposés incluent la production de protéines chaperonnes de l'ARN empêchant la formation de structures secondaires inappropriées [338], la modification de la composition en bases de

l'ADN et de l'ARN (i.e. augmentation de la proportion de paires G+C plus stables) [336] ou encore la modification thermo-dépendante de l'abondance des protéines impliquées dans l'ouverture de la double hélice de l'ADN [339].

Par ces effets sur les protéines, les membranes et les acides nucléiques, la température affecte en profondeur le fonctionnement et la structure cellulaire. Le changement de l'expression de certains gènes contribue en grande partie à l'adaptation au chaud ou au froid. Les études portant sur les poissons montrent ainsi des modifications de l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress thermique (e.g. protéines de chocs thermiques HSPs), la défense contre le stress oxydant, le métabolisme et la production d'énergie, les fonctions mitochondriales, la croissance et le cycle cellulaire, la maintenance des membranes et du cytosquelette ou encore l'immunité [48,49,339].

3.3.2. Aspects cellulaires et physiologiques : le concept de tolérance thermique limitée par l'oxygène

Plusieurs études comparatives des mécanismes de tolérance inter et intraspécifique ont montré que la diminution de l'oxygène disponible au niveau cellulaire constitue la première cause de l'intolérance à la température, même lorsque la concentration en oxygène dans l'environnement est suffisante [94,327,340]. La balance entre demande et disponibilité en oxygène détermine les limites de tolérance des espèces à la température : c'est le concept de « **tolérance thermique limitée par l'oxygène** » [326,341]. Dans ce concept, validé chez différents groupes tels que les annélides, les crustacés, les mollusques et les poissons [94,95,326–328], le stress thermique apparaît quand il y a inadéquation entre (1) l'augmentation de la demande cellulaire en oxygène et (2) la capacité de distribution de l'oxygène par le système cardio-respiratoire [326,341].

Les variations de température entraînent **une augmentation de la demande cellulaire en oxygène** par le biais de différents mécanismes [94]. L'augmentation de la température entraîne une augmentation de la vitesse des réactions biochimiques impliquées dans le métabolisme et la physiologie des ectothermes. Le corollaire de cet effet est une augmentation de la demande énergétique mais également de la perte de protons par les mitochondries au cours de la phosphorylation oxydative [327]. L'acclimatation au froid nécessite quant à elle une augmentation de la densité des mitochondries pour compenser la diminution de l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique et la production d'ATP [327]. D'autres processus moléculaires et cellulaires interviennent dans l'acclimatation aux températures chaudes ou froides, incluant l'induction de gènes codant pour des enzymes clés du métabolisme énergétique [54,94,327,337] et l'induction de systèmes de défense ayant un coût métabolique important [342]. L'ensemble de ces perturbations entraîne une augmentation de la

consommation cellulaire en oxygène et donc de la demande en oxygène au niveau de l'organisme entier.

Pour compenser l'augmentation de la demande en oxygène, la première ligne de défense mise en place chez les organismes ectothermes est **l'augmentation des capacités cardiaques et respiratoires** [327,343]. Chez la morue de l'Atlantique (*Gadus morhua*), une augmentation de la température de 2 à 16°C entraîne ainsi une augmentation exponentielle de la fréquence cardiaque et une augmentation hyperbolique du flux sanguin [343]. Une augmentation suivi d'un pallier du flux sanguin artériel a également été observé chez la loquette antarctique (*Pachycara brachycephalum*) soumise à une augmentation de la température [344]. Contrairement aux effets observés chez les crustacés [326], la ventilation et la pression partielle en oxygène du système artériel restent en revanche constants jusqu'à la mort des individus [343,345]. Ces résultats suggèrent que la plasticité du système circulatoire joue un rôle important dans l'adaptation des poissons au changement de température mais également dans les limites de tolérance des espèces. A plus long termes, certaines espèces de poissons ont également la possibilité **d'augmenter la surface d'échange branchiale** afin d'augmenter leur capacité d'extraction d'oxygène de l'eau [346,347].

Les possibilités d'adaptation du système cardio-respiratoire à l'augmentation ou la diminution de la température sont toutefois limitées. La fréquence cardiaque et le flux sanguin atteignent un pallier alors que la demande en oxygène continue d'augmenter [341,348]. Le déséquilibre entre distribution et demande entraîne **une dette en oxygène au niveau cellulaire et systémique**. L'apparition d'un phénomène d'hypoxie systémique et cellulaire, alors même que les poissons évoluent dans un milieu en condition normoxique¹⁰, entraîne une diminution de la capacité métabolique aérobie des poissons, et par conséquent de la croissance et de la reproduction [340]. Les températures inférieures et supérieures auxquelles apparaissent ce phénomène d'hypoxie sont qualifiée de **Températures pejus** (Tp, i.e. températures délétères).

Cette hypoxie associée à l'augmentation du métabolisme énergétique mitochondrial entraînent une augmentation de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [94,327]. **L'induction de systèmes de défense** antioxydants (e.g. superoxydes dismutases) par les mitochondries et de protéines de chocs thermiques (i.e. HSPs) par les cellules et/ou les mitochondries permettent de limiter les effets du stress oxydant induit par la température [71,73,327]. Les HSPs protègent également les autres molécules de la dénaturation par la chaleur [71,73,75]. Toutefois, la capacité d'induction de ces systèmes de défense varie entre les espèces. La production d'HSPs n'est en effet possible que chez les espèces soumises à de fortes variations de la température dans leur milieu naturel. Les espèces vivant

¹⁰ Concentration normale du milieu en dioxygène

dans des milieux thermiques relativement stables (e.g. les espèces vivant dans les eaux antarctiques) comme la morue de l'Atlantique ne produisent que très peu d'HSP en réponse à un stress thermique [340]. De plus, la production des systèmes de défense est limitée dans le temps [327], est inhibée aux températures extrêmes [327] et a un coût métabolique important [342]. La tolérance au stress oxydant et la synthèse de protéines de chocs thermiques jouent donc un rôle important dans la tolérance thermique et déterminent en partie les limites de tolérance supérieures et inférieures.

Lorsque les températures continuent à s'éloigner de l'optimum, l'hypoxie devient sévère et le métabolisme énergétique devient essentiellement anaérobique [94,327]. Le passage à l'anaérobiose marque l'atteinte de températures qualifiées de **Températures critiques** (T_c). Le saumon rouge exposé à une augmentation rapide la température présente d'abord une augmentation de la capacité cardiaque puis ensuite une augmentation du lactate plasmatique [349]. Ces résultats indiquent le passage d'un métabolisme aérobie à anaérobie lorsque la compensation cardiaque est insuffisante pour couvrir la demande croissante en oxygène. Le passage à l'anaérobiose s'accompagne d'une disparition de la capacité métabolique aérobie et par conséquent de la croissance, de la reproduction, de l'activité de nage spontanée et du comportement alimentaire [150]. La survie est alors une question de jour ou de semaine selon la tolérance des organismes au jeûne [327].

Les températures critiques sont très proches des **Températures létales** (T_d) [54,327]. A ces températures, la synthèse des systèmes de défense est inhibée et les dommages directs de la température sur les molécules et les structures cellulaires, ou indirects via le stress oxydant, augmentent. De plus, le décalage entre la demande et la disponibilité en oxygène entraîne une diminution de la pression partielle en oxygène dans le système veineux des poissons (P_{vO_2}) et la mort par arrêt cardiaque [343–345,350,351].

Les effets de la température sur les poissons, ainsi que les principaux mécanismes de la réponse adaptative aux variations de températures décrits ci-dessus sont résumés dans la Figure 21.

3.3.3. Conséquences écologiques

Les changements du régime thermique des cours d'eau entraînent des changements dans les communautés aquatiques de poissons et de la dynamique des populations notamment via des effets sur la physiologie, la phénologie ou encore le déplacement des poissons (i.e. recherche des températures optimales) [325,352–354] (Figure 22).

Les poissons sont capables de percevoir des variations de température de l'ordre du centième de degrés Celsius par seconde [355]. Cette perception leur permet de rechercher de façon active les températures les plus proches possibles de leur gamme de températures optimale. Ce comportement est la plus importante technique de « thermorégulation » utilisée par les poissons [31,356,357].

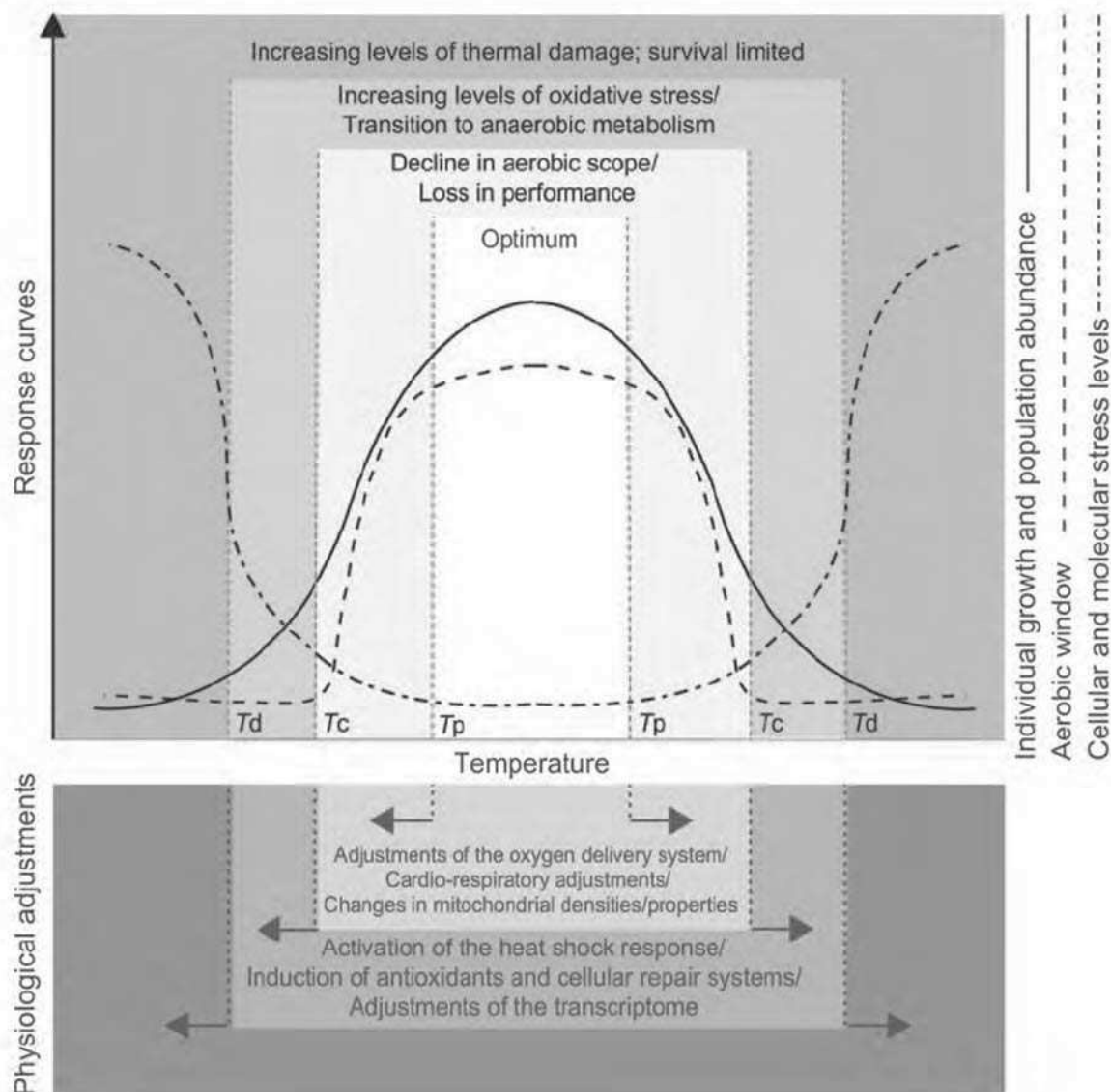


Figure 21. Effets de la température sur la performance des organismes et réponses adaptatives au stress thermique.

Panneau du haut : lorsque la température s'éloigne de l'optimum, la croissance des organismes et l'abondance de la population déclinent (ligne pleine). A partir des températures T_p supérieure et inférieure (T_p pour « pejus temperature », i.e. stress thermique modéré), la performance des individus diminue (ligne en tirets représentant la capacité métabolique aérobie, « aerobic window » ou « aerobic scope »). Entre les T_p et les températures critiques (T_c), la croissance et l'abondance de la population ainsi que la performance des individus diminuent fortement pour atteindre un niveau minimal aux températures létales (T_d). Au niveau moléculaire et cellulaire (ligne en pointillés-tirets), l'organisme subit une modification de la balance cellulaire en oxygène et un stress oxydant à partir des températures T_p et qui augmentent avec l'éloignement de l'optimum. Lorsque le stress est critique (entre T_c et T_d), le métabolisme passe en anaérobiose partielle pour compenser la diminution du métabolisme aérobie. Au-delà, la survie des individus est limitée dans le temps.

Panneau du bas : lorsque le stress est modéré (vert clair), des ajustements physiologiques se mettent en place pour compenser la diminution de l'oxygène cellulaire, incluant des changements des systèmes cardio-respiratoires, de transport de l'oxygène et de la capacité/densité des mitochondries. Lorsque le stress s'intensifie (i.e. entre les températures critiques et délétères, en vert moyen), les systèmes de défense (e.g. heat shock proteins, antioxydants...) et de réparation des dommages sont induits et le transcriptome est ajusté. Au-delà, les capacités défensives et de réparation sont dépassées et les dommages augmentent.

Tiré de Kassahn et al. 2009 [54].

Le préférendum thermique des poissons et les conditions de températures optimales de croissance sont ainsi généralement identiques [31]. Ces préférendums thermiques conditionnent donc en grande partie la répartition géographique (i.e. horizontale) et bathymétrique (i.e. verticale) des différentes espèces [31]. Ils influencent également les routes de migration chez certaines espèces comme l'anguille européenne [355]. Toutefois, la distribution spatiale des espèces et leurs préférences thermiques ne concordent pas toujours [358]. En effet, d'autres facteurs entrent en jeu tels que (1) la disponibilité et/ou l'accessibilité d'une zone de préférence thermique dans l'écosystème, (2) l'effet d'un autre facteur abiotique limitant ou directif (e.g. oxygénation de l'eau) et (3) la compétition intra ou interspécifique pour cette niche [358].

Une augmentation de la température moyenne en hivers est également suspectée de provoquer un avancement de l'éclosion et de l'émergence des larves de truites fario (*Salmo trutta*) [359]. Une étude sur la fonction de nurserie de l'estuaire de la Gironde entre 1991 et 2009 a également montré une augmentation de l'abondance des juvéniles de poissons, toutes espèces confondues, en lien avec les changements de température et de salinité de l'eau au cours du temps [360].

Par ailleurs, la perte de la capacité métabolique aérobie des organismes sous l'effet des changements de température compromet leurs performances et leur fitness [336]. Le changement de régime thermique peut ainsi favoriser des espèces thermophiles comme la perche soleil (*Lepomis gibbosus*) au détriment de poissons moins thermophiles voire psychrophiles [325,352,361]. Il entraîne par conséquent des modifications de la répartition biogéographique des espèces et favorise l'implantation d'espèces invasives [324,325,362].

Les modifications de régimes thermiques ont également des effets indirects sur les poissons, incluant des perturbations de la chaîne alimentaire [318,363], la modification de la compétition et des relations proies/prédateurs [364], ou encore de l'oxygénation de l'eau [31] (Figure 22).

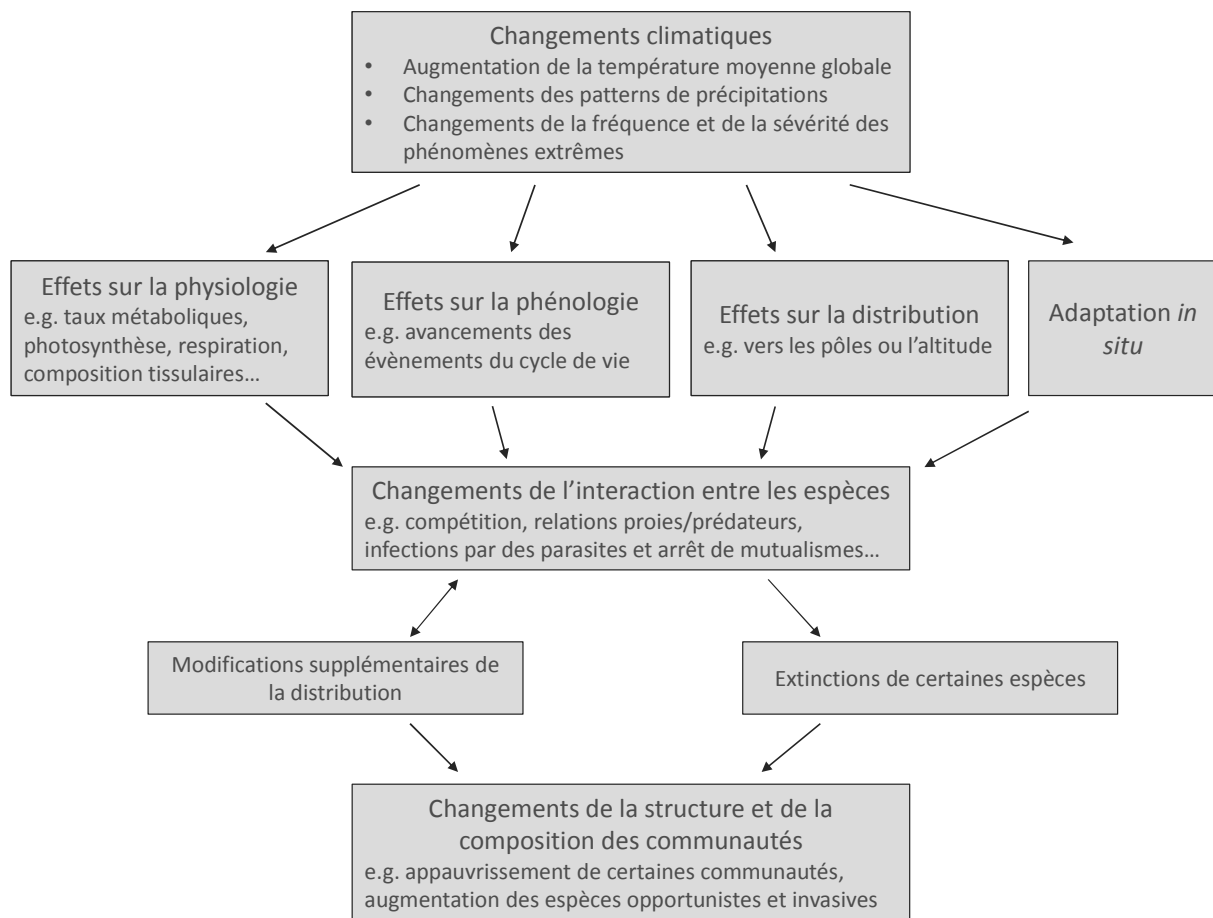


Figure 22. Effets potentiels des changements climatiques sur les communautés.

Adapté de Hughes (2000)

RESUME

La température est le facteur abiotique clé qui influence la croissance, la reproduction et le comportement des organismes ectothermes comme les poissons.

Dans la gamme de température optimale, l'augmentation du métabolisme actif et de la capacité métabolique aérobie permet une performance maximale des organismes se traduisant par une augmentation de l'activité générale et de la croissance, ainsi que le déclenchement de la période de reproduction.

Les changements de température déstabilisent les structures moléculaires et cellulaires, modifient la vitesse des réactions biochimiques, entraînent une augmentation de la demande cellulaire en oxygène et induisent la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Ces perturbations nécessitent la mise en place de compensations à la fois moléculaires, cellulaires, physiologiques et comportementales, incluant :

- au niveau moléculaire : des changements de l'activité des enzymes, de la saturation des lipides membranaires, et de l'expression des gènes ;
- au niveau cellulaire : modifications du métabolisme énergétique cellulaire et mitochondrial, induction de systèmes de défense contre le stress thermique et oxydant ;
- au niveau physiologique : modification de l'activité du système cardio-respiratoire ;
- au niveau comportemental : recherche des zones de températures favorables.

Les capacités d'acclimatation des espèces déterminent en grande partie leur résilience face aux changements thermiques. Lorsque ces changements sont trop importants ou trop rapides, ils entraînent un stress oxydant et une hypoxie cellulaire et systémique. Ces effets conduisent à une diminution de la capacité métabolique aérobie des individus et par conséquent de leur performance.

Aux extrêmes de leur gamme de tolérance thermique, les changements de température entraînent des dommages cellulaires, une disparition de la capacité métabolique aérobie et pour finir la mort des organismes.

En affectant la physiologie, la phénologie et la distribution des organismes ectothermes, les modifications des patterns de températures, notamment dans le contexte de changements climatiques, sont ainsi susceptibles d'engendrer des modifications de la structure et du fonctionnement des communautés aquatiques.

4. LES EFFETS MULTI-STRESS

Bien que les facteurs de stress soient généralement étudiés individuellement, les populations naturelles sont invariablement exposées à plusieurs d'entre eux simultanément. Les facteurs environnementaux naturels et anthropiques peuvent agir en combinaison et induire des effets plus importants que leurs effets individuels considérés séparément. Dans les écosystèmes aquatiques, de nombreux facteurs environnementaux sont susceptibles de modifier l'impact des polluants sur les organismes, incluant la température. C'est pourquoi, dans un contexte de changements globaux, les effets croisés entre la température et les contaminants font l'objet d'une attention grandissante. Cette partie présente un état de l'art des études menées sur les effets combinés de facteurs naturels et des contaminants sur les organismes aquatiques, en mettant l'accent sur les effets croisés entre température et contaminants chez les poissons.

4.1. DES ECOSYSTEMES AQUATIQUES SOUS CONTRAINTES

Les écosystèmes aquatiques sont impactés de bien des manières par les activités anthropiques : altération des habitats par les interventions mécaniques directes et les perturbations du régime hydraulique, dégradation des caractéristiques physico-chimiques de l'eau par des pollutions plus ou moins diffuses ou la transformation des bassins versants et des zones riveraines, changements des communautés par l'introduction/disparition d'espèces sous l'action directe ou indirecte de l'homme, etc. [1]. Les changements globaux, incluant la modification des patterns de précipitation, de la température, de l'acidité ou encore de l'oxygénation des eaux de surface, sont également susceptibles d'engendrer des sources de stress supplémentaires sur les organismes aquatiques et d'amplifier les effets des contraintes préexistantes (Figure 23) [12–14,365]. Les changements climatiques, en altérant les patterns de précipitations et de température ou en accélérant l'érosion des sols peuvent entraîner des modifications des pratiques agricoles et par conséquent l'utilisation des fertilisants et pesticides. Associés aux changements des vents et courants, ils peuvent également modifier leur dispersion dans l'environnement (e.g. aérosols, ozone, particules fines...). Les changements des paramètres physico-chimiques de l'environnement, incluant les changements de température ou d'acidité de l'eau, peuvent modifier les processus de dégradation, de transformation et de transfert entre les différents compartiments (i.e. sol, eau, sédiment, air...) des contaminants. Les changements des conditions environnementales peuvent également agir directement sur les organismes, soit en agissant comme

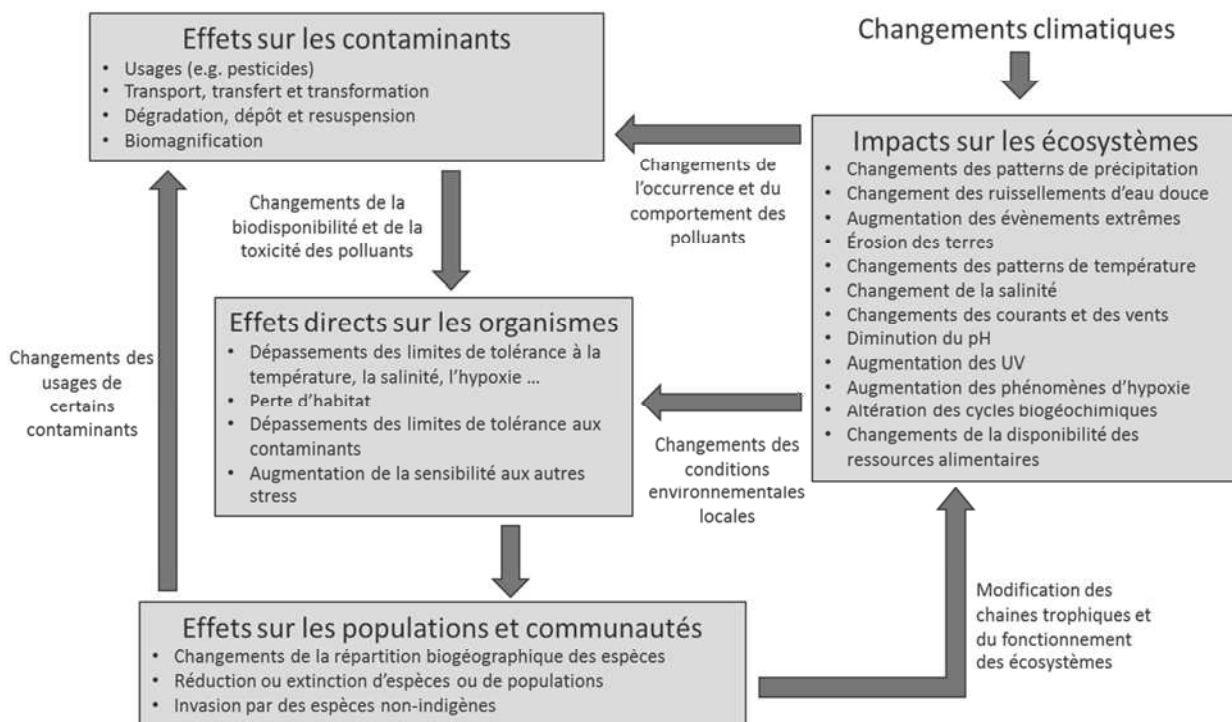


Figure 23. Interactions possibles entre les changements climatiques et les contaminants.

Adapté de Schiedek et al. 2007 [12]

cofacteur de stress soit en modifiant des processus physiologiques et homéostatiques exacerbant ainsi la sensibilité des organismes aux autres stress [12,13,366].

Dans une méta-analyse publiée en 2015, Jackson et al. [367] ont analysé 88 publications relatant les réponses observées chez des organismes aquatiques soumis à deux stress, ces stress pouvant être de nature physique (température, salinité, oxygène ...) ou chimique (contaminants). De façon assez inattendue, leur analyse montre que 41 % des effets combinés sont de type antagoniste, 28 % sont synergétiques, 16 % sont additifs et 15% sont renversés¹¹. Pour les auteurs, la prévalence des effets antagonistes suggère entre autres que l'exposition à un premier facteur de stress induit une réponse adaptative comportementale ou physiologique également efficace pour le second facteur de stress, augmentant par conséquent la tolérance des organismes au stress consécutif. Pour autant, ces effets varient selon l'organisme et/ou le critère étudié et selon la nature des deux stress. Par exemple, si l'on considère uniquement les effets combinés de la température et d'un contaminant sur les vertébrés, l'interaction moyenne est de type additif avec une prédominance d'effets additifs et synergiques dans les réponses observées [367].

¹¹ Pour les auteurs, un effet « renversé » est observé lorsque l'effet combiné des deux facteurs de stress est dans la direction opposée à la somme des effets individuels. Exemple : augmentation de la survie sous l'effet combiné de deux stress qui individuellement entraînent sa diminution.

4.2. EFFETS CROISES DE LA TEMPERATURE ET DES POLLUANTS

Les procédures d'évaluation des risques des contaminants sont réalisées sur des organismes soumis aux substances chimiques dans des conditions expérimentales constantes et favorables. Dans la mesure où des conditions changeantes ou sub-optimales sont fréquentes dans l'environnement naturel, ces risques sont potentiellement sous-estimés [365,366]. Partant de ce constat, un nombre croissant d'études ont cherché à évaluer les effets d'un certain nombre de facteurs environnementaux sur la toxicité des polluants, incluant le pH, la salinité, la température ou encore la disponibilité en nourriture. Ces études ont été reprises dans plusieurs reviews dont celles de Heugens et al. 2001 [366], Schiedek et al. 2007 [12], Noyes et al. 2009 [13], Holmstrup et al. 2010 [14], Laskowski et al. 2010 [365] ou encore Jackson et al. 2015 [367].

La température est un facteur clé environnemental qui affecte la physiologie et le comportement des organismes ectothermes et modifie fortement les effets des autres stress [151,368]. Si les effets des stress thermiques sur les organismes aquatiques sont étudiés depuis plus de 50 ans, l'étude de l'interaction entre stress thermique et stress chimique est plus récente. Dans la majorité de ces études, une augmentation de la température entraîne une augmentation de la toxicité des polluants sur les organismes aquatiques [12–14,365] (Figure 24). Elle peut également modifier les interactions entre les polluants eux-mêmes, de sorte que les effets combinés de l'augmentation de la température et des mélanges de contaminants chimiques sont difficiles à prédire [365]. A l'inverse, plusieurs études montrent qu'une exposition à des polluants est susceptible de diminuer la tolérance thermique des organismes ectothermes, dont les poissons [369–372].

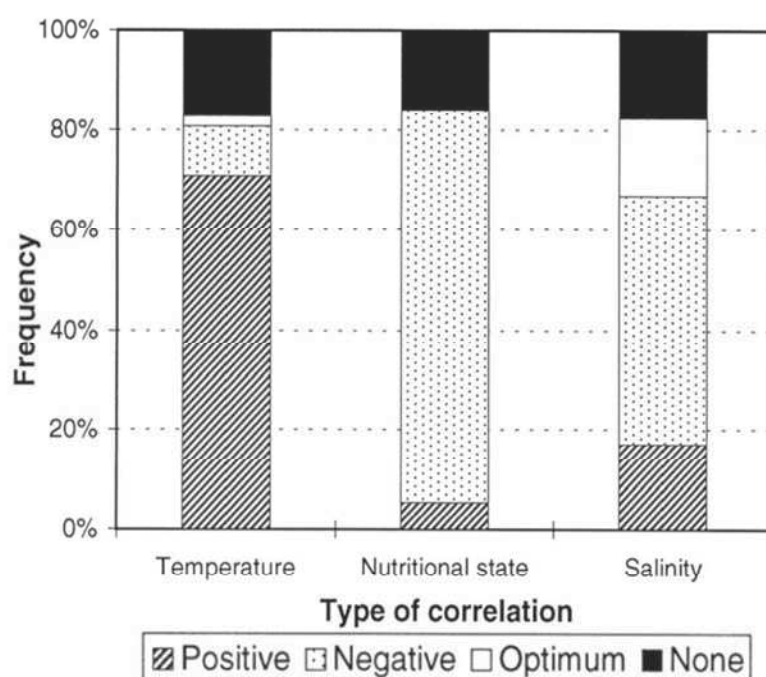


Figure 24. Fréquence des types de corrélations entre la toxicité des polluants sur les organismes aquatiques et les facteurs environnementaux (température, statut nutritionnel et salinité).

Positive : augmentation de la toxicité avec l'augmentation de la valeur du facteur environnemental. *Négative* : diminution de la toxicité. *Optimum* : toxicité est maximale ou minimale à la valeur intermédiaire du facteur environnemental. *None* : le facteur environnemental n'influence pas la toxicité. Nombre d'expériences considérées : température 151, statut nutritionnel 19, salinité 181. Tiré de Heugens et al. 2001 [366]

4.2.1. Effets de la température sur la toxicité des polluants

Chez les organismes ectothermes, l'augmentation de la température entraîne généralement une augmentation de la toxicité des métaux, avec une augmentation de la mortalité chez les organismes aquatiques exposés dans 80% des études recensées par Sokolova et Lannig (2008 [368]). A des concentrations sublétales, l'exposition de tilapias du Nil (*Oreochromis niloticus*) à du cadmium entraîne une diminution plus importante de la croissance des poissons exposés à 32°C qu'à 20, 24 ou 28°C [373]. A l'inverse, des poissons chats juvéniles (*Ictalurus punctatus*) exposés à du cuivre à des températures entre 21 et 27°C pendant deux semaines ont une mortalité inversement proportionnelle à la température, indiquant une diminution de la toxicité du cuivre avec l'augmentation de la température [374].

Comme pour les métaux, la toxicité des pesticides augmente avec la température dans la majorité des cas. Chez des embryons de poisson zèbre (*Danio rerio*) exposés au diazinon, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la mortalité, des œdèmes des sac vitellin et cardiaque et des déformations spinales [375]. Par ailleurs, l'effet combiné de l'augmentation de la température et du malathion entraîne une augmentation de la mortalité du saumon du Pacifique exposé à un pathogène, *Aeromonas salmonicida*. Les effets varient toutefois selon la molécule. Chez l'anguille (*Anguilla anguilla*), la toxicité du lindane est plus importante à 15 et 29°C qu'à la température intermédiaire de 22°C (réponse de type optimale Figure 24), tandis que la toxicité de l'endosulfan est positivement corrélée à la température [376]. Une réponse de type optimale a également été observé chez la carpe exposée à du DDT, de l'aldrin et du lindane, les poissons étant plus sensibles aux pesticides aux faibles et aux fortes températures [377]. Très peu d'études portent sur les effets croisés entre herbicides et température chez les organismes aquatiques. Chez la salamandre (*Ambystoma barbouri*) exposée à de l'atrazine, l'augmentation de la température entraîne une augmentation de la mortalité [21].

4.2.2. Effets des polluants sur la tolérance thermique des organismes aquatiques

Si la température influence la toxicité des substances chimiques, l'exposition à des polluants est également susceptible de diminuer la tolérance thermique des poissons [370,371]. Patra et al. (2007 [371]) ont évalué la limite supérieure de tolérance à la température de quatre espèces de poissons d'eau douce, la perche argentée (*Bidyanus bidyanus*), le poisson arc-en-ciel australien (*Melanotaenia duboulayi*), l'*Hypseleotris klunzingeri*, et la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), exposés à des concentrations sub-léthales d'endosulfan, de chlorpyrifos et de phénol. Pour ces quatre espèces, une exposition de 10 à 14 jours à des concentrations d'endosulfan ou de chlorpyrifos variant entre 0,3 et 5,0 µg.L⁻¹ entraîne une diminution de 2,5 à 4,8°C de la température limite maximale. De même, Paladino et al. (1980 [378] dans [371]) ont montré que des doses sublétales d'arsenic diminuaient la tolérance

thermique du maskinongé (*Esox masquinongy*, espèce américaine de brochet). Des effets similaires ont été observés pour des poissons exposés à des concentrations sublétales de sélénate [379], de cuivre [380], de zinc [381] et de nickel [382]. Une diminution de la tolérance thermique avec l'exposition à des polluants à également était montrée chez des organismes marins dont l'huître [383] et les larves d'oursin [372].

4.3. MECANISMES D'INTERACTION

L'interaction entre la température et les polluants s'explique notamment par des effets sur le comportement des polluants dans l'environnement et leur biodisponibilité pour les organismes vivants, mais également par la modification de la sensibilité des organismes [12,366]. Certains de ces mécanismes sont brièvement présentés ci-dessous :

L'un des mécanismes d'interaction les plus étudiés est **l'augmentation du taux d'absorption avec la température, et donc de la concentration interne en polluants**, notamment dans le cas des métaux (voir la review de Sokolova et Lannig 2008 [368] et les références qui y sont citées). Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer l'augmentation du taux d'absorption des ions métalliques avec l'élévation de la température chez les organismes aquatiques, incluant (1) l'augmentation de la solubilité des métaux avec la température et donc de leur biodisponibilité pour les organismes aquatiques ; (2) l'augmentation de la ventilation et/ou de l'alimentation dues à une augmentation du métabolisme énergétique avec la température ; (3) la modification des voies cellulaires d'absorption active des métaux qui sont thermo-dépendantes ; (4) des dommages tissulaires au niveau des branchies qui entraînent une diminution de l'efficacité d'absorption de l'oxygène et par conséquent une augmentation de la ventilation ; et (5) la modification de la fluidité membranaire avec la température et donc de leur perméabilité aux ions métalliques.

Plusieurs études ont également montré qu'un stress thermique associé à une exposition à des métaux peut entraîner **l'inhibition réciproque des systèmes de défense**. Lapointe et al. (2011 [369]) ont exposé des tête de Boule (*Pimephales promelas*) à du cuivre par voie orale et/ou aqueuse à plusieurs températures. Indépendamment, le cuivre et l'augmentation de la température entraînent la transcription de gènes codant respectivement pour une métallothionéine (*mt-2*) et une protéine de choc thermique (*hsp-70*). Les stress thermique et chimique cumulés entraînent une inhibition de la transcription de ces deux gènes, indiquant que l'augmentation de la température perturbe la réponse au stress chimique et, réciproquement, que l'exposition au cuivre inhibe la réponse au stress thermique. Une réponse similaire a été observée chez des larves d'oursin exposées au cuivre et soumises à un stress thermique [372]. La tolérance aux stress chimiques et thermiques dépend en partie de l'induction de

systèmes de défense. L'inhibition réciproque de ces réponses entraîne par conséquent une augmentation de la sensibilité de ces organismes aux deux stress.

Par ailleurs, l'augmentation de la température et la plupart des polluants entraînent **la production d'espèces réactives de l'oxygène pouvant conduire à un stress oxydant** lorsque les systèmes de défense antioxydants sont dépassés. Si les effets individuels des stress thermiques et chimiques sur l'induction d'un stress oxydant ont été largement étudiés, les effets combinés de ces deux facteurs de stress sur la production de ROS et l'induction des systèmes de défense ont été très peu évalués. Toutefois, une étude de Lannig et al. 2006 [383] montre que le cadmium entraîne un stress oxydant, indiqué par une augmentation de la peroxydation lipidique, chez des huitres exposées à 28°C alors qu'aucun effet n'est visible à 20 ou 24°C. Ce résultat suggère que les systèmes de défense sont surpassés par la production de ROS lorsque l'exposition est associée à une augmentation de la température. Lapointe et al. (2011[369]) ont également montré que chez le têtard de boule exposé au cuivre et à une augmentation de la température, l'activité des enzymes antioxydantes CAT et SODs diminuaient significativement lorsque les deux stress étaient cumulés par rapport aux effets des stress individuels. Cette diminution peut également indiquer une augmentation du stress oxydant lorsque les stress chimique et thermiques sont combinés. Le stress oxydant pouvant engendrer des dommages moléculaires, cellulaires et tissulaires, et par conséquent affecter la performance et la survie des organismes, l'accumulation de ROS sous l'effet des deux stress combinés peut en partie expliquer l'augmentation de la toxicité des polluants avec la température, et, inversement, la diminution de la tolérance thermique avec l'exposition aux contaminants.

Un dernier aspect, et non le moindre, de l'interaction entre polluants et température est **la perturbation du métabolisme énergétique** [151]. La balance énergétique joue un rôle central dans l'acclimatation et la tolérance aux stress environnementaux [150]. De ce point de vue, le métabolisme énergétique peut être considéré comme un aspect clé de l'effet croisé entre la température et des polluants [150,151,368]. Malgré ce constat, les effets croisés de ces deux facteurs de stress sur le métabolisme énergétique ont été peu étudiés [368]. Comme montré dans les parties précédentes, l'exposition à des polluants et l'élévation de la température augmentent, en règle générale, la demande énergétique [26]. D'un point de vue théorique, cette augmentation de la demande énergétique avec la température et l'exposition aux polluants n'est pas un problème tant qu'elle est supportée par des ressources corporelles et/ou alimentaires en nutriments suffisantes, une augmentation de la distribution en oxygène par le système cardio-respiratoire et de la production d'ATP par le métabolisme cellulaire et mitochondrial. Ces mécanismes d'acclimatation ont toutefois leurs limites et plusieurs études montrent une augmentation de la toxicité des polluants avec la température associée à une perturbation de l'un de ces processus (voir la review de Sokolova et Lannig 2008 [368] ainsi que Carvalho et Fernandes 2008 [384], Osterauer et Köhler 2008 [375], Sappal et al. 2015 [92] et Lavergne et al. 2015 [370]).

La diminution de la tolérance aux stress thermiques et chimiques sont les deux faces d'une même pièce, chacun des mécanismes listés ci-dessus pouvant expliquer à la fois l'effet de la température sur la toxicité des polluants et l'effet d'une exposition aux contaminants sur la tolérance thermique des organismes.

4.4. CONCLUSION SUR LES EFFETS CROISES TEMPERATURE-POLLUANTS

L'interaction entre la température et les contaminants affecte fortement la tolérance physiologique des organismes ectothermes, y compris des poissons, aux deux facteurs de stress. Elle est par conséquent susceptible d'affecter la survie des organismes et de modifier profondément la structure et le fonctionnement des communautés dans un contexte de changement climatique et d'augmentation de la pollution des écosystèmes aquatiques [12–14].

Les mécanismes à l'origine de l'interaction entre la température et les polluants sont encore aujourd'hui peu étudiés. Il semble toutefois que les effets croisés sur la demande énergétique, la distribution d'oxygène et le fonctionnement mitochondrial fassent parties des mécanismes prépondérants de l'interaction température/polluants [151,368]. Si l'on considère que la capacité des organismes à mobiliser l'énergie pour supporter le coût métabolique de l'acclimatation détermine leurs limites de tolérance, les facteurs de stress qui entraînent une demande énergétique élevée pour assurer la protection de l'organisme contre le stress, comme les polluants, sont susceptibles de devenir critiques lorsque l'organisme est dans une situation de stress thermique diminuant *de facto* la capacité métabolique [151,368,383]. Inversement, la perturbation du métabolisme énergétique par les polluants peut entraîner une diminution de la tolérance thermique des organismes (Figure 25).

Par ailleurs, les effets croisés de la température et des pesticides, et à fortiori des herbicides et fongicides, sur les poissons ont été très peu étudiés. Toutefois, les herbicides et les fongicides entraînent la production d'espèces réactives de l'oxygène et la synthèse de systèmes de défense antioxydants, induisent et/ou perturbent la réponse endocrinienne de stress et entraînent une modification du métabolisme énergétique (CHAPITRE 1.2.3. p68). On peut donc émettre l'hypothèse d'une action synergique entre ces polluants et l'augmentation de la température.

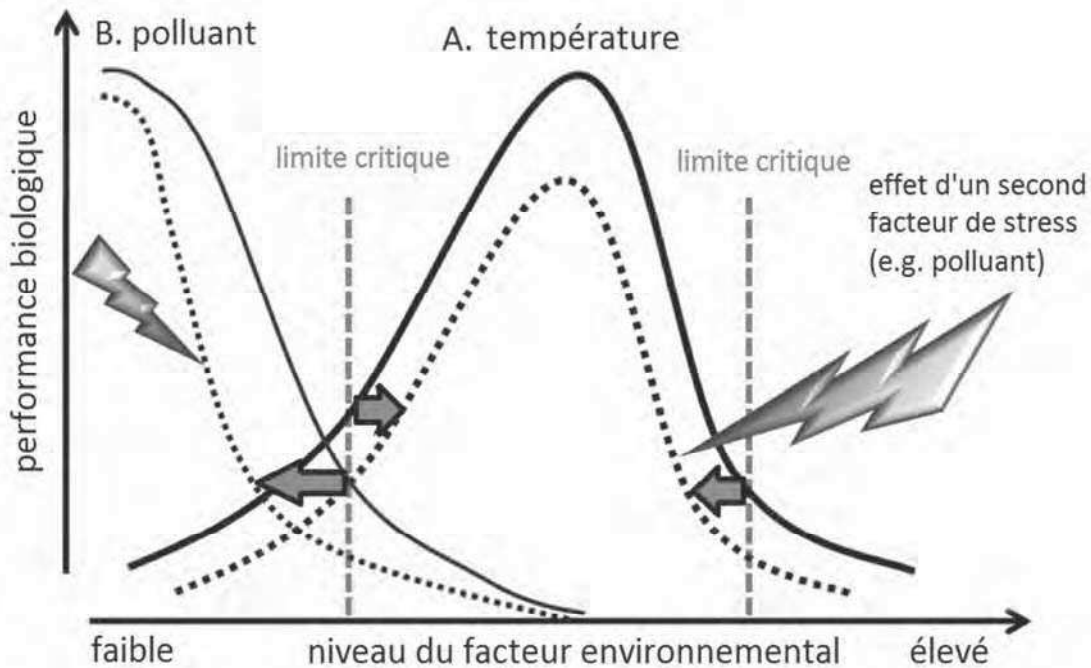


Figure 25. Effets croisés de la température et des polluants sur la performance biologique des organismes et sur la tolérance aux stress.

Lignes pleines : effets des stress individuels sur la performance des organismes. Lignes en pointillés noirs : modification de la performance biologique sous l'effet d'un deuxième facteur de stress. **(A)** la performance des organismes est maximale à l'optimum thermique puis décroît lorsque la température s'éloigne de l'optimum. Aux températures critiques (lignes pointillées rouges), le temps de survie de l'organisme est limité. Lorsque les organismes sont soumis à un deuxième facteur de stress qui augmente la demande énergétique, la capacité métabolique aérobie diminue, entraînant une diminution de la performance biologique des organismes. La gamme de tolérance à la température se restreint et les limites critiques sont atteintes plus rapidement (flèches rouges). **(B)** lorsque la concentration en polluant augmente, la performance biologique des organismes diminue. Si les organismes sont également soumis à un stress thermique augmentant la demande énergétique, la performance des organismes diminue plus rapidement et la limite critique est atteinte à une concentration en polluants plus faible (flèche orange). Adapté de Sokolova et al. 2012 [150].

RESUME

Dans la nature, les organismes aquatiques sont exposés simultanément à de nombreux facteurs de stress, qui peuvent avoir des interactions de type additif, synergiques ou antagoniste sur les espèces.

Les changements climatiques, incluant les changements de température, sont susceptibles d'interagir avec les polluants, en modifiant leur comportement et leur dispersion dans l'environnement, leur biodisponibilité ou encore en augmentant la sensibilité des organismes aux contaminants.

La majorité des études montrent un **effet synergique** chez les organismes aquatiques entre l'augmentation de la température et l'exposition aux polluants, incluant les métaux lourds et les pesticides.

L'augmentation de la température et l'exposition entraînent des changements moléculaires et physiologiques importants qui peuvent interagir et entraîner cet effet de synergie. Ces mécanismes d'interaction incluent :

- Augmentation du taux d'absorption des polluants avec la température (augmentation de la ventilation ou de l'alimentation, dommages branchiaux, modification de la perméabilité membranaire...);
- Augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène qui dépasse les capacités des systèmes de défense antioxydants sous l'effet des stress thermique et chimique combinés ;
- Inhibition réciproque de l'induction des systèmes de défense par la température et les polluants ;
- Augmentation du métabolisme énergétique sous l'effets des deux stress combinés au-delà des capacités de compensation de l'organisme ou perturbation des mécanismes de compensation par l'un des deux stress, entraînant une diminution de la capacité métabolique aérobie et donc des performances biologiques des organismes.

Ces perturbations entraînent une augmentation de la toxicité des polluants avec la température et, inversement, une diminution de la tolérance thermique chez les organismes exposés aux polluants.

Les effets croisés de la température et des pesticides sur les poissons et, à fortiori des herbicides et fongicides, ont été très peu étudiés. Toutefois, ces polluants étant susceptibles d'entraîner un stress oxydant, d'inhiber la réponse de stress et d'augmenter le métabolisme énergétique pour compenser le coût énergétique de l'induction des systèmes de défense et de réparation, il est fort possible que leur toxicité augmente avec la température.

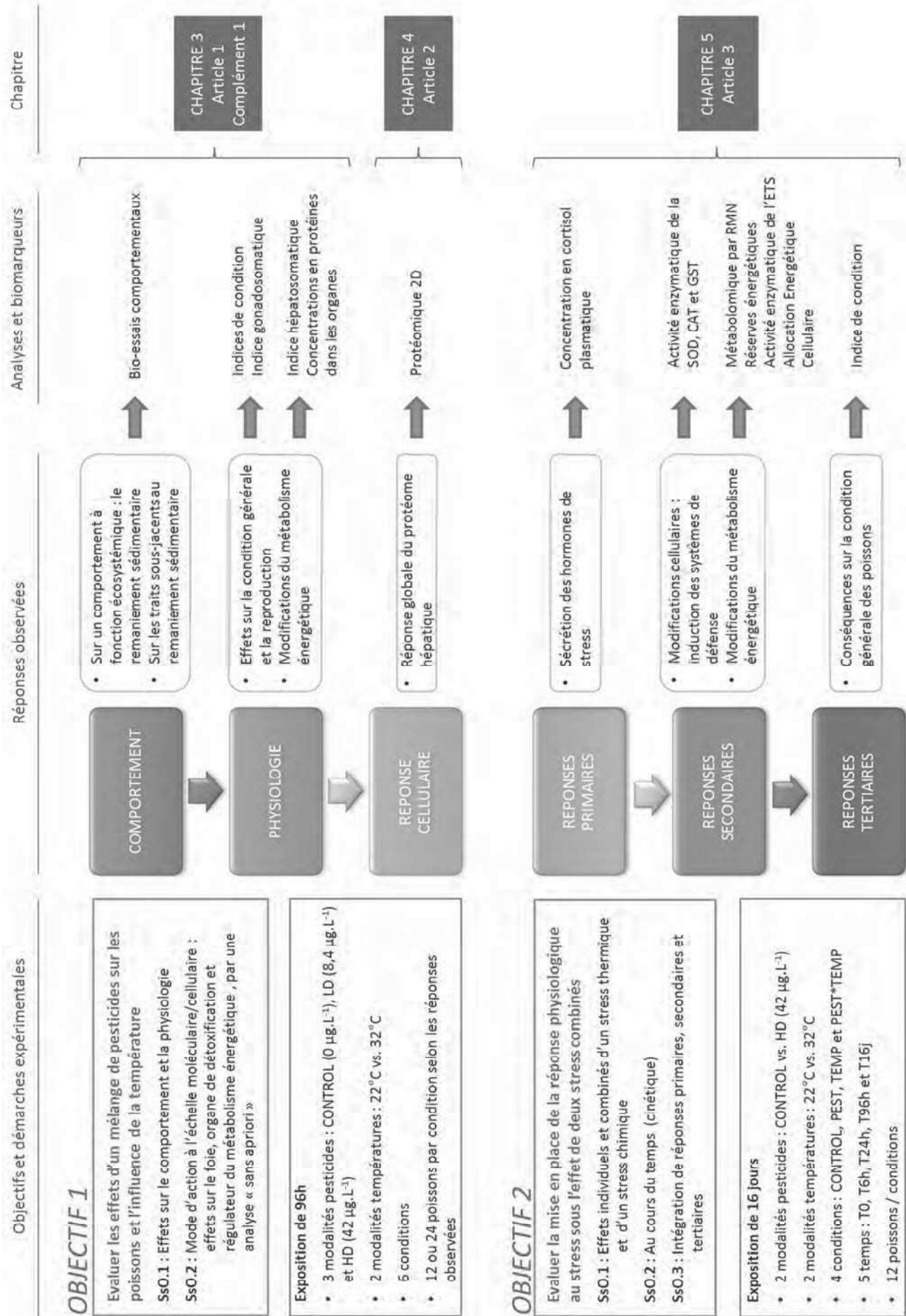


Figure 26. Objectifs de la thèse, démarches expérimentales, réponses observées et organisation du manuscrit.

5. OBJECTIFS DE LA THESE ET STRUCTURE DU MANUSCRIT

Les poissons sont soumis à de nombreux facteurs de stress dans leur environnement naturel. Comme chez tous les organismes vivants, l'exposition des poissons à un stress entraîne une réponse adaptative impliquant des modifications endocriniennes, moléculaires, physiologiques et comportementales nécessaires pour permettre la survie de l'organisme. Toutefois, lorsque cette réponse est perturbée ou mal-adaptée, des effets néfastes sur la croissance, la reproduction ou la résistance aux maladies peuvent apparaître. Parmi ces facteurs de stress, la contamination chronique des cours d'eau est susceptible d'entraîner des effets délétères sur les poissons, affectant leur survie et leurs performances. Parmi ces polluants se trouvent de nombreux herbicides et fongicides utilisés en agriculture. Toutefois, la toxicité de ces polluants sur les poissons reste encore aujourd'hui peu étudiée, les études existantes portant essentiellement sur les effets d'une seule molécule à des concentrations non environnementales. Par conséquent, les effets des herbicides et fongicides sur les poissons sont considérés comme faibles voire inexistantes aux concentrations environnementales. Toutefois, le peu de données existant sur la toxicité des mélanges de molécules observées dans l'environnement suggèrent que ce risque est probablement sous-estimé. De plus, dans un contexte de changements climatiques, les effets croisés sur les organismes aquatiques des polluants et des changements de température font l'objet d'une attention grandissante. La plupart des études montrent en effet une interaction synergique chez les organismes aquatiques entre l'exposition aux contaminants et l'augmentation de la température. Très peu d'études ont cherché à évaluer les effets de la température sur la toxicité des herbicides ou des fongicides sur les poissons.

Les objectifs généraux de ce travail de thèse sont par conséquent d'évaluer les effets sur une espèce modèle, le carassin doré (*Carassius auratus*), d'une contamination par un mélange de pesticides réaliste d'un point de vue environnemental, et d'évaluer l'effet d'une augmentation de la température sur la toxicité de ce mélange.

Pour cela, deux séries d'expériences ont été menées, avec des objectifs et des démarches expérimentales différents (Figure 26) :

Objectif 1 : évaluer les effets à différentes échelles biologiques d'une exposition de 96h à un cocktail d'herbicides et de fongicides à deux températures différentes. Pour évaluer la toxicité du cocktail, des traits comportementaux et physiologiques relatifs à la condition générale, à la reproduction et au

métabolisme énergétique ont été mesurés, associés à une analyse en protéomique pour observer la réponse moléculaire dans le foie des poissons.

Objectif 2 : évaluer la capacité des poissons à mettre en place une réponse adaptative efficace sous l'effet de deux facteurs de stress combinés (chimique vs. thermique), en observant sur une cinétique de 16 jours des réponses impliquées à tous les niveaux de la réponse au stress :

- Réponses primaires : sécrétion d'une hormone de stress, le cortisol, initiatrice et régulatrice de la réponse au stress ;
- Réponses secondaires : modifications cellulaires (induction des systèmes de défense) et métaboliques (métabolome du foie, réserves et consommation énergétiques dans le foie et les muscles, allocation énergétique cellulaire) ;
- Réponses tertiaires : conséquences sur la condition générale des poissons.

Le Chapitre 2 présente les protocoles d'acclimatation et d'exposition des poissons, les différents designs expérimentaux ainsi que les procédures et protocoles d'analyse des différentes réponses observées.

Les Chapitres 3, 4 et 5 présentent les résultats de la thèse sous formes d'articles scientifiques acceptés (Article 1) ou en préparation (Articles 2 et 3). Un complément a été ajouté à la fin du Chapitre 3 afin de présenter des résultats non valorisés sous forme d'article scientifique pour le moment.

Le Chapitre 3 porte sur les **réponses comportementales et physiologiques** du carassin doré exposé pendant 96h au mélange de pesticides à deux températures différentes. L'objectif est d'évaluer les effets croisés des pesticides et de la température sur le comportement de remaniement sédimentaire (Article 1), sur les traits comportementaux sous-jacents (locomotion, alimentation et exploration, Complément 1) et sur différents traits physiologiques tels que le métabolisme énergétique, l'investissement dans la reproduction et la condition générale des individus (Article 1 et Complément 1).

Le Chapitre 4 se focalise sur la **réponse moléculaire du foie** des individus exposés pendant 96h au mélange de pesticides à deux températures différentes. L'objectif est d'évaluer le mode d'action d'un mélange complexe d'herbicides et de fongicides sur le foie des poissons, organe de détoxification majeur et centre de régulation du métabolisme énergétique, et l'influence de la température sur ces effets. Pour cela, une analyse en protéomique 2D et l'intégration des données en réseaux biologiques grâce à un logiciel de « proteome mapping » est réalisée (Article 2).

Le Chapitre 5 compare la **mise en place de la réponse physiologique de stress au cours du temps** chez des carassins dorés soumis à un stress chimique et/ou thermique. L'objectif est d'évaluer la capacité des organismes à mettre en place une réponse adaptative efficace lorsque qu'ils sont soumis à deux facteurs de stress de natures différentes. Pour cela, une analyse en cinétique sur 16 jours est réalisée et les

réponses primaires, secondaires et tertiaires sont observées à T0, 6h, 24h, 96h et 16 jours d'exposition (Article 3).

Le Chapitre 6 synthétise et compare entre eux les différents résultats obtenus. Des perspectives de recherche sont également proposées.

CHAPITRE 2.

Matériel et méthodes

1. LE CADRE DE L'ETUDE

1.1. LE MODELE BIOLOGIQUE : CARASSIUS AURATUS

1.1.1. Origine et distribution géographique actuelle

Le carassin doré (*Carassius auratus*, Linneaus 1758) (Figure 27) est un poisson de la famille des Cyprinidés largement distribué en Eurasie et principalement dans l'est de l'Asie [385]. Il s'agit d'une espèce ornementale créée en Chine au X^{ème} siècle à partir de formes sauvages, la sélection et la grande plasticité du genre ayant conduit à l'apparition d'un grand nombre de morphes (Figure 27 A-D) [386]. Introduite en Russie, au Japon et en Europe au XVIII^{ème} siècle dans les pièces d'eau et bassins d'ornement, l'espèce est aujourd'hui présente partout dans le monde (Figure 27E). Elle est d'ailleurs considérée comme la première espèce de poisson non-indigène à s'être féralisée en Amérique du Nord, avec des populations reproductrices importantes dans de nombreux états des USA [387–389]. L'introduction dans les milieux sauvages est parfois volontaire (e.g. des poissons relâchés par des particuliers) mais résulte souvent d'individus s'étant échappés de bassins d'aquacultures ou ornementaux en plein air [388,389].

1.1.2. Phylogénie et description

Le genre *Carassius* comprend plusieurs espèces présentes naturellement ou non dans les plaines et bassins Eurasiens. La phylogénie du genre est encore sujette à débat [385,390]. En France, trois espèces sont considérées : le carassin doré ou poisson rouge (*Carassius auratus*) et ses descendants rustiques, le carassin commun (*Carassius carassius*, Linneaus 1758) qui est une espèce indigène, et le carassin argenté (*Carassius gibelio*, Bloch 1752) qui a également été introduit pour la pisciculture.

Le carassin doré et le carassin argenté sont toutefois considérés par certains auteurs comme deux sous-espèces dénommées respectivement *Carassius auratus auratus* et *Carassius auratus gibelio* [386,390]. Les carassins, dont le carassin doré, forment des complexes d'espèces avec des formes extrêmement variables et des lignées diploïdes et triploïdes gynogénétiques [391]. De plus les carassins ont la capacité de s'hybrider entre eux, voire avec d'autres cyprinidés. Par conséquent de nombreuses formes existent dans la nature, rendant difficile l'étude précise de leur répartition et leur identification taxonomique. En dehors des morphes ornementaux aux caractéristiques plus ou moins extrêmes, le carassin doré se distingue dans sa forme rustique des autres carassins par un corps plus allongé, une nageoire dorsale longue et convexe et une grande caudale aux lobes bien formés [390].

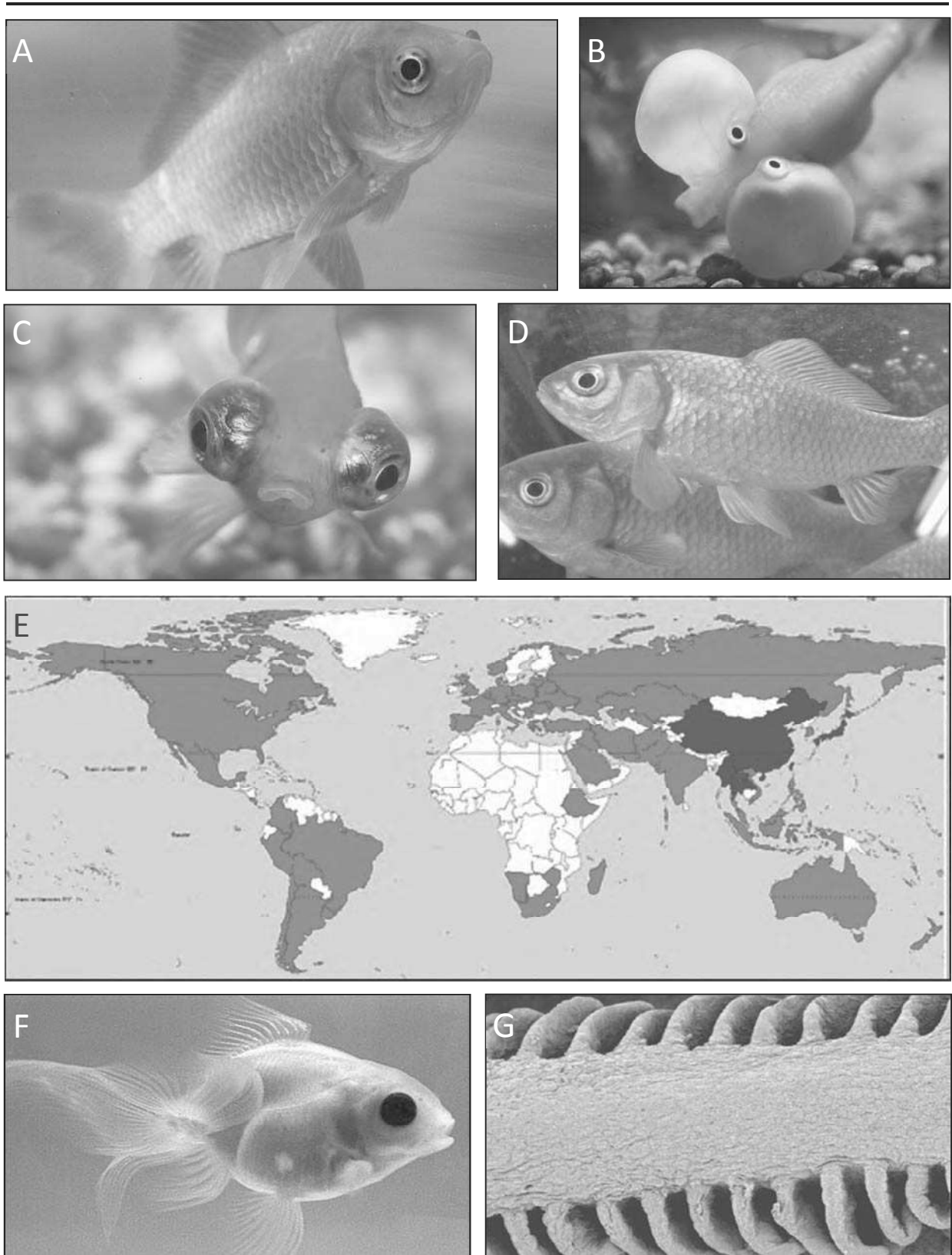


Figure 27. Le carassin doré, *Carassius auratus*.

Morphes (A) rustique rouge [519], (B) Celestial [520], (C) Bigeye [521] et (D) rustique beige doré [522]. (E) carte de répartition mondiale. En bleu : aire d'origine de l'espèce ; en rouge : pays où l'espèce a été introduite et où l'on retrouve des individus dans les milieux naturels [523]. Le carassin doré est un modèle biologique de plus en plus utilisé en biologie, en physiologie et en toxicologie environnementale : (F) carassin transparent créé au laboratoire de Biologie de l'Université de Mie (Japon) [524]; (G) les carassins possèdent une plasticité branchiale extrême en réponse à la température et l'oxygénation de l'eau (arc branchial en micrographie électronique à balayage [346]).

La taille adulte est de 20 à 30 cm pour un poids moyen de 300 à 500 g mais pouvant atteindre 1 kg. La tête est petite et triangulaire, sans barbillons ni écailles. La coloration rustique est beige-doré ou argenté, les formes ornementales allant du blanc au rouge vif en passant par tous les mélanges possibles entre les deux.

1.1.3. Biologie et écophysiologie du carassin

Biologiquement proches des carpes, les carassins vivent essentiellement dans les zones d'eaux lenticules (étangs, bras morts des cours d'eau ...) caractérisées par des eaux souvent hypoxiques et chaudes, des végétaux abondants et des fonds vaseux. Le carassin doré est d'ailleurs connu pour augmenter fortement la turbidité de l'eau en remaniant le sédiment, notamment pour l'alimentation [392]. Il s'agit d'une espèce omnivore, se nourrissant essentiellement de plantes, de crustacés et d'insectes. En milieu naturel, l'espèce peut vivre 10 ans mais sa longévité peut atteindre 20 ans en captivité.

La grande tolérance thermique du carassin doré explique en grande partie sa présence actuelle sous tous les climats [333]. La fenêtre thermique oscille entre 0,3°C et 12,6°C pour la limite basse et 30,8°C et 43,6°C pour la limite haute, les limites critiques hautes et basses étant fonction de l'acclimatation des individus [333]. L'optimum thermique semble être autour de 25-28°C, avec un rapport de l'activité métabolique active sur l'activité métabolique standard maximal à cette température [393]. L'espèce est également capable de survivre dans des conditions hypoxiques voire anoxiques, notamment grâce à une plasticité phénotypique extrême des branchies permettant d'augmenter fortement l'extraction de l'oxygène [347] mais également à des capacités métaboliques anaérobiques très importantes [394].

1.1.4. Un modèle biologique de plus en plus utilisé

L'espèce est utilisée comme modèle d'étude depuis les années 1920 dans des domaines aussi variés que le contrôle de maladies vectorielles [395], l'écologie, la génétique ou encore la physiologie (Figure 27F-G). A partir des années 40, l'espèce a surtout été étudiée pour sa tolérance aux conditions extrêmes de température et d'oxygénation [346,347,393,394,396,397]. Plus récemment, le carassin doré est devenu une espèce modèle pour évaluer l'effet de polluants tels que les pesticides [258,314,398,399] et les métaux lourds [400-402] ou de pollutions plus complexes [403,404].

Le carassin doré a été choisi comme modèle biologique pour cette étude car il s'agit d'une espèce (1) sensible à une large gamme de stress, (2) résistante aux stress de température et d'hypoxie, (3) facilement acclimatable et pouvant être maintenue en captivité, (4) élevée en pisciculture, (5) de plus en plus utilisée en toxicologie aquatique et (6) de taille suffisante pour évaluer les effets sur les organes et sans avoir à « pooler » les individus.

1.2. LE COCKTAIL DE PESTICIDES

1.2.1. Contexte environnemental

Le mélange de pesticides a été développé sur la base de mesures de la contamination par les pesticides de la Save (France), réalisées de Mars 2008 à Novembre 2009 [183]. Le bassin versant de la Save, située dans la région Gascogne, est principalement utilisé pour l'agriculture intensive (maïs, blé et tournesol) (Figure 28).

De fortes contaminations des eaux de surfaces et des sédiments par des triazines (atrazine, DEA, cyanizine...), des urées (linuron, isoproturon, chlorotoluron...) et des anilides (métolachlore, metazachlore...) ont été rapportée dans cette région lors des crues printanières [183,405].

1.2.2. Choix des molécules

En se basant sur les analyses effectuées par Polard et al. (2011) [183], six herbicides et un fongicide ont été sélectionnés selon trois critères :

- fréquence de détection
- concentration
- représentation des différentes familles de molécules détectées

Les molécules choisies sont le S-métolachlore, l'isoproturon, le linuron, le tébuconazole, l'aclonifen, l'atrazine-déséthyl et le pendiméthaline (Tableau 6). Les solutions pures de pesticides ont été diluées dans de l'acétone ($0,3 \text{ ml.l}^{-1}$ d'eau) et de l'eau déminéralisée pour obtenir deux mélanges: LD (low dose) et HD (high dose) pour des concentrations totales finales dans les milieux d'exposition de $8,4 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ et $42 \text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ respectivement (Tableau 6). La concentration LD est représentative des niveaux de forte contamination observés dans la Save lors d'évènements de ruissèlement intense notamment au printemps [183]. Des concentrations du même ordre de grandeur ont été rapportées dans d'autres rivières de la région et de France [182,406–408]. La concentration HD reflète des situations de plus hauts niveaux de contamination mesurées en Europe et aux États-Unis [178,196,409].

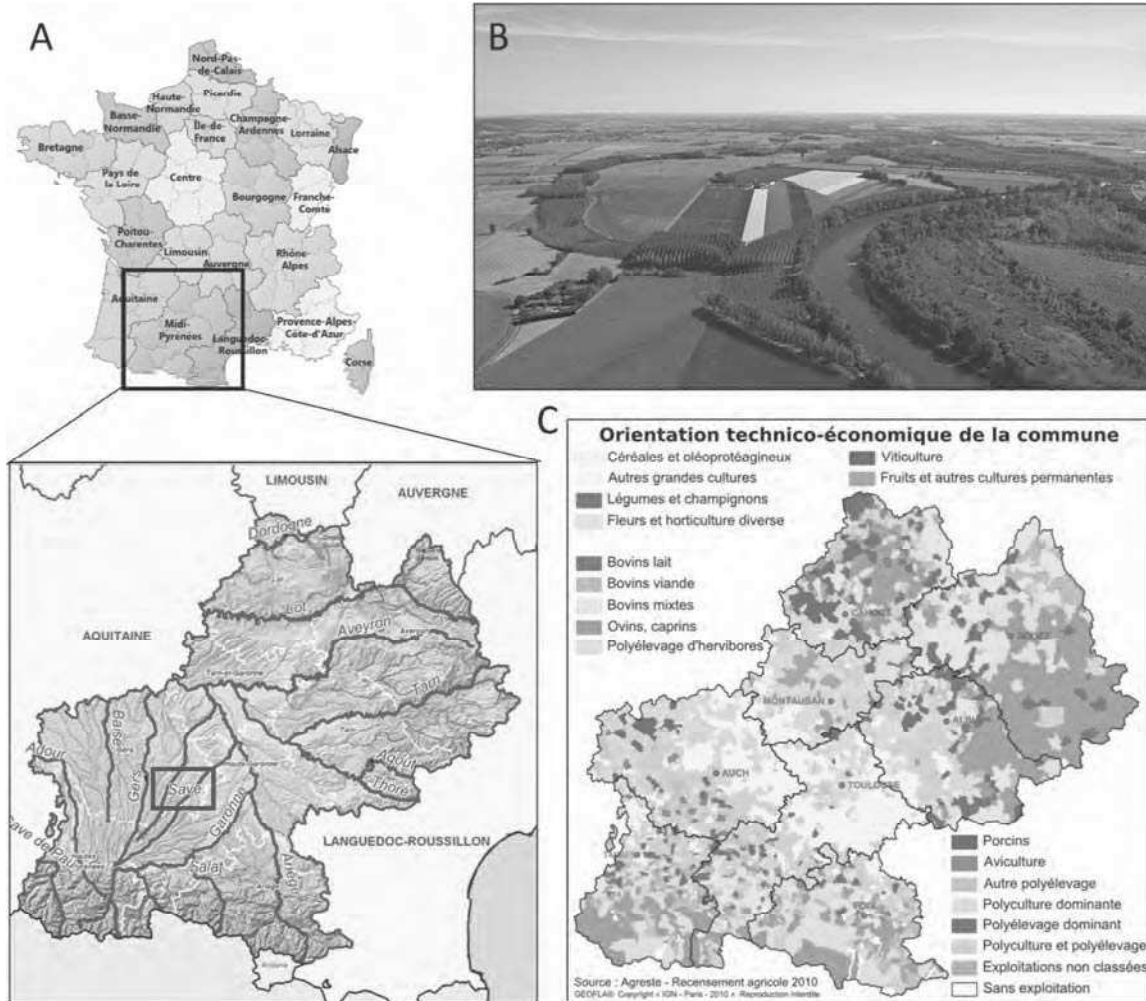


Figure 28. Contexte géographique de l'étude.

(A) La Save est un affluent de la Garonne localisée dans le sud-ouest de la France, en région Midi-Pyrénées. (B) Vue aérienne de la plaine agricole. (C) Carte de l'utilisation des sols pour l'agriculture et l'élevage en Midi-Pyrénées (orientation prédominante par commune). Illustrations : [525], [526], [527], [528].

Tableau 6. Composition des mélanges de pesticides et concentrations.

substance	famille	utilisation	mode d'action	concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
				LD	HD
S-Métolachlore	chloroacétamide	herbicide	inhibiteur de mitose	2,4	12,0
Linuron	urée	herbicide	inhibiteur du photosystème II	2,0	10,0
Isoproturon	urée substituée	herbicide	inhibiteur du photosystème II	1,2	6,0
Tébuconazole	triazole	fongicide	inhibiteur de synthèse des stérols	1,2	6,0
Aclonifen	diphényl-éther	herbicide	inhibiteur de synthèse des caroténoïdes	0,8	4,0
Déséthylatrazine	triazine	herbicide	inhibiteur du photosystème II	0,4	2,0
Pendiméthaline	dinitroaniline	herbicide	inhibiteur de mitose	0,4	2,0
total				8,4	42,0

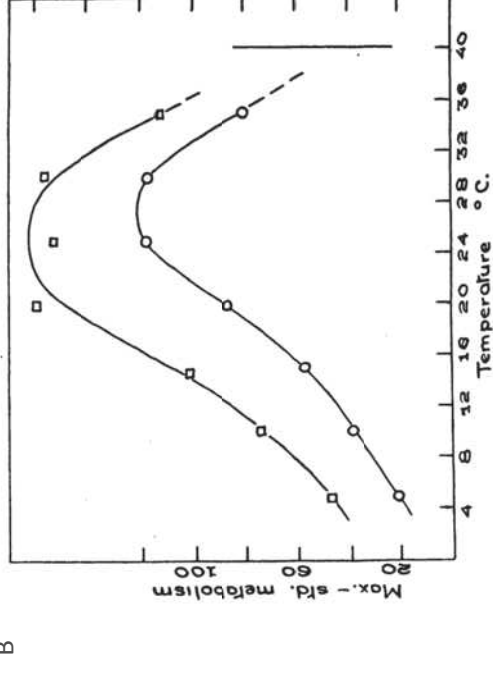
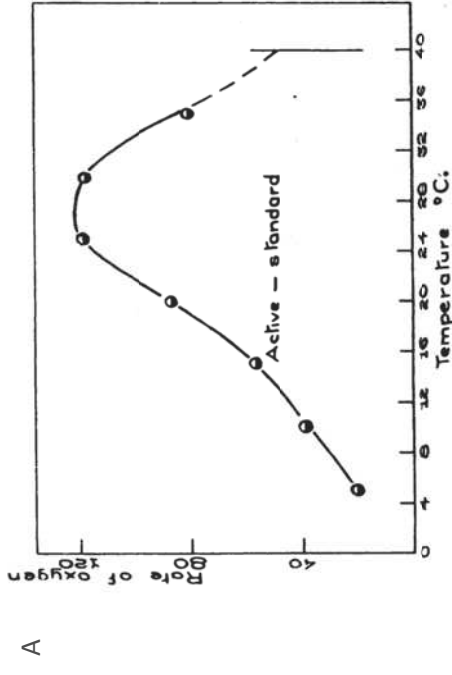


Figure 29. Effet de la température sur le métabolisme et la vitesse de nage du carassin doré [393].
 (A) Relation entre la température et le niveau d'absorption de l'oxygène actif et standard. (B) comparaison entre la différence d'absorption de l'oxygène maximale et standard (courbe du bas) et la vitesse de nage (courbe du haut) en fonction de la température.

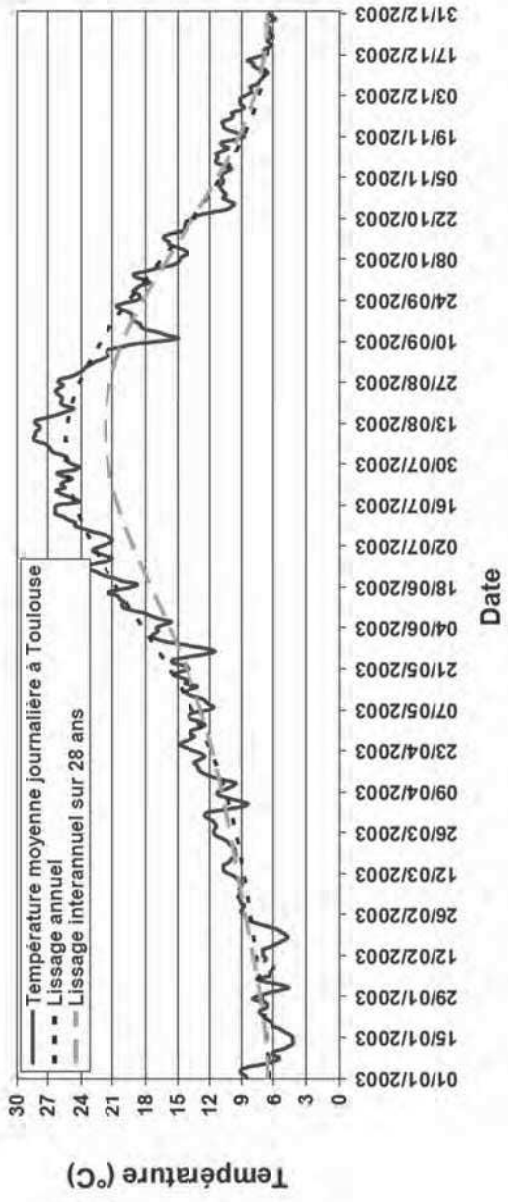
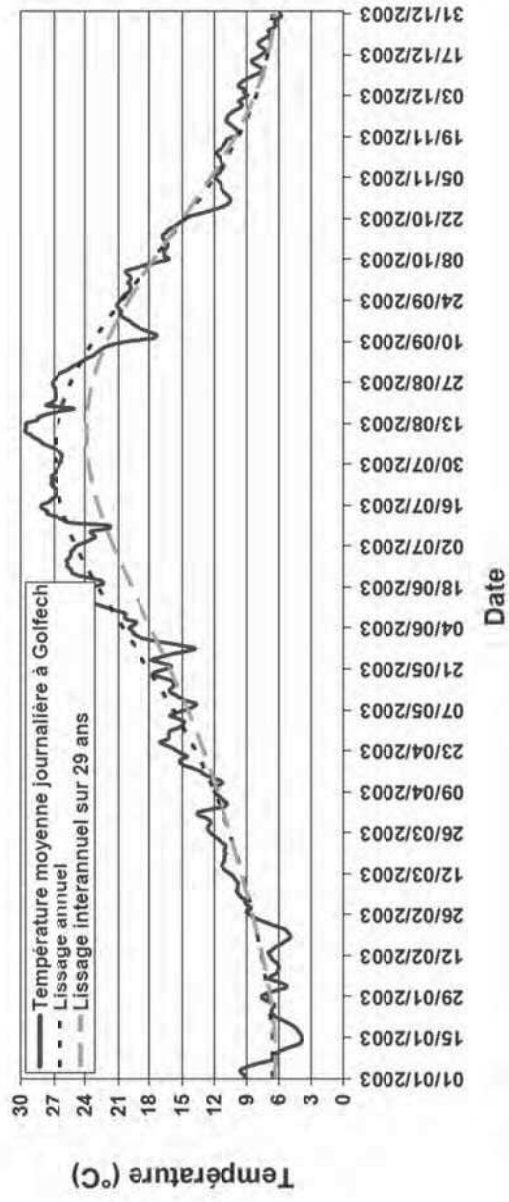


Figure 30. Evolution de la température de l'eau de la Garonne en 2003 à Golfech (en haut) et à Toulouse (en bas) [410].

1.3. LES TEMPERATURES D'EXPOSITION

Le choix des températures d'exposition a été réalisé en fonction de deux paramètres :

- **La gamme de tolérance thermique du carassin doré, son optimum et ses capacités d'acclimatation** : le carassin doré a une gamme de tolérance thermique comprise entre 0,3 et 43.6°C [333], son optimum étant situé entre 25 et 28°C (Figure 29, [393]). Des études réalisées en 1946 par Fry ont montré que le carassin doré est capable de résister à une augmentation graduelle de la température de l'eau de 10°C sur une semaine sans mortalité.
- **Les données environnementales de température de l'eau dans le sud-ouest de la France** : comme présenté sur la Figure 30, la température de l'eau dans la Garonne peut varier entre 3°C en hiver et 30°C au cours du mois le plus chaud (Figure 30, Croze et al. 2007). La température au printemps oscille entre 10 et 24°C.

Deux températures ont été choisies :

22°C : température de l'eau observée au printemps dans le sud-ouest de la France, proche de l'optimum thermique du carassin.

32°C : extrêmes de température pouvant être atteints dans le sud-ouest de la France, dans la gamme de tolérance mais légèrement au-dessus de l'optimum thermique de l'espèce, en respectant une augmentation maximale de 10°C entre les deux conditions.

2. DESIGN EXPERIMENTAL

Au cours de ce travail de thèse, 3 expériences d'exposition ont été réalisées. Les procédures d'acclimatation des poissons, les designs expérimentaux ainsi que les réponses étudiées dans chaque expérience sont présentés dans cette partie.

2.1. STABULATION ET ACCLIMATATION THERMIQUE DES POISSONS

Les carassins dorés (*Carassius auratus*) sont tous issus de la pisciculture Carpio (Consac, France), dans la gamme de taille 10-12 cm. A leur arrivée, les poissons ont été transférés dans des réservoirs opaques et stabulés en conditions contrôlées pendant un mois (18°C avec un cycle de lumière de 12:12h). L'eau des bacs a été préalablement déchlorée et oxygénée. La moitié de l'eau a été renouvelée tous les deux jours et les poissons nourris tous les jours avec des granulés fournis par le pisciculteur. Aucune mortalité n'a été observée pendant les phases de stabulation.

Après un mois de stabulation, la température de l'eau dans les bacs a été progressivement augmentée par des résistances pour atteindre 22 et 32°C selon les bacs. Une bonne oxygénation de l'eau a été maintenue par des pompes et vérifiée à l'aide d'une sonde multi-paramètres tout au long de l'acclimatation et de l'exposition afin de limiter les risques d'anoxie.

2.2. MESURES DE REDUCTION DU STRESS DES POISSONS

Dès leur arrivée et jusqu'à leur euthanasie, tout a été fait afin de limiter le stress et la souffrance des poissons. Par exemple, les bacs d'acclimatation et d'exposition étaient opaques afin de limiter le stress causé par les mouvements des expérimentateurs. La densité des poissons dans les bacs d'acclimatation et d'exposition a été limitée au maximum des capacités de stockage afin de diminuer le stress social. L'éclairage a été indirect et des zones d'ombrage et des caches ont été installées dans les bacs d'acclimatation. L'état de santé général des poissons a été vérifié quotidiennement (e.g. absence de points blancs, de blessures, comportement « normal »). Lors des différents transferts, les poissons ont été capturés un par un à l'aide d'une épuisette et manipulés délicatement afin de limiter tout risque de blessure. A la fin des expositions, les poissons ont été assommés immédiatement après avoir été sortis de l'eau puis euthanasiés par section de la colonne vertébrale juste en arrière de la tête dans les délais les plus courts.

2.3. EXPERIENCE 1

Le design expérimental est présenté dans la Figure 31. Les poissons ont été graduellement acclimatés aux deux températures expérimentales (22 et 32°C) pendant 15 jours. La température de l'eau est augmentée de 1°C par jour jusqu'à atteindre la température d'exposition recherchée. Les poissons ont été nourris à satiété avec des granulés fournis par la pisciculture d'origine puis mis à jeuner trois jours avant le début de l'exposition.

Les poissons ont ensuite été transférés dans des aquariums individuels de 30 litres puis exposés pendant 96 heures à trois concentrations de pesticides (CONTROL : 0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, LD : 8,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et HD : 42 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Les aquariums des groupes CONTROL ont reçu uniquement de l'acétone. 12 poissons ont été utilisés par conditions *pesticides* \times *température*, soit 96 poissons au total. Les aquariums, les résistances et l'ensemble du matériel d'exposition ont été préalablement saturés en pesticides aux concentrations recherchées pour chaque condition. L'eau a été renouvelée à moitié tous les jours par un système de surverse afin de limiter les variations de concentration en pesticides et la contamination de l'eau par les nitrates, nitrites et l'ammoniac dues aux excréments des poissons. La température de l'eau, l'oxygénation, le pH et la conductivité ont été mesurés dans tous les aquariums chaque jour à l'aide d'une sonde multi-paramètres. La concentration en nitrates, nitrites, ammoniac et ammonium ont été vérifiées quotidiennement.

Le comportement de remaniement sédimentaire est évalué tous les jours. L'état de santé global et le statut métabolique des individus ont été mesurés après 96 heures d'exposition en calculant des indices somatiques et de condition et en mesurant la concentration en protéines dans le foie et les muscles blancs (filets). Enfin, l'expression différentielle des protéines du foie est analysée par protéomique-2D après 96 heures d'exposition.

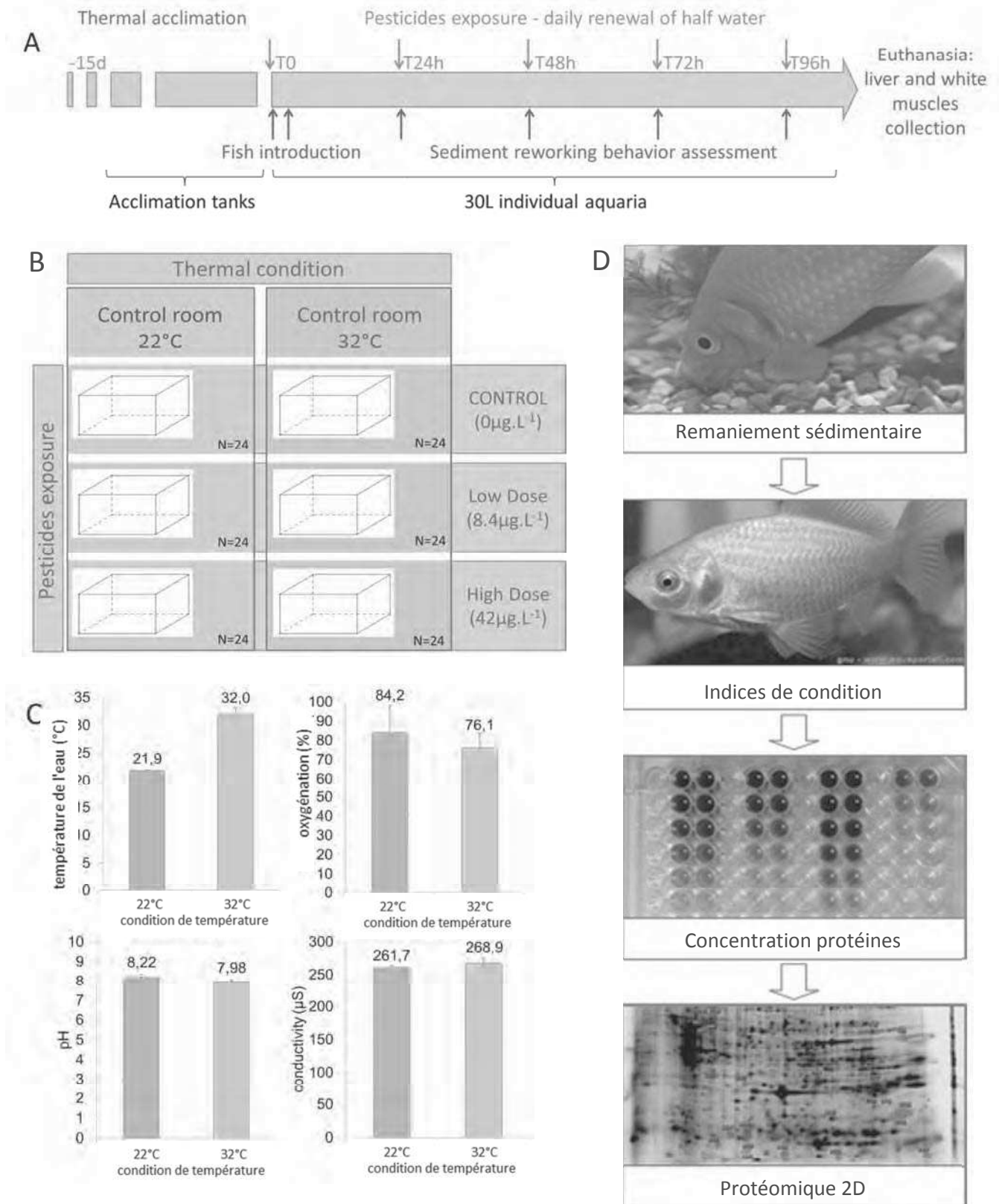


Figure 31. Expérience 1 : Design expérimental, chronologie et réponses observées

(A) Déroulement de l'expérience : les poissons sont acclimatés à la température pendant 15 jours à raison d'une augmentation d'1°C par 24h. Les poissons sont mis à jeun 3 jours avant le début de l'exposition aux pesticides puis introduit individuellement dans des aquariums d'exposition. L'exposition aux pesticides se déroule sur 96 heures avec un renouvellement à moitié de l'eau toutes les 24h. (B) Conditions expérimentales. (C) Paramètres physico-chimiques mesurés dans les aquariums (moyennes ± SD). (D) Réponses comportementales et biologiques mesurées.

2.4. EXPERIENCE 2

La deuxième série d'exposition (Figure 2) reprend le design expérimental et les protocoles d'exposition et d'acclimatation à la température de l'expérience 1. Cette expérience a été réalisée afin de compléter les réponses comportementales, physiologiques et moléculaires mesurées lors de l'expérience 1.

Brièvement, les poissons ont été acclimatés graduellement à une augmentation de la température (22 et 32°C) pendant 15 jours puis exposés pendant 96 heures au cocktail de pesticides (CONTROL : 0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, LD : 8,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ et HD : 42 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). 24 poissons par conditions ont été utilisés, avec 2 poissons par aquariums. Les poissons ont été nourris à satiété puis mis à jeuner 3 jours avant l'exposition aux pesticides. L'eau a été renouvelée à moitié tous les jours. Aucune mortalité n'a été observée au cours de l'expérience.

Les réponses observées ont été :

- la locomotion et le comportement exploratoire à T0, T24h et T96h ;
- le comportement alimentaire après 96h d'exposition ;
- l'évolution de l'indice de condition corporelle entre T0 et T96h ;
- la perte de poids entre T0 et T96h ;
- l'indice gonado-somatique à T96h ;

D'autres prélèvements ont été effectués pour des analyses ultérieures d'histopathologie, immunologie et génotoxicité. Ces analyses sont en cours et ne sont pas présentées dans ce manuscrit.

Des prélèvements sanguins ont été réalisés sous anesthésie générale à l'eugénol à T0 et T96h pour réaliser des analyses de génotoxicité et d'immunotoxicité. Des photographies ont également été prises pour évaluer de potentiels changements de coloration au cours de l'exposition aux pesticides. Le foie, les branchies et les gonades ont été prélevés afin de réaliser des analyses en histopathologie.

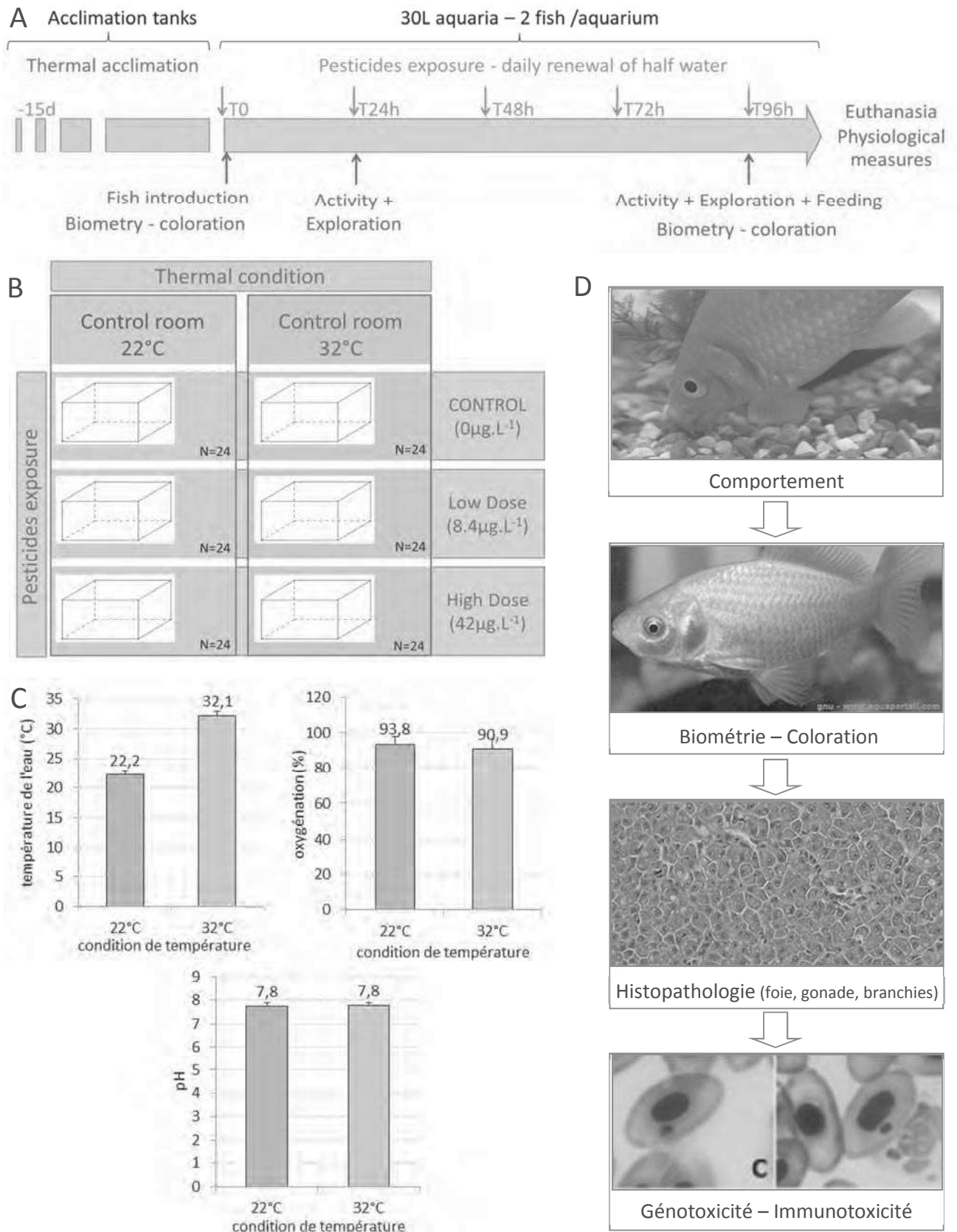


Figure 32. Expérience 2 : design expérimental, chronologie et réponses observées.

(A) Déroulement de l'expérience : les poissons sont acclimatés à la température pendant 15 jours à raison d'une augmentation d'1°C par 24h. Les poissons sont mis à jeun 3 jours avant le début de l'exposition aux pesticides puis introduit par 2 dans des aquariums d'exposition. L'eau est renouvelée à moitié toutes les 24h. (B) Conditions expérimentales. (C) Paramètres physico-chimiques mesurés dans les aquariums (moyennes \pm SD). (D) Réponses comportementales et biologiques mesurées (N° de page du protocole).

2.5. EXPERIENCE 3

La troisième expérience (Figure 3) a été une exposition en cinétique en 5 temps : T0, T6h, T24h, T96h et T16 jours. Les poissons ont été exposés au cocktail de pesticides à la plus forte dose (concentrations totales : $42 \mu\text{g.L}^{-1}$) à deux températures (22°C ou 32°C) pour obtenir 4 conditions :

- CONTROL : poissons non exposés aux pesticides à 22°C
- TEMP : poissons non exposés aux pesticides à 32°C
- PEST : poissons exposés aux pesticides à 22°C
- PEST×TEMP : poissons exposés aux pesticides à 32°C

Les poissons ont été placés dans des aquariums opaques de 60 litres dans une pièce en conditions contrôlées. Ils ont été acclimatés à la température recherchée pendant une semaine puis exposés aux pesticides pendant 0, 6h, 24h, 96h ou 16 jours. 12 poissons ont été placés par aquarium avec 2 aquariums par condition et par durée d'exposition (N=24).

Comme pour les autres expériences, l'eau a été renouvelée à moitié tous les jours et la température, le pH et l'oxygénation ont été contrôlés quotidiennement. Les poissons ont été nourris à satiété tous les jours avec des granulés. Aucune mortalité n'a été observée pendant l'expérience.

Les poissons ont été assommés par un coup à la tête. Le sang a été prélevé dans des seringues héparinées par ponction cardiaque puis centrifugé. Le plasma a été récupéré et stocké à -80°C. Les poissons ont ensuite été pesés et mesurés. Les filets et le foie ont été prélevés, pesés et stockés à -80°C.

Plusieurs analyses et mesures ont été réalisées sur 12 poissons par condition pour chaque temps d'exposition :

- La concentration en cortisol dans le plasma ;
- une analyse en métabolomique dans les foies ;
- les réserves énergétiques (carbohydrates, lipides et protéines) ainsi que le système de transport d'électron dans le foie et les filets ;
- l'activité enzymatique des superoxydes dismutases (SODs), de la catalase (CAT) et de la glutathion-S-transférase (GST) dans le foie ;
- les indices musculaire, hépatosomatique et de condition corporelle.

Les échantillons prélevés sur les 12 poissons restant par condition ont été conservés en vue de futures analyses, notamment de protéomique en Shotgun et lipidomique.

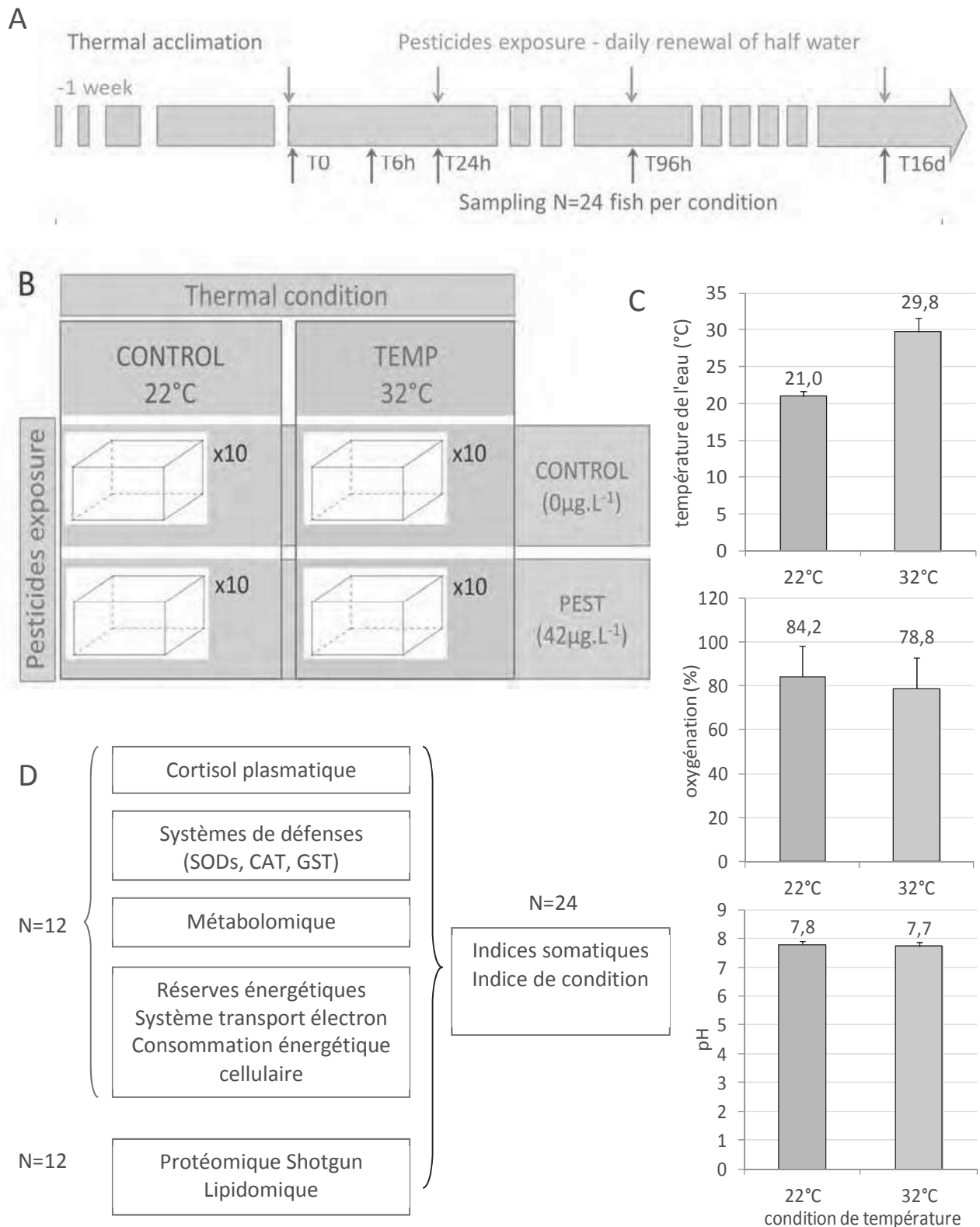


Figure 33. Expérience 3 : design expérimental, chronologie et réponses observées.

(A) Déroulement de l'expérience : les poissons sont acclimatés à la température pendant 15 jours à raison d'une augmentation d'1°C par 24h. Les poissons sont mis à jeun 3 jours avant le début de l'exposition aux pesticides puis introduit par 2 dans des aquariums d'exposition. L'eau est renouvelée à moitié toutes les 24h. (B) Conditions expérimentales. (C) Paramètres physico-chimiques mesurés quotidiennement dans les aquariums (moyennes ± SD). (D) Réponses comportementales et biologiques mesurées de l'échelle individuelle à l'échelle moléculaire (N° de page du protocole).

3. PROTOCOLES

3.1. LES REPONSES COMPORTEMENTALES

Afin d'évaluer l'effet croisé d'une exposition aux pesticides et d'une augmentation de la température sur le comportement des poissons, plusieurs traits comportementaux ont été mesurés :

- Comportement de remaniement sédimentaire ;
- Locomotion ;
- Comportement exploratoire ;
- Comportement alimentaire.

3.1.1. Mesures du remaniement sédimentaire

Le remaniement sédimentaire a été évalué suivant le protocole décrit par De Nadaï-Monoury et al. (2013). Le fond des aquariums a été recouvert d'une couche de 5cm de sable de quartz blanc (diamètre des grains entre 1 et 2,5mm) (Figure 34 A-B). Une fine couche de sable de quartz bleu de même diamètre a ensuite été répartie uniformément par-dessus. Les aquariums ont été ensuite remplis d'eau en faisant attention à ne pas perturber les couches de sable. Les aquariums ont été placés sur des plaques de polystyrènes de 20 mm d'épaisseur pour limiter l'effet de vibrations potentielles. Une photographie du « sédiment » a été prise à T0 avant l'introduction des poissons puis toutes les 24h jusqu'à la fin de l'exposition (Figure 34 C). Le comptage du nombre de pixels blancs dans chaque aquarium et à chaque pas de temps a été réalisé grâce au logiciel Image-Pro Plus (MediaCybernetics). Ce nombre a été normalisé par rapport au nombre total de pixels de l'image, à l'état initial du sédiment à T0 et au poids des individus pour obtenir le pourcentage de surface remaniée par gramme de poisson (%.g⁻¹).

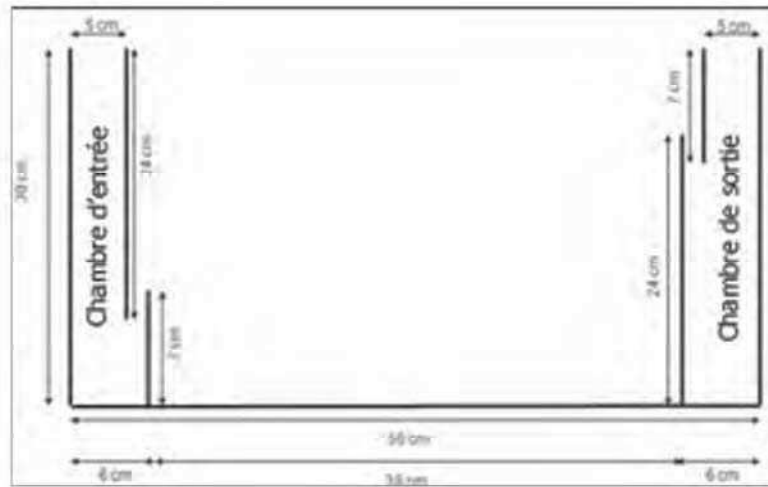
3.1.2. Locomotion et comportement exploratoire

Pour évaluer les traits liés à la locomotion et à l'exploration, deux méthodes ont été utilisées : l'observation directe dans les bacs d'exposition et des analyses vidéo dans des aquariums de tests [411].

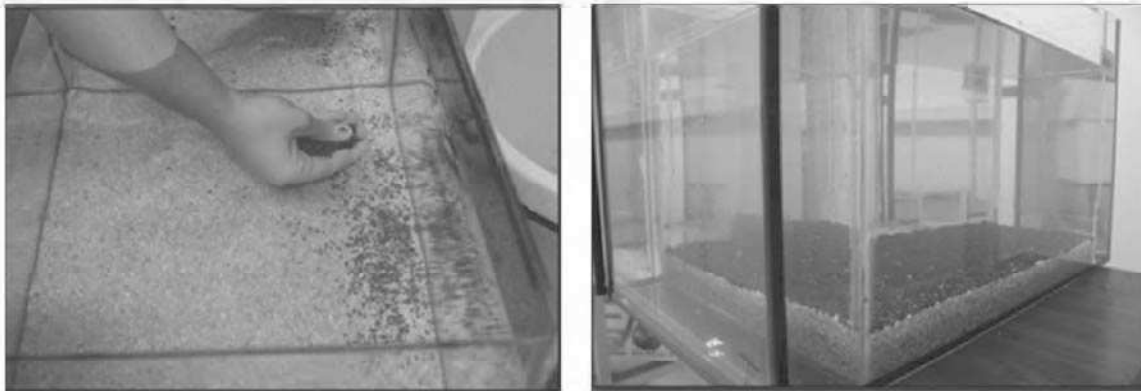
3.1.2.1. Observation directe

L'observation a été réalisée directement dans les bacs d'exposition, l'observateur étant camouflé derrière un rideau opaque percé d'une fenêtre d'observation pour limiter l'effet perturbateur de sa présence sur le comportement des poissons. Le temps passé à nager a été chronométré sur 5 minutes.

A Structure des aquariums d'exposition



B Mise en place des couches de sables



C Photographie et calcul du pourcentage de sédiment remanié

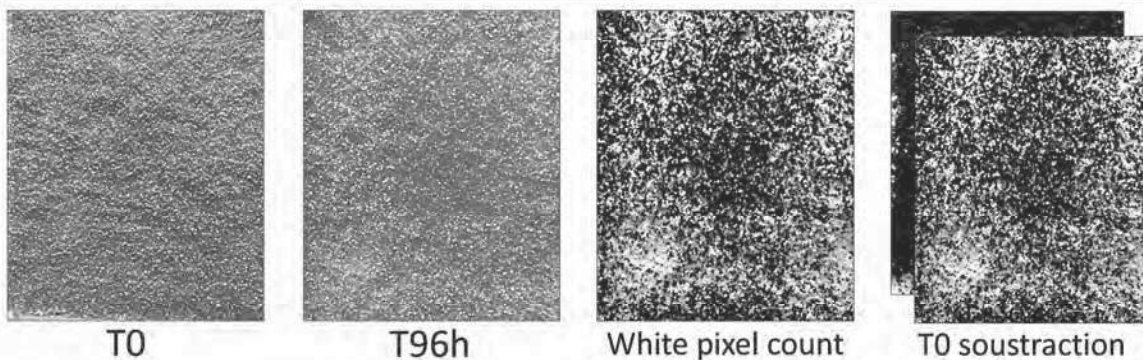


Figure 34. Protocole de mesure du remaniement sédimentaire.

(A) structure des aquariums d'exposition : les chambres d'entrée et de sortie permettent de renouveler l'eau par surverse sans perturber le sédiment. (B) Mise en place de deux couches de sable de quartz, l'une blanche et l'autre bleue dans le fond des aquariums. (C) Des photographies sont prises à T0 puis toutes les 24 heures. Le nombre de pixels blancs est compté par un logiciel d'analyse d'image puis standardisé par rapport à la taille de la photo, T0 et le poids des individus pour obtenir le pourcentage de surface remaniée par gramme de poisson ($\% \cdot g^{-1}$).

3.1.2.2. Analyses vidéo

Après l'observation directe, les poissons ont été transférés dans des aquariums de test dont le fond est quadrillé en 6 zones. Des webcams placées en surplomb à la verticale ont enregistré en continu pendant 10 minutes. L'acquisition des vidéos a été réalisée avec le logiciel VirtualDub (v1.10.4 [412]) Les données comportementales ont ensuite été extraites par le logiciel Tracker (v4.8, comPADRE, Figure 35) à T0, T24 et T96h sur les 5 dernières minutes de film, les 5 premières minutes étant considérée comme un temps d'acclimatation au nouvel environnement.

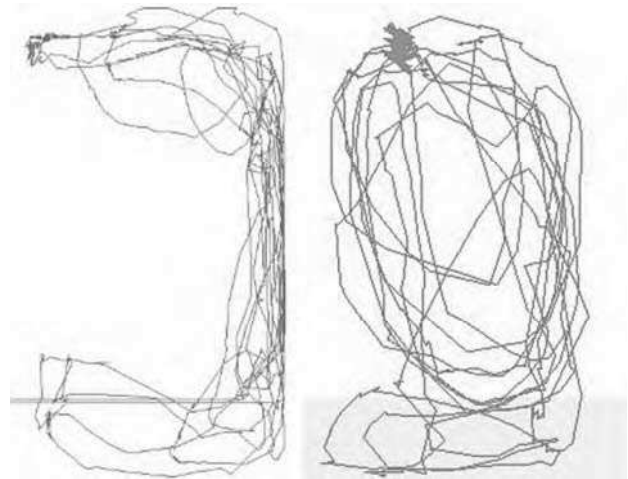


Figure 35. Exemples de trajectoires filmées et extraites par le logiciel Tracker (v4.8, comPADRE).

Le principe de l'analyse par le logiciel Tracker est l'extraction des coordonnées X et Y du poisson à chaque frame de la vidéo, à raison de 5 frames par seconde (Figure 35). La distance parcourue (m) et la vitesse moyenne ($m.s^{-1}$) ont été déterminées en calculant la différence entre les coordonnées du poisson entre chaque frame. Le nombre de changement de direction a été obtenu en comptant le nombre d'angle dans le trajet réalisé par les poissons. Enfin le nombre de zones explorées correspond à la quantité de carrés du quadrillage traversés au moins une fois par le poisson (de 1 à 6).

3.1.3. Comportement alimentaire

Le comportement alimentaire a été évalué à 96h d'exposition à jeun des poissons. Pour cela, 10 granulés flottants ont été déposés dans l'aquarium et laissés pendant 60 secondes. Les granulés restant ont été retirés après le temps imparti. Trois traits ont été mesurés :

- Latence (s): temps mis par l'individu pour rejoindre la nourriture et avaler un premier granulé, noté par défaut 61s lorsque le poisson n'a pas réalisé le comportement pendant le temps imparti ;
- Taux d'alimentation : nombre de granules avalés ;
- Prise alimentaire (OUI/NON) : notée OUI si le poisson a avalé au moins un granulé sans le recracher dans le temps imparti.

La latence et la prise alimentaire ont intégrées dans une analyse de survie. Les analyses de survie sont souvent utilisées en biologie et en médecine [70] pour étudier l'occurrence d'un évènement dans un temps limité. Elles sont également utilisée en écotoxicologie aquatique pour évaluer la survie des

individus exposés à des polluants [413,414]. Elles évaluent la probabilité qu'un évènement arrive sous différentes conditions, en prenant en compte la latence avant la réalisation de l'évènement mais également le taux de non-réalisation à la fin de l'étude (données « censurées »). L'analyse de survie peut être utilisée en analyse comportementale pour évaluer la probabilité de survenue d'un comportement dans un temps donné [415]. Dans cette étude, l'évènement suivi est la prise alimentaire et les données « censurées » représentent les poissons ne s'étant pas nourris avant la fin des 60s d'observation. La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour estimer la fonction de survie de chaque groupe. L'analyse multi-groupe a été réalisée par le test Wilcoxon généralisé de Gehan. Les comparaisons 2 à 2 (tests post-hoc) sont faites avec le test de F de Cox.

3.2. LES INDICES DE CONDITIONS

3.2.1. L'indice de condition globale de Fulton

L'indice de condition de Fulton (FCF) représente la condition globale corporelle et le « bien-être » général des poissons [144]. Il a été calculé à partir des paramètres de taille et de longueur des poissons :

$$FCF = \frac{\text{poids (g)}}{\text{taille(cm)}^3} \quad (1)$$

3.2.2. Indices somatique

L'indice hépatosomatique (IHS) est une mesure du statut métabolique du foie et est corrélé avec le contenu énergétique de l'organe, notamment les réserves en glycogène et en lipides [416]. Il correspond au ratio du poids du foie sur le poids de l'individu :

$$IHS = \frac{\text{poids du foie (g)}}{\text{poids total(g)} - \text{poids du foie (g)}} \times 100 \quad (2)$$

L'indice musculaire (MI) reflète le statut métabolique des muscles et notamment ses réserves en protéines [417] :

$$MI = \frac{\text{poids filets (g)}}{\text{poids total (g)}} \times 100 \quad (3)$$

L'indice gonadosomatique (IGS) reflète la maturation gonadique, autrement dit, l'investissement énergétique dans la reproduction [418–420] :

$$IGS = \frac{\text{poids des gonades (g)}}{\text{poids total (g)}} \times 100 \quad (4)$$

3.3. RESERVES ENERGETIQUES, ACTIVITE DE L'ETS ET CONSOMMATION CELLULAIRE EN ENERGIE

3.3.1. Principes

Les concentrations totales en carbohydrates, lipides et protéines ainsi que le taux de consommation d'oxygène dans le système de transfert d'électron (activité ETS) ont été mesurés dans le foie et les filets. Ces paramètres permettent de calculer l'énergie disponible (EA) et l'énergie consommée (EC) dans les cellules ainsi que l'allocation énergétique cellulaire (CEA). Il s'agit de dosages colorimétriques au spectrophotomètre (FLUOstar OMEGA, BMG LABTECH) adaptés pour microplaque. Le protocole a été adapté de De Coen et Janssen (1997 [421]) modifié par Ferreira et al. (2015 [422]).

3.3.2. Protocole

Le protocole est présenté dans la Figure 36. 25 mg de tissu ont été homogénéisés au Fastprep à 4°C dans un 1 ml d'eau déminéralisée. L'homogénat a été divisé en trois volumes de 300 µL.

Le premier volume a été utilisé pour mesurer la concentration en protéines et en carbohydrates. Pour cela, 100 µL d'acide trichloroacétique (TCA) ont été ajoutés dans le tube. Les homogénats ont été ensuite vortexés 10s, incubés pendant 10 min à -20°C puis centrifugés à 1000g, 4°C pendant 10 min. 50 µL de surnageants ont été déposés sur microplaque en triplicats. Une gamme de glucose dans du TCA en 5 points (0 à 3000 µg.mL⁻¹) a également été déposée en triplicats. 50 µL de phénol 5% et 200 µL d'H₂SO₄ ont été ajoutés dans chaque puits. Les plaques ont été incubées dans le noir pendant 10 min. La concentration en carbohydrates a été mesurée à 492 nm. Le reste du surnageant a été enlevé et le culot a été resuspendu dans 1250 µL de NaOH 1M, vortexé et incubé pendant 30 min à 60°C au bain-marie. 5 µL d'échantillon ont été déposés en triplicats sur microplaque puis 250 µL de bradford ont été ajoutés dans chaque puits. La plaque a été laissée à incubée 15min dans la noir. La concentration en protéines a été mesurée à 595nm contre une gamme de BSA dans du NaOH 0,2M (5 points de 0 à 2000 µg.mL⁻¹).

Le deuxième volume sert à mesurer la concentration en lipides totaux. Les homogénats ont été mélangés à 500 µL de chloroforme, 500 µL de méthanol et 200 µL d' H₂O₂ puis centrifugés à 1000g, 4°C pendant 5 min. La phase inférieure a été prélevée dans des tubes en verre. Une gamme de tripalmitine dans du chloroforme a été préparée (0 à 3000 µg.mL⁻¹ en 5 points). Les échantillons et la gamme ont été incubés à 95°C au bain-marie pendant 5 min puis à nouveau pendant 10 min avec 200 µL de H₂SO₄. Après avoir refroidi les tubes dans la glace, 5 mL de réactif vanilline-phosphorique ont été ajoutés. Les échantillons et la gamme ont été incubés dans le noir pendant 15 min puis 200 µL ont été déposés en triplicats sur microplaque. La concentration en lipides a été mesurée à 525nm.

Le troisième volume a été utilisé pour mesurer l'activité ETS. Les homogénats ont été mélangés avec 150 μL de tampon (0.3M Tris-HCl pH 8.5, 45% (w/v) Poly Vinyl Pyrrolidone, 495 μM MgSO_4 et 0.6% (w/v) Triton X-100) puis centrifugés à 1300g, 4°C pendant 10 min. 50 μL ont ensuite été déposés en triplicats sur microplaque. 150 μL de tampon BSS (0.13M Tris-HCl pH 8.5, 0.3% (w/v) Triton X-100, 1.7mM NADH et 250 μM NADPH) et 100 μL de 8mM Iodonitrotétrazolium (INT) ont été ajoutés. La réaction commence dès l'ajout de l'INT. La lecture a été réalisée pendant 3 min en cinétique à 490nm.

3.3.3. Analyses des résultats

Les concentrations en carbohydrates, lipides et protéines ont été calculées en $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ grâce aux courbes de calibration puis exprimées en $\mu\text{g}.\text{mg}^{-1}$ de tissu. Elles ont ensuite été transformées en équivalent énergétique ($\text{mJ}.\text{mg}^{-1}$ de tissu) en utilisant leur énergie de combustion [144]:

- Carbohydrates : 17 $\text{kJ}.\text{g}^{-1}$
- Lipides : 39,5 $\text{kJ}.\text{g}^{-1}$
- Protéines : 24 $\text{kJ}.\text{g}^{-1}$

L'activité de l'ETS (mole O_2 consommée. mg^{-1} tissu. h^{-1}) a été calculée à partir de la quantité de formazan formée en utilisant le coefficient d'extinction molaire de 15900 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, en sachant que pour chaque mole de formazan produite, deux moles d'oxygène ont été consommées par le système. La formule détaillée est présentée ci-dessous :

$$\text{ETS} = \frac{\text{pente (éch-témoin)} \times V_r (\mu\text{L}) \times \left(\frac{V_h (\mu\text{L})}{V_u (\mu\text{L})}\right)}{\varepsilon \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1} \times 1 \text{ cm} \times 2 \frac{\text{mol formazan}}{\text{mol O}_2} \times 60 \text{ min}} \Bigg/ \text{poids éch (mg)} \quad (5)$$

Avec :

- V_r : volume de réaction
- V_h : volume homogénat
- V_u : volume homogénat utilisé
- ε : coefficient d'extinction molaire

L'énergie disponible (AE), la respiration cellulaire ou énergie consommée (EC) et l'allocation énergétique cellulaire (CEA) ont été calculés selon la méthode de Smolders et al. (2003 [144]) et Verslycke et al. (2004 [423]) :

$$\text{AE (mJ}.\text{mg}^{-1} \text{ tissu)} = \text{carbohydrates} + \text{protéines} + \text{lipides} \quad (6)$$

$$\text{EC (mJ}.\text{mg}^{-1} \text{ tissu}.\text{h}^{-1}) = \text{activité ETS} \times 484 \text{ (mJ}.\text{M}^{-1} \text{ O}_2 \text{ consommée)} \quad (7)$$

$$\text{CEA} = \text{AE} / \text{EC (h}^{-1}) \quad (8)$$

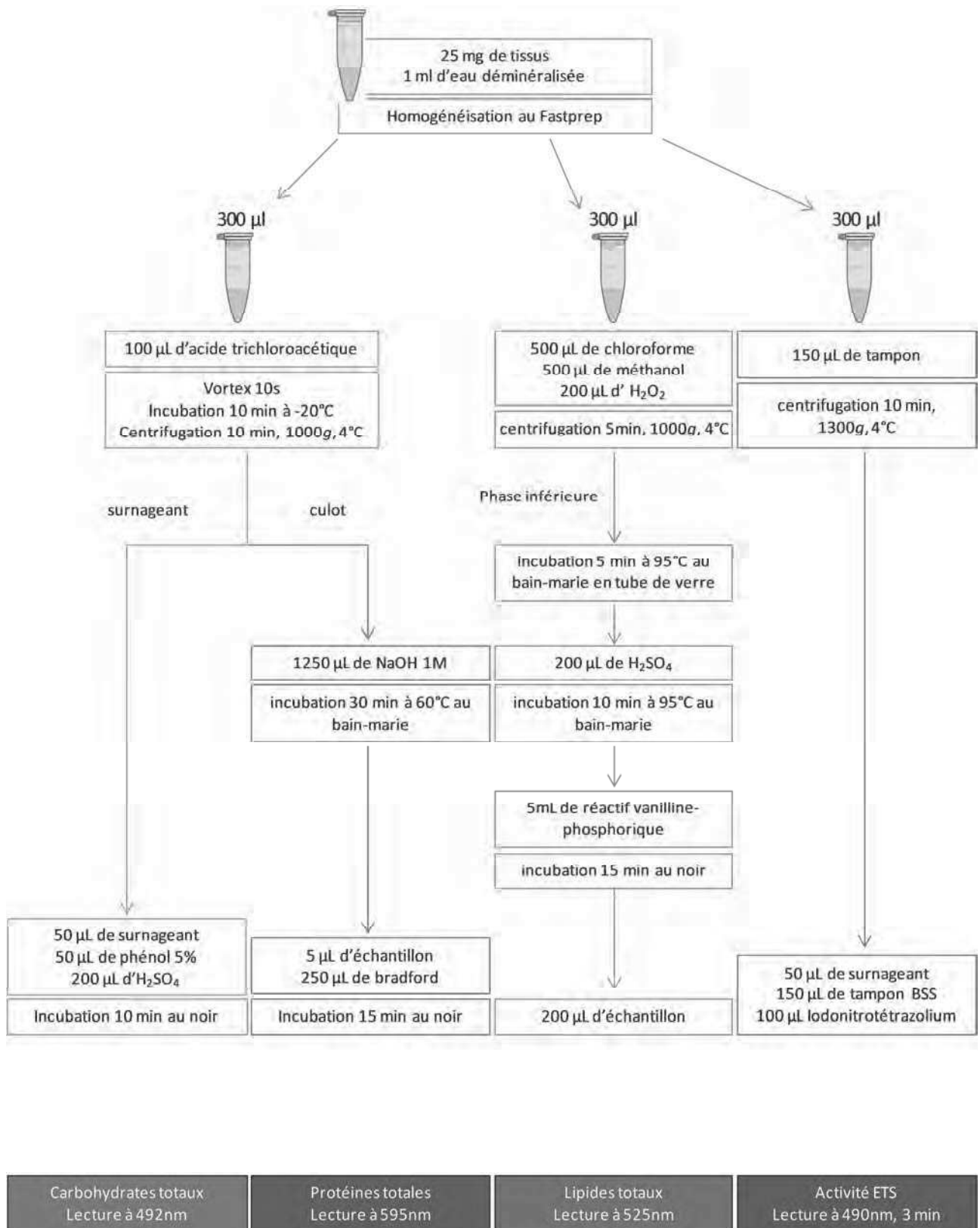


Figure 36. Protocole de dosage des réserves énergétiques et de l'activité du système de transport d'électron (ETS).

3.4. ACTIVITE DES SYSTEMES DE DEFENSE ENZYMATIQUES

3.4.1. Principe général

L'activité de deux enzymes de défense contre le stress oxydant, les SODs et la CAT, ainsi qu'une enzyme impliquée dans la détoxification des polluants (GST) ont été mesurées dans le foie des poissons. Les protocoles de dosages ont été adaptés de Feirrer et al. (2015 [422]) et Maes (2014 [424]). La fraction post-mitochondriale (PMS) a été extraite puis utilisées pour les différents dosages (Figure 37). Les dosages ont été réalisés par colorimétrie au spectrophotomètre (FLUOstar OMEGA, BMG LABTECH).

3.4.2. Extraction de la PMS et dosage de la concentration en protéine

50 mg de foie ont été homogénéisés à 4°C au Fastprep® dans 1 mL de tampon K-phosphate 0,1M ph 7,8 (K-phosphate à 100mM, 20% (v/v) de glycérol et 0,2mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl). Les homogénats ont été centrifugés à 10 000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant (PMS) a été récupéré, aliquoté en 4 volumes de 100 µL et conservé à -80°C pendant deux semaines maximum.

Le premier volume a été utilisé pour doser les concentrations en protéines dans la PMS. Le dosage a été réalisé sur microplaques en déposant en triplicats 5 µL d'homogénat par puits puis 250 µL de Bradford. Une gamme de BSA de 0 à 2000 µg.L⁻¹ a été réalisée. La lecture a été faite après 15 minutes d'incubation à l'obscurité à température ambiante à 595nm. Les trois autres volumes ont été utilisés pour doser l'activité de la CAT, des SODs et de la GST.

3.4.3. La catalase (CAT)

3.4.3.1. Principes

La catalase catalyse la dégradation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ en eau et en oxygène. La dégradation du H₂O₂ a été mesurée par colorimétrie au spectrophotomètre selon le protocole de Babo et Vasseur (1992 [425]) adapté pour microplaque.

3.4.3.2. Protocoles

Les échantillons PMS ont été dilués dans le tampon d'homogénéisation de sorte à obtenir une concentration en protéines comprise entre 13 et 35 mg.L⁻¹. Sur des microplaques adaptées à la lecture dans les UV, 150 µL de l'échantillon dilué ont été déposés en triplicats. 150 µL d'une solution de K-phosphate à 0,1M ph 7,8 et de H₂O₂ à 28mM ont ensuite été ajoutés dans chaque puit. La réaction commence dès l'ajout des réactifs. La dégradation du H₂O₂ a été mesurée à 240nm pendant 5 minutes à 25°C.

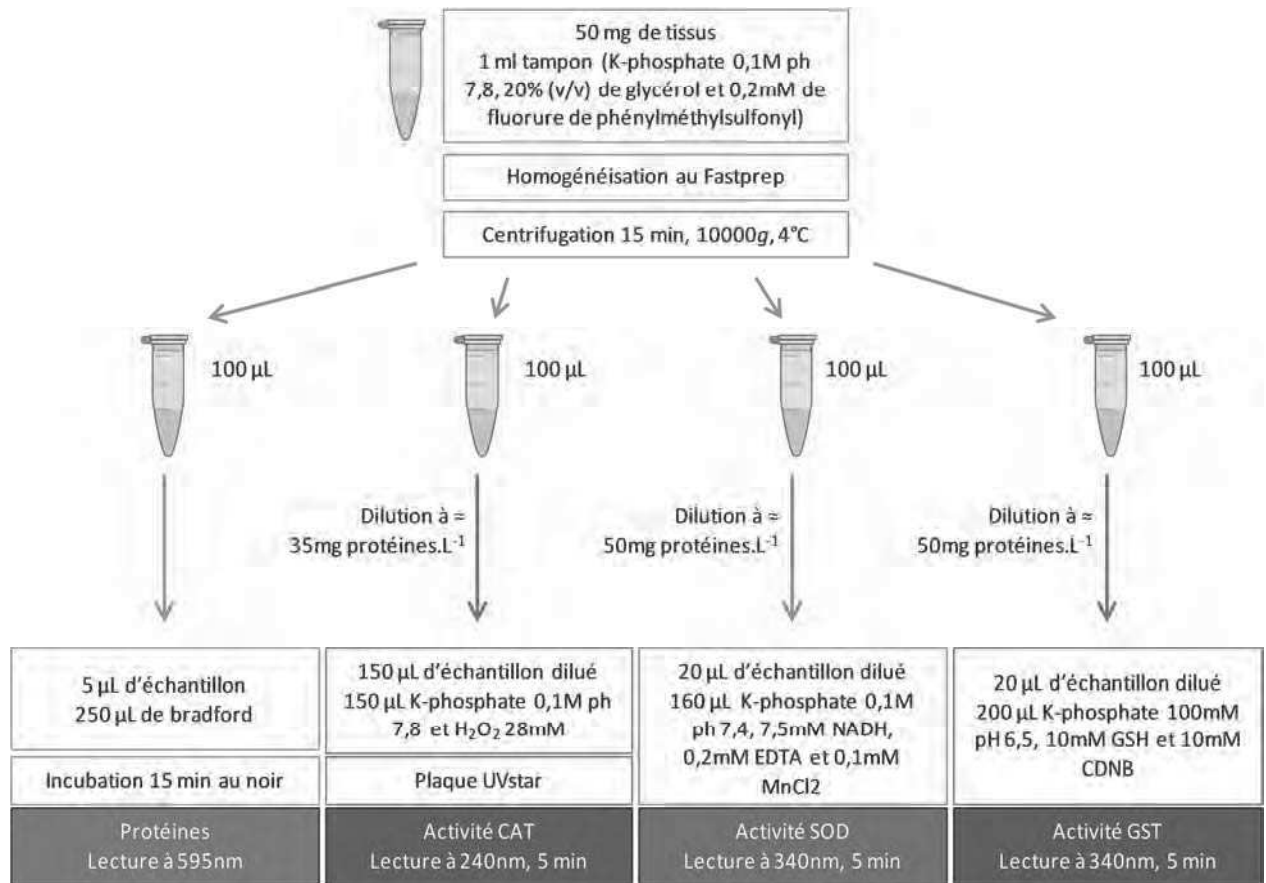


Figure 37. Protocole de dosage de l'activité des systèmes de défense enzymatiques

CAT : catalase, SODs : superoxydes dismutases, GST : glutathion-S-transférase

3.4.3.3. Analyses des résultats

L'activité enzymatique spécifique a été exprimée en unités (U) par gramme de protéines, avec une U correspondant à une μ mole de substrat (H_2O_2) hydrolysée par par gramme de protéine et par minute, en utilisant un coefficient d'extinction molaire de $0,0436.mM^{-1}.cm^{-1}$.

$$\text{activité spécifique CAT} = - \frac{\text{pente (échantillon-blanc)} \times V_r(\mu L) \times \text{dil}}{\varepsilon \times V_u(\mu L)} / \text{mg protéines} \quad (9)$$

Avec :

V_r : volume de réaction

dil : facteur de dilution de la PMS

V_u : volume homogénat utilisé

ε : coefficient d'extinction molaire

3.4.4. Les superoxydes dismutases (SODs)

3.4.4.1. Principes

Les SODs catalysent la dismutation des radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$) en une molécule de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et une molécule d'oxygène (O_2), et par conséquent inhibent la réduction du NADH par les superoxydes. L'inhibition de l'oxydation du NADH a été mesurée par colorimétrie selon le protocole de Paoletti et al. (1986) adapté sur microplaque.

3.4.4.2. Protocoles

Les échantillons PMS ont été dilués dans le tampon d'homogénéisation de sorte à obtenir une concentration en protéines inférieure à 50 mg.L^{-1} . $20 \mu\text{L}$ d'échantillon dilué ont été déposés en triplicats sur microplaque. Une gamme de SODs standards diluée dans du tampon K-phosphate $0,1\text{M}$ pH 7,4 (8 points de gamme de 0 à 200 U.mL^{-1}) a été également déposée en triplicats sur chaque microplaque. $160 \mu\text{L}$ d'une solution de $0,1\text{M}$ pH 7,4 K-phosphate, $7,5\text{mM}$ NADH, $0,2\text{mM}$ EDTA et $0,1\text{mM}$ MnCl_2 ont ensuite été ajoutés dans chaque puit. La réaction commence dès l'ajout des réactifs. L'absorbance a été lue à 340nm pendant 5 minutes à 25°C .

3.4.4.3. Analyses des résultats

L'activité enzymatique spécifique (U.g^{-1} de protéines) a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage, avec par convention une U d'enzyme correspondant à une inhibition de l'oxydation du NADH de 50%.

3.4.5. La glutathion-S-transférase (GST)

3.4.5.1. Principes

La GST est une enzyme qui catalyse la conjugaison entre le groupe thiol du glutathion réduit (GSH) et de nombreux composés chimiques hydrophobes électrophiles. L'augmentation de l'absorbance à 340nm liée à la conjugaison entre le GSH et le 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) a été mesurée par spectrophotométrie selon le protocole de Habig et al. (1974 [426]) adapté pour microplaque.

3.4.5.2. Protocoles

Les échantillons PMS ont été dilués dans le tampon d'homogénéisation de sorte à obtenir une concentration en protéines inférieure à 50 mg.L^{-1} . $20 \mu\text{L}$ d'échantillon dilué ont été déposés en triplicats sur les microplaques. $200 \mu\text{L}$ d'une solution de 100mM K-phosphate pH 6,5, 10mM GSH et 10mM CDNB ont été ajoutés et l'absorbance lue à 340nm pendant 5 minutes à 25°C .

3.4.5.3. Analyses des résultats

L'augmentation de l'absorbance est proportionnelle à l'activité de la GST. L'activité enzymatique est exprimée en unités par gramme de protéine ($U.g^{-1}$) en utilisant un coefficient d'extinction molaire (ϵ) du CDNB conjugué de $9.6 \times 10^{-3} .M^{-1}.cm^{-1}$.

$$\text{activité spécifique GST} = \frac{\text{pente (échantillon-blanc)} \times V_r(\mu L) \times \text{dil}}{\epsilon \times V_u(\mu L)} / \text{mg protéines} \quad (10)$$

Avec :

V_r : volume de réaction

dil : volume homogénat

V_u : volume homogénat utilisé

ϵ : coefficient d'extinction molaire

3.5. DOSAGE DU CORTISOL PLASMATIQUE

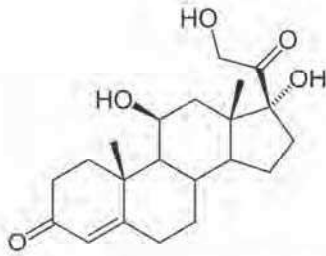
3.5.1. Principes

La concentration du cortisol plasmatique a été mesurée par dosage radio immunologique (radioimmuno assay RIA) au laboratoire GENPHYSE (INRA, Castanet). Le RIA est une méthode basée sur la compétition pour des anticorps anti-cortisol (AC) du cortisol froid (F) et du cortisol radio marqué au H^3 (F*) (Figure 38). En connaissant la concentration en anticorps et en cortisol radio marqué, on peut déterminer la quantité de cortisol plasmatique. Après équilibre des échanges, la fraction libre est absorbée sur du charbon et la fraction liée est dosée par mesure de la radioactivité.

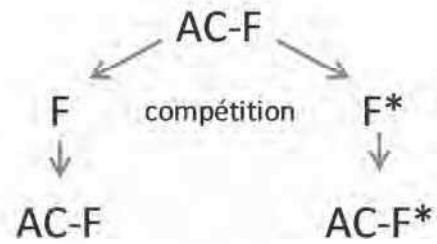
3.5.2. Protocole

10 μL de plasma ont été mélangés avec 240 μL d'éthanol absolu, vortexés 10 min puis centrifugés pendant 10 min à 10000 rpm. 50 μL de surnageant ont été prélevés, déposés dans des tubes en verre en duplicats puis évaporés au Speedvac pendant 15 min à 40°C. Les résidus secs ont été repris dans 100 μL de tampon PBS-G (tampon phosphate 0,05M pH 7,4, 9 g.L⁻¹ de NaCl, 1 g.L⁻¹ de NaN₃ et 1 g.L⁻¹ de gélatine) et vortexés. Les standards de calibration sont préparés en triplicats en utilisant du cortisol standard froid dilués dans du tampon PBS-G (9 points de 0,08 à 2 ng.100 μL^{-1}). Un tube sans cortisol froid (B0 : 0 ng.100 μL^{-1}) et un tube avec un excès de cortisol froid (NSB : 100 ng.100 μL^{-1}) dans du tampon PBS-G ont été également préparés. 100 μL d'une solution d'anticorps anti-cortisol au 1/5000 ont été ajoutés dans les tubes d'échantillon et de gamme. Les tubes ont été vortexés puis 100 μL de cortisol radiomarqué au H^3 à

A Le cortisol



B Principe du RIA



C Principe du protocole de dosage du cortisol par RIA

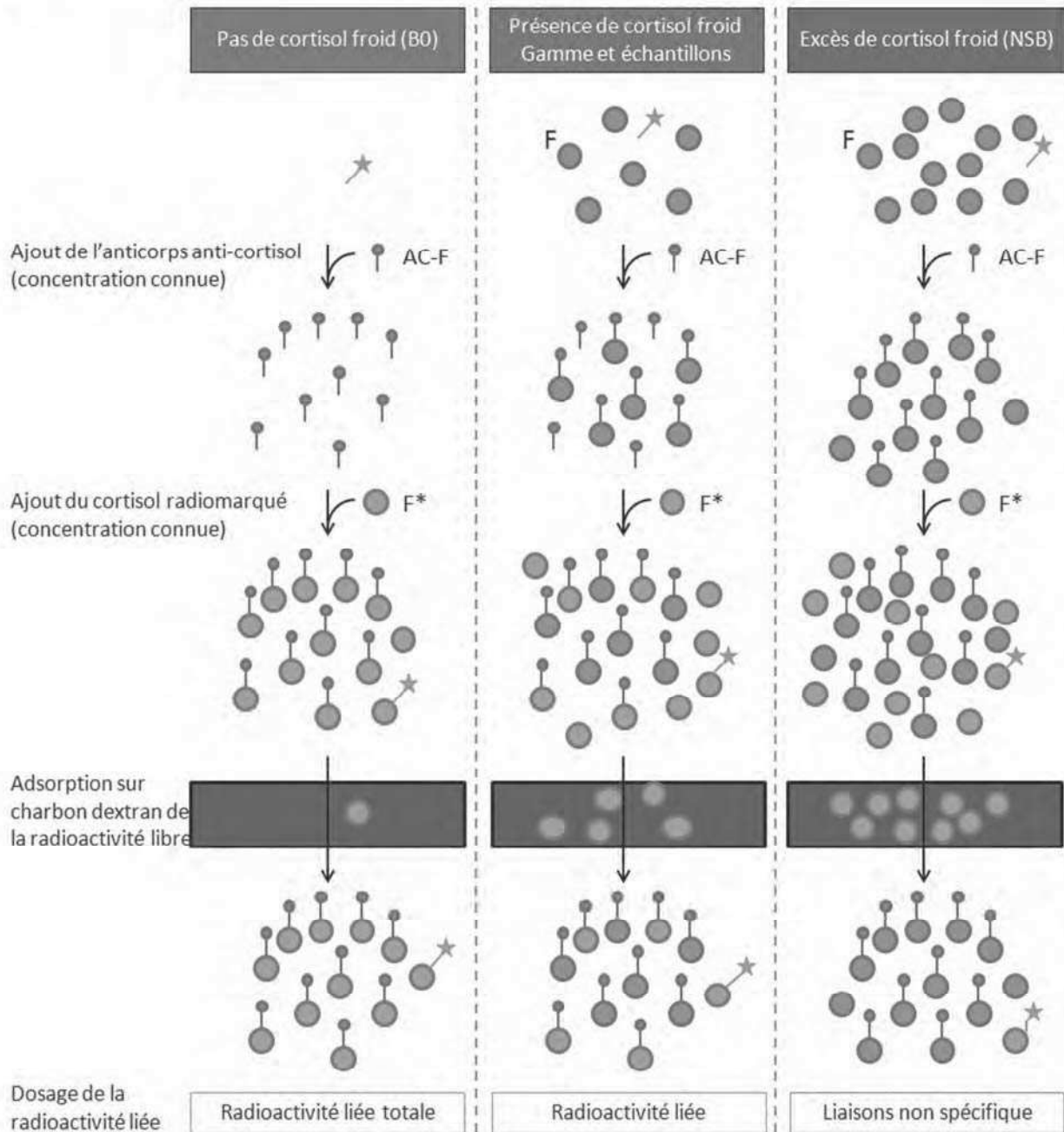


Figure 38. Principes du dosage du cortisol plasmatique par radio immunologie.

(A) Formule du cortisol. (B) Le dosage par radio immunologie (RIA) est basé sur la compétition de deux substances, le cortisol froid (F) et le cortisol marqué au H^3 (F*), pour l'anticorps anti-cortisol (AC-F). (C) Principes généraux du protocole de dosage du cortisol par RIA : le cortisol extrait du plasma est mélangé à une concentration connue d'anticorps et de cortisol marqué. Une fois les échanges équilibrés, la radioactivité libre est adsorbée sur charbon-dextran et la radioactivité libre est dosée. La radioactivité liée totale (B0) est mesurée en absence de cortisol froid et la radioactivité due à des liaisons non spécifiques est mesurée en présence d'un excès de cortisol froid (NSB).

10K cpm ont été ajoutés. Les tubes ont été agités doucement, placés dans un bain marie à 40°C pendant 20 min, puis laissés à incuber 2 heures à 4°C. La radioactivité libre (cortisol marqué non fixé à un anticorps) a ensuite été adsorbée sur du charbon-dextran au froid (travail dans de la glace fondante). Pour cela, 250 µL de solution de charbon-dextran (tampon PBS-G avec 0,5 g.L⁻¹ de dextran et 5 g.L⁻¹ de charbon) ont été ajoutés dans chaque tube. Les tubes ont été laissés à incuber 15 min au froid puis centrifugés 15 min à 3400 rpm, 4°C. Le surnageant a été recueilli par décantation dans des fioles de scintillation et mélangé avec 2,5 mL de liquide scintillant. La radioactivité (cpm) a été lue pendant 2 min en utilisant un compteur de scintillation.

3.5.3. Analyse des résultats

La concentration en cortisol, exprimée en ng.mL⁻¹ de plasma, a été calculée à partir de la courbe d'étalonnage et en prenant en compte la radioactivité liée totale (BO), les liaisons non spécifiques (NSB) et le facteur de dilution des échantillons de plasma.

3.6. PROTEOMIQUE-2D ET ANALYSE EN RESEAUX BIOLOGIQUES

3.6.1. Principes

L'analyse en protéomique a été réalisée au laboratoire GENPHYSE (ENSAT, Castanet). Les protéines ont été extraites puis séparées en 2 dimensions selon leur point isoélectrique (pH auquel la protéine a une charge nette nulle) et leur masse moléculaire sur des gels de SDS-PAGE en conditions dénaturantes. Les gels ont ensuite été scannés et comparés par un logiciel d'analyse d'image pour déterminer les variations de volume (i.e. aire x intensité) des spots de protéines entre les différentes conditions. Les spots différentiels ont été excisés, digérés avec de la trypsine et injectés au spectromètre de masse afin de déterminer leur composition peptidique. L'utilisation de bases de données en ligne permet ensuite de déterminer l'identité des protéines. Le nom des protéines ainsi que leur p-fold (i.e. taux de changement par rapport à la condition témoin) ont été entrés dans un logiciel de construction de réseaux biologiques afin de déterminer les fonctions biologiques impactées dans les différentes conditions.

3.6.2. Extraction des protéines

Les échantillons de foie ont été homogénéisés au Fastprep® dans 4 volumes (v/w) de 40mM Tris-HCl (pH 8.8), 2mM EDTA et d'inhibiteurs de protéases à 1 µL.mL⁻¹ de solution. Les homogénats ont été centrifugés à 10000g pendant 10min à 4°C. Un second cycle d'homogénéisation et de centrifugation a été réalisé dans les mêmes conditions puis les surnageants ont été stockés à -80°C. La concentration en

protéines a été quantifiée au Bradford sur microplaque au spectrophotomètre (FLUOstar OMEGA, BMG LABTECH).

3.6.3. Electrophorèse 2D

Les protéines ont été séparées dans la première dimension selon leur point isoélectrique par isoélectrofocalisation. Pour cela, 600µg de protéines ont été déposées sur des strips ReadyStrip™ (17cm, pH non linéaire 3-10, Biorad). Les protéines ont été ensuite séparées dans la deuxième dimension selon leur poids moléculaire par électrophorèse sur des gels de SDS-PAGE à 12% de polyacrylamide.

3.6.4. Alignement des gels et détermination des spots différentiels

Les spots de protéines ont été révélés à la solution de coloration de protéines PageBlue™ (ThermoScientific). Les gels ont ensuite été scannés et analysés en utilisant le logiciel Progenesis Samespots (Nonlinear Dynamics Ltd, Nonlinear USA Inc.). Les différents spots de protéines ont été détectés et alignés en superposant les gels 2 à 2. Pour chaque gel, le volume des spots (correspondant à l'aire x l'intensité) a été normalisé par rapport à l'intensité globale du gel pour éviter les variations inter-gel liée à la technique. La comparaison du volume normalisé des spots entre les groupes a été réalisée par des ANOVA associée à une procédure de contrôle de faux positifs de Benjamini-Hochberg (B-H) afin de déterminer les protéines différentielles (seuil de significativité : $p < 0,05$).

3.6.5. Excision des spots et séquençage des protéines

Les gels ont été rincés avec de l'eau milli-Q. Les spots différentiels ont été excisés puis décolorés dans 100 µL de tampon de 25mM NH_4HCO_3 à 5% d'acétonitrile pendant 30 min, puis deux fois 30 min dans 100 µL de tampon de 25mM NH_4HCO_3 à 50% d'acétonitrile. Les spots ont été déshydratés 10 min dans 200 µL d'acétonitrile à 100%. L'acétonitrile a été enlevé et les spots ont été séchés au Speedvac.

Les protéines ont été hydrolysées en peptides en utilisant 12 µL par spot de solution de 25mM NH_4HCO_3 à 12,5 ng.µl⁻¹ de trypsine. Après une nuit d'incubation, 9,6 µL d'acétonitrile à 100% ont été ajoutés et les peptides ont été extraits du gel par sonication pendant 5 min. Le surnageant a été transféré dans des vials à HPLC et séché pendant 10 min au Speedvac. Le résidu sec a été repris dans 8 µL de solution d'équilibration (H_2O /acide formique - 100/0,5).

Les échantillons ont été analysés en injectant 8 µL d'échantillon dans une nano HPLC Ultimate 3000 (Dionex) couplée *via* une source nano electrospray à un spectromètre de masse ION TRAP (LTQ velos, ThermoScientific). Les peptides ont été séparés selon leur hydrophobicité sur une colonne C18 (longueur de 15 cm et diamètre de 75 µm) en utilisant un gradient d'acétonitrile/eau à 0,5% d'acide

formique de 4 à 90% en 29 min (durée totale de 38 minutes). Les peptides ont été ionisés et analysés au spectromètre, en utilisant une gamme de scan de 400 à 4000 Da. Chaque analyse MS génère un spectre. Les cinq pics les plus intenses du spectre ont été ensuite analysés par MS/MS.

Les spectres Ms et MS/MS ont été analysés en utilisant le logiciel MASCOT et la base de données NCBI pour identifier les protéines (restriction taxonomique : *Carassius sp.* (ID: 7956), *Cyprinus carpio* (ID: 7962) and *Danio rerio* (ID: 7955)).

3.6.6. Analyse des réseaux biologiques

L'analyse en réseaux biologiques a été réalisée grâce le logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA[®], QIAGEN, Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity) en utilisant comme liste d'entrée les noms des gènes homologues¹² chez la souris (*Mus musculus*).

Pour chaque condition d'exposition aux pesticides et où à la température, le nom des gènes correspondant aux protéines différentielles ainsi que le p-fold (taux de changement) par rapport à la condition contrôle ont été soumis comme liste d'entrée. Le logiciel génère des réseaux biologiques et la liste des fonctions biologiques et toxicologiques associées aux protéines régulées en se basant sur la littérature scientifique.

Les données produites par l'analyse sont, pour chaque condition :

- Les voies canoniques impliquées
- Les fonctions biologiques affectées
- La liste de maladies et désordres physiologiques

Le logiciel a également permis de comparer les conditions entre elles. Chaque sortie du logiciel est accompagnée d'une valeur statistique (p-value) calculée par un test exact de Fisher. L'analyse statistique intègre le nombre de molécules régulées qui contribuent à la fonction/voie/maladie au regard au nombre total de molécules connues pour y être associées. La p-value est la probabilité que la voie canonique, la fonction biologique ou toxicologique soit surreprésentée par hasard. Par conséquent, plus la p-value est faible et plus l'association entre la liste de protéines et la voie est significative. Une p-value de 0,05 a été considérée comme la limite de signification.

¹² Les protéines ou gènes homologues sont des protéines/gènes ayant un ancêtre commun et qui ont été conservés chez des espèces différentes, avec des séquences proches et (le plus souvent) les mêmes fonctions.

3.7. ANALYSE EN METABOLOMIQUE

3.7.1. Principes

Les analyses RMN-¹H ont été effectuées sur la plateforme MetaToul-AXIOM de l'UMR ToxAlim (Toulouse, France). La métabolomique non ciblée permet d'étudier les variations de concentration de molécules endogène de faible poids moléculaire, les métabolites, en réponse à des stress environnementaux variés. Les métabolites apolaires (sucres et acides aminés) ont été extraits dans les foies des poissons puis analysés par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN-¹H).

La résonance magnétique nucléaire est une des propriétés des noyaux atomiques possédant un spin nucléaire non nuls (i.e. le ¹H, le ¹³C ou encore l'¹⁷O) lorsqu'ils sont placés dans un champ magnétique. Ces noyaux absorbent les rayonnements électromagnétiques auxquels ils sont soumis et les relâchent lors de la relaxation pour retourner à leur état initial, phénomène que l'on appelle la résonance. La fréquence de résonance est spécifique à chaque isotope, permettant de cibler l'analyse RMN sur un élément précis (ici le ¹H). Toutefois cette fréquence dépend également du champ magnétique appliqué et de l'environnement de l'atome qui influe sur l'effet d'écran (champ magnétique local créé par le mouvement des électrons autour du noyau). L'amplitude de cet effet d'écran dépend notamment des liaisons chimiques de l'atome avec d'autres molécules. Le déplacement chimique de la fréquence de résonance donne ainsi des informations sur la nature et le nombre d'atomes voisins des noyaux ciblés, les liaisons chimiques ou encore la conformation moléculaire.

Ce phénomène de résonance est utilisé aussi bien en médecine (imagerie par résonance magnétique IRM) qu'en physique, chimie ou biochimie (spectroscopie de résonance magnétique nucléaire). Dans la spectroscopie RMN, les échantillons sont soumis à une courte impulsion d'onde électromagnétique radiofréquence et le signal obtenu lors de la phase de relaxation (Free Induction Decay (FID)) est acquis et analysé par transformation de Fourier. Les spectres générés sont traités par des logiciels spécialisés et des analyses statistiques multivariées pour observer les différences entre les groupes. Les métabolites différentiels sont ensuite identifiés.

3.7.2. Protocole

3.7.2.1. **Extraction des métabolites**

Les échantillons de foie ont été broyés au vibro-broyeur à bille Retsch[®] MM 400 (30 secondes à 30 Hz) sous azote liquide puis pesés à l'aide d'une balance de précision (au mg). Les tubes ont été conservés à -80 °C ou dans de l'azote liquide pendant les phases de préparations.

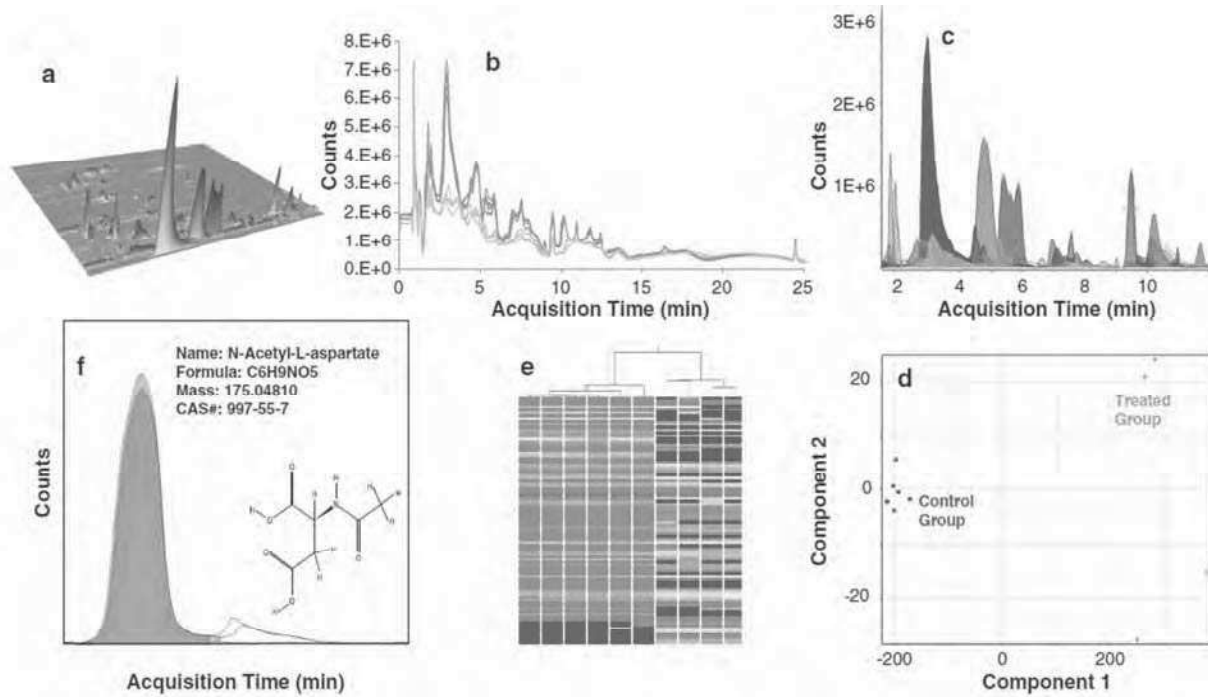


Figure 39. Principes de l'analyse des données générées par l'analyse non ciblée du métabolome par résonance magnétique nucléaire.

Après extraction, les échantillons sont injectés dans un spectromètre de masse. Pour chaque échantillon, les données sont généralement représentées sous forme (A) de chromatogrammes qui sont des matrices 3D de la masse, du temps de rétention et de l'intensité de chaque signal ou (B) de spectres représentant l'intensité des signaux en fonction du temps de rétention. (C) Les spectres obtenus pour chaque échantillon sont traités, phasés et calibrés pour être comparables entre eux. Des analyses multivariées telles que l'analyse en composante principale (D) ou l'analyse en cluster (E) permettent de déterminer la similarité et/ou la variabilité entre les groupes. (F) les métabolites différentiels sont identifiés et peuvent être utilisés dans des analyses d'enrichissement de voies métaboliques. Tiré de Bouhifd et al. 2013 [529].

Afin d'optimiser l'extraction des métabolites, plusieurs protocoles d'extractions adaptés à partir de Lin et al. (2007 [427]) et Wu et al. (2008 [428]) ainsi que plusieurs masses de tissus ont été testés (Figure 40) :

- acétonitrile/eau (2/1 ; v/v) (AW) ;
- méthanol/eau (2/1 ; v/v) (MW) ;
- Blight & Dyer (BD) : chloroforme (CH₂Cl₂)/méthanol/eau (2/2/1,8 ; v/v/v) ;
- TwoStep (TS) : chloroforme/méthanol/eau (2/2/1,8 ; v/v/v) ; avec ajout du chloroforme en une seule fois.

Pour les protocoles TS et BD, trois masses de foie ont été testées : 20 mg, 50 mg et 100 mg. Pour les extractions AW et MW une seule masse (100 mg) a été testée. Les différentes combinaisons *protocoles*masse* ont été testés sur un seul pool d'échantillons divisé en 5 réplicats (Figure 40). Pour chaque protocole le rendement et la répétabilité ont été mesurés et comparés. Le protocole représentant le meilleur rapport rendement/reproductibilité est le TwoStep-50 mg. Ces résultats sont concordants avec ceux publiés [427,428].

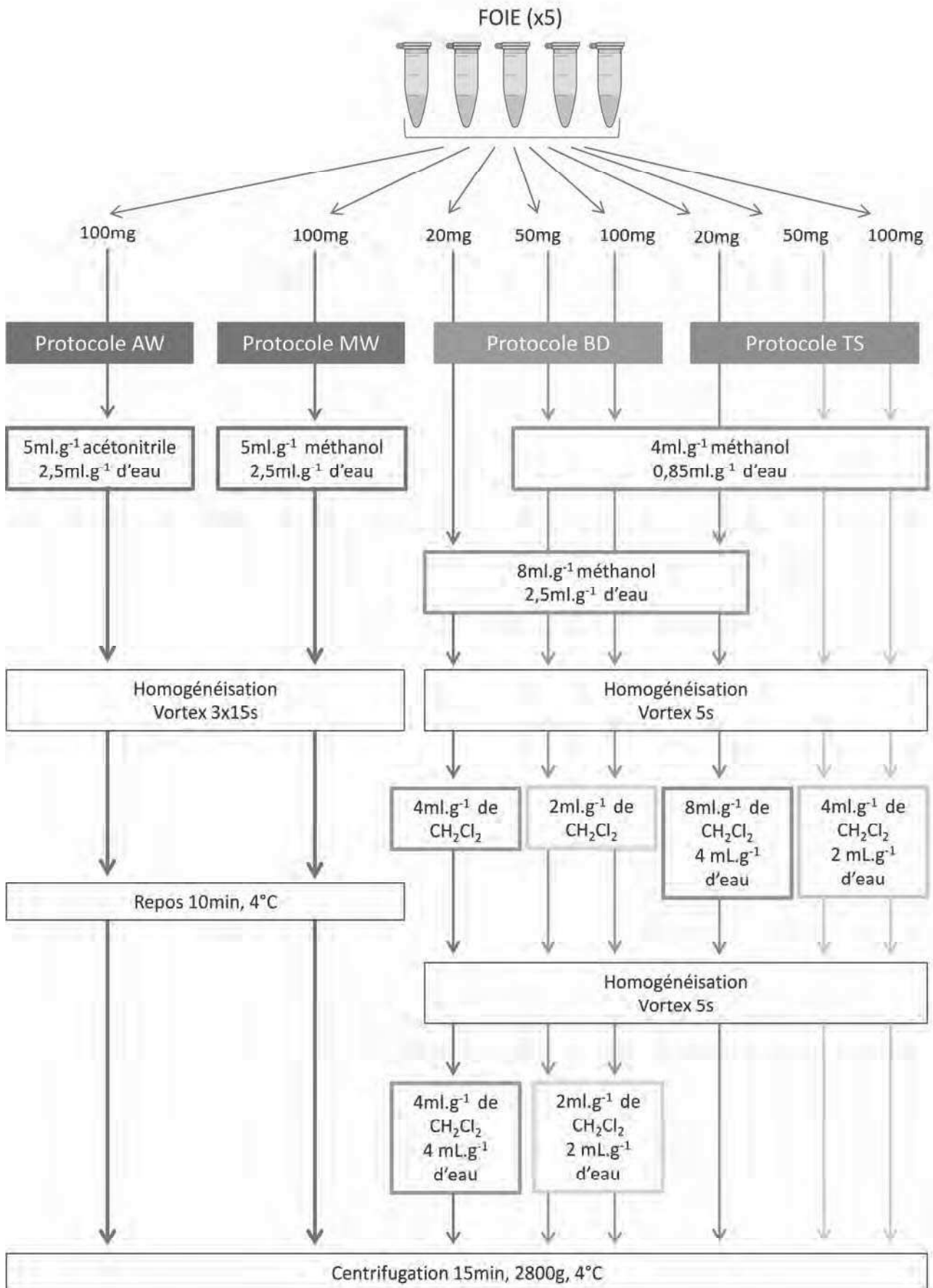


Figure 40. Protocoles d'extraction des métabolites testés

AW : Acétonitrile/Eau ; MW : Méthanol/eau ; BD : Blight&Dyer ; TS : TwoStep.

Selon le protocole TwoStep-50 mg, 50 mg de poudre de tissu ont été mélangé à 4 mL de méthanol et 0,85 mL d'eau milli-Q par gramme d'échantillon. Les échantillons ont ensuite été homogénéisés au Fastprep® puis vortexés 5s. Ensuite, 4 mL.g⁻¹ de chloroforme et 2 mL.g⁻¹ d'eau ont été ajoutés dans les tubes. Les échantillons ont été vortexés 5s à nouveau, laissés 15 min à 4 °C puis centrifugés 15 min à 2800 g. Le surnageant a été prélevé et stocké à -20 °C avant évaporation.

3.7.2.2. Analyse en RMN-H⁺ et prétraitement des spectres

Les échantillons ont été évaporés au SpeedVac puis repris dans 800 µL de tampon de sodium phosphate dans du D₂O contenant du triméthylsilylpropanoate de sodium (TMSP – standard de calibration interne). 600 µL ont été prélevés dans des tubes RMN de 5mm. Les spectres ont été acquis à 600MHz avec un spectromètre Advance 600 (Bruker, Coventry, UK) muni d'un passeur d'échantillon SampleJet, en utilisant une séquence NOESY

Tableau 7. Paramètres d'acquisition des spectres 1D en RMN-H⁺

Paramètres	Valeurs
Temps de mélange	100ms
Pulse (p1)	7,95µs
Délai de relaxation (d1)	2s
Temps d'acquisition	2,72s
Largeur spectrale	20ppm

pour supprimer le signal de l'eau. Pour les spectres 1D, 256 mesures du signal ont été réalisées en 64K points avec les paramètres présentés dans le Tableau 7 en utilisant le logiciel d'acquisition TOPSPIN v2.1 (Bruker, Coventry, UK). Les spectres ont été prétraités *via* une transformation de Fourier de la décroissance libre du signal acquis (Free Induction Decay), puis calibrés à 0,00 ppm à l'aide du signal du TMSP (standard interne). La ligne de base a été corrigée.

3.7.2.3. Traitement des spectres et bucketting

Le spectre RMN-¹H a été analysé entre 0,5 et 9,4 ppm et divisé en buckets de largeur variable grâce au logiciel AMIX (Bruker, Coventry, UK). 102 buckets ont été ainsi découpés de manière à prendre chaque signal en entier. Les buckets ont été intégrés en calculant l'aire sous la courbe et les données ont été normalisées par rapport à l'intensité totale du spectre.

3.7.3. Traitement des données

Les données ont été ensuite standardisées (i.e. centrage et standardisation de Pareto) puis analysées par des méthodes multivariées telles que la PLS-DA (Régression des moindres carrés partiels - Analyse discriminante) et l'A-SCA (ANOVA et Analyse en Composante simultanées). Ces analyses ont été réalisées à l'aide du logiciel SIMCA-P v13.0 et MATLAB. L'A-SCA a été utilisée pour déterminer l'effet des pesticides, de la température et de la durée d'exposition sur la réponse globale du métabolome. Une p-value de 0,05 a été fixé comme seuil de significativité. Puis une analyse en PLS-DA a été réalisée à chaque temps d'exposition pour observer la séparation entre les groupes. Un filtre OSC a été utilisé en amont de l'analyse, permettant de diminuer la variabilité analytique et biologique qui n'est pas liée à l'effet de la condition d'exposition [429]. La valeur de Q₂ représente la capacité prédictive du modèle,

avec un seuil de 0,4 nécessaire pour valider le modèle. La robustesse des modèles a également été testée à l'aide d'un test de permutation de 200 itérations. L'origine de la droite générée par le test de permutation doit être négative pour valider le modèle. Le VIP (Variable Importance in Projection) représente le poids de chacune des variables dans les différentes composantes du modèle. Un seuil de 1,5 est fixé pour déterminer les buckets discriminants. Les comparaisons entre les différentes conditions ont été réalisées pour chaque bucket discriminant sous R par des tests de Kruskal-Wallis.

3.7.4. Identification et validation

L'identification des métabolites a été réalisée grâce aux banques de données "Biological Magnetic Resonance Data Bank" www.bmrb.wisc.edu/ et "Human Metabolome Database" www.hmdb.ca/.

3.8. ANALYSES STATISTIQUES

En dehors des analyses statistiques spécifiques à certains paramètres mesurés et développées dans les parties correspondantes, trois grands types d'analyses ont été réalisés pour évaluer l'effet des pesticides et de la température sur les différents marqueurs.

- L'effet d'interaction entre les pesticides et la température est évalué par des ANOVAs factorielles univariées et multivariées.
- Les comparaisons entre les groupes sont réalisées soit par des tests post hoc LSD de Fisher soit par des tests de Kruskal-Wallis et Mann & Whitney si les variances ne sont pas homogènes.
- La séparation entre les groupes est observée grâce à des analyses exploratoires multivariées telles que l'analyse en composante principale (ACP) ou en analyse canonique associée au calcul de distances de Mahalanobis.

CHAPITRE 3.

Réponses comportementales et physiologiques

RESUME DU CHAPITRE

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer les effets individuels et combinés d'un cocktail de pesticides à des concentrations réalistes et d'une augmentation de la température dans la gamme de tolérance thermique du carassin doré (*Carassius auratus*) sur des traits comportementaux et physiologiques à travers :

- (1) un comportement complexe ayant des implications écosystémiques, le remaniement sédimentaire (Article 1) ;
- (2) plusieurs traits comportementaux sous-jacents au remaniement sédimentaire et impliqués dans la survie et la fitness des poissons : la locomotion, l'alimentation et le comportement exploratoire (Complément 1) ;
- (3) les effets sur la condition générale des poissons, les réserves énergétiques et l'investissement énergétique dans la reproduction (Article 1 et Complément 1).

Dans un contexte de changement global, la question des effets croisés entre la pollution de l'environnement par des contaminants chimiques (e.g., les pesticides) et les changements climatiques (e.g., augmentation de la température) se pose de plus en plus [12–14]. L'interaction entre les contaminants et la température de l'eau est particulièrement problématique pour les espèces poïkilothermes (i.e., animaux ayant une température corporelle qui varie avec celle de leur milieu) comme les poissons dans la mesure où la température affecte directement le métabolisme basal et actif et intervient dans la grande majorité des processus biochimiques et physiologiques [21–24]. La mise en place des systèmes de défenses face à un stress (e.g., détoxification, protection, réparation) a un coût métabolique supporté par des compromis énergétiques avec l'activité (e.g. la locomotion), la croissance et la reproduction [114,430,431]. En modifiant les capacités métaboliques des organismes, la température peut modifier la capacité des organismes à répondre efficacement aux contaminations chimiques, et *vice-versa* [13,25,26]. La grande majorité des études montre ainsi un effet synergétique¹³ de la température sur la toxicité des polluants, notamment chez les espèces aquatiques [12–14]. Inversement, la présence de polluants peut affecter la tolérance thermique des poissons [13,24].

La toxicité des herbicides à des concentrations environnementales sur les vertébrés est largement controversée [5,204,205]. La très grande majorité des études se porte sur les effets d'un seul herbicide,

¹³ L'interaction de deux stress peut être de type additif (effets égaux à la somme des effets individuels), synergétique (effet supérieur à la somme des effets individuels) ou antagoniste (effet inférieur à la somme des effets individuels).

et les effets des mélanges complexes que l'on retrouve dans l'environnement sont très peu connus. Ce manque de connaissances sur les effets des mélanges de contaminants peut conduire à une sous-estimation importante des effets des polluants, et notamment des herbicides, pour la faune sauvage [9,10]. De plus, si plusieurs études ont montré une augmentation de la toxicité aiguë des pesticides chez les poissons avec la température [13,14], les effets de la température sur la toxicité de mélanges complexes à des concentrations sub-léthales sont eux aussi très peu étudiés. Ces effets cocktails et multi-stress constituent ainsi un enjeu important en écotoxicologie [311].

Sensibles, rapides et liant les réponses physiologiques et moléculaires aux réponses observées à des niveaux d'organisation biologiques plus élevés, les bio-essais comportementaux sont utilisés pour évaluer les effets d'un grand nombre de stress [108,432–434]. Chez les poissons, le comportement répond à des concentrations en polluants souvent bien inférieures à celles entraînant une toxicité et est particulièrement dépendant de la température [108,145,329]. Les réponses comportementales à un stress peuvent être de nature adaptatives quand elles permettent de diminuer soit l'exposition à la source de stress soit les potentiels effets délétères de ce facteur de stress (réponse « fight or flight » qui constitue la première phase du syndrome d'adaptation générale au stress [18,20]). Le changement de comportement peut également résulter de perturbations métaboliques, neurologiques, endocrines ou sensorielles liés à l'exposition au stress [300,435]. Ces changements comportementaux peuvent à leur tour altérer la capacité des organismes à se reproduire ou même survivre dans leur environnement (e.g. à éviter la prédation, à se nourrir), avec des conséquences potentielles sur les communautés et les chaînes trophiques [196]. Les contaminations à des niveaux de concentrations très faibles peuvent ainsi entraîner une « mort écologique » lorsqu'elles perturbent des comportements complexes et compromettent la survie et la performance des individus [436].

Le remaniement sédimentaire par les espèces aquatiques a des répercussions importantes sur les paramètres physico-chimiques des sédiments et des milieux hyporhéïques et joue par conséquent un rôle crucial dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques [437]. Bien que largement sous-estimés, les poissons sont des acteurs importants de la bioturbation des sédiments [437,438], de sorte que tout changement dans leur comportement peut impacter les échanges verticaux dans les systèmes aquatiques [439]. Malgré son rôle écosystémique majeur, très peu d'études ont cherché à évaluer les effets de contamination de l'environnement sur le comportement de remaniement sédimentaire des poissons. Pour comprendre les effets des pesticides et de la température sur le comportement de remaniement sédimentaire, plusieurs traits comportementaux sous-jacent ont également été évalués [437,440–442] : la locomotion, le comportement exploratoire et le comportement alimentaire. Ces traits comportementaux reflètent également la capacité des organismes à éviter les prédateurs, à s'adapter à un nouvel environnement et à se nourrir [443–445]. Une perturbation de ces

comportements peut par conséquent entraîner des effets délétères sur la fitness et finalement la survie des individus [446,447]. Par ailleurs, la réponse comportementale au stress est liée à des compromis énergétiques entre maintenance, activité, reproduction, croissance et stockage de l'énergie [145]. Les effets des pesticides et de la température sur la balance énergétique sont donc étudiés à travers différents traits physiologiques liés au métabolisme énergétique (indice hépatosomatique et concentrations en protéines dans le foie et les muscles), à la reproduction (indice gonadosomatique) et à la condition générale des individus (perte de poids et indice de condition).

Le design expérimental ainsi que les différents protocoles d'exposition et d'analyse sont présentés en détails dans le chapitre 2 de ce manuscrit de thèse. Brièvement, les carassins dorés sont stabulés à 18 °C pendant un mois puis acclimatés à deux températures (22°C et 32°C) pendant deux semaines à raison d'1°C d'augmentation par jour. Ces températures sont dans la gamme de tolérance de l'espèce et sont réalistes du sud-ouest de la France où cette espèce est bien présente. Les poissons sont ensuite exposés individuellement et à jeun pendant 96h à un cocktail de pesticides représentatif de la contamination environnementales du sud-ouest composé de six herbicides (S-métolachlore, déséthyl-atrazine, isoproturon, linuron, aclonifen et pendiméthaline) et d'un fongicide (tébuconazole) selon trois modalités : TEMOIN : 0 µg.L⁻¹, faible dose (LD) : 8,4 µg.L⁻¹ et forte dose (HD) : 42 µg.L⁻¹ en concentrations totales.

Les résultats montrent qu'une exposition de courte durée à ce cocktail de pesticides a des effets sur le comportement, le statut physiologique et la reproduction du carassin doré. Cet effet dépend à la fois de la concentration des pesticides et de la température de l'eau. Plusieurs hypothèses qui peuvent être non exclusives permettent d'expliquer les différentes réponses observées :

Le mélange de pesticides à 22°C entraîne une diminution du comportement de remaniement sédimentaire dès 24h (à la LD et HD), une diminution du comportement locomoteur et exploratoire et l'augmentation de l'alimentation (à la HD), l'utilisation des réserves énergétiques et la diminution de l'investissement énergétique dans la reproduction (surtout à la LD).

H1 : Réponse adaptative au stress : les pesticides entraînent l'induction des systèmes de défense et donc une augmentation de la demande énergétique. Le coût métabolique est supporté par l'utilisation des réserves énergétiques et une réallocation de l'énergie utilisées par les processus non vitaux (e.g. exploration, recherche alimentaire, reproduction) vers la maintenance, le maintien de l'homéostasie et/ou la réparation des dommages (i.e. compromis métaboliques) [17,18,144,145,430].

H2 : Effets toxiques : le mélange de pesticides entraîne des dommages histopathologiques sur les branchies [289,294–296], le foie [240,291] et les gonades [448], diminuant respectivement les

capacités métaboliques des poissons, la régulation des voies métaboliques et la production d'énergie et la reproduction.

L'augmentation de la température entraîne une augmentation de l'activité générale (i.e. locomotion, exploration, alimentation) mais une diminution du comportement de remaniement sédimentaire, l'utilisation des réserves énergétiques hépatiques et musculaires, l'augmentation de la synthèse de protéines dans le foie et la diminution de l'investissement énergétique dans la reproduction :

H1 : **Augmentation de la capacité métabolique aérobie avec la température**, ce qui entraîne une augmentation de l'activité générale et de la demande énergétique qui sont compensées par l'utilisation des réserves énergétiques, l'augmentation de l'alimentation et des compromis énergétiques avec la reproduction [23,329,393,449–452].

H2 : **Induction des systèmes de défenses contre le stress thermique** (e.g. HSPs et antioxydants) dans le foie dont le coût métabolique est supporté par l'utilisation des réserves énergétiques non protéiques du foie et les réserves protéiques musculaires [342].

H3 : **Insuffisance en oxygène** : la diminution de l'oxygène dissous combinée à l'augmentation du besoin en oxygène pour le métabolisme aérobie modifie la position du poisson dans la colonne d'eau, entraînant une diminution du remaniement sédimentaire bien que l'activité générale augmente [94].

L'augmentation de la température et l'exposition aux pesticides combinés entraînent la diminution de l'activité de locomotion et d'exploration, mais ont un effet antagoniste sur l'ensemble des réponses physiologiques avec un effet combiné inférieur aux effets individuels :

H1 : **Modification du comportement**, de la biodisponibilité et /ou de la toxicité des molécules sous l'effet de la température [12,13].

H2 : **Diminution de la sensibilité des individus** au stress chimique par (1) l'augmentation de la métabolisation, de la détoxification et de l'excrétion des polluants [12,13], (2) l'induction de systèmes de défense polyvalents [453] ou (3) l'inhibition de la réponse des hormones de stress sous l'effet de l'augmentation de la température [29].

H3 : **Augmentation du coût métabolique de la défense** contre les pesticides et donc la demande énergétique sous l'effet de la température plus élevée [26]. La demande énergétique dépasse les capacités métaboliques de compensation de l'organisme, qui passe d'une stratégie de compensation métabolique à une stratégie de conservation caractérisée par un arrêt métabolique (diminution du taux métabolique et de la capacité métabolique aérobie, stockage de l'énergie résiduelle sous forme de réserves) [150].

Cette dernière hypothèse est la seule permettant d'expliquer l'inhibition de la réponse physiologique aux deux stress. Par conséquent, l'action antagoniste des pesticides et de la température sur la réponse

métabolique peut paradoxalement indiquer une augmentation du stress subis par les poissons, avec le passage d'une stratégie de compensation métabolique à une stratégie de conservation, non soutenable sur le long terme (i.e., entraînant la mort de l'animal). Cette hypothèse suggère ainsi que l'augmentation de la température diminue les limites de tolérance des poissons face à la contamination de l'eau par les pesticides [150,151], ce qui soulève de nombreuses questions quant à la conservation des populations de poissons sauvages soumis aux changements globaux.

Les résultats indiquent que la balance énergétique est grandement impliquée dans la réponse aux pesticides comme à l'augmentation de la température, avec des modifications des processus produisant et consommant de l'énergie. Les effets observés sur le comportement, la condition et la reproduction peuvent être en grande partie expliqués par des modifications du métabolisme basal et actif et des compromis énergétiques. Toutefois des analyses complémentaires sont en cours pour déterminer la présence de dommages sur les branchies, le foie et les gonades.

Le foie, organe central de la régulation du métabolisme énergétique et de la détoxification des substances chimiques, est particulièrement impliqué dans la réponse aux stress chimiques et thermique, avec des réponses contrastées selon la nature du stress. Afin de confirmer et d'approfondir les résultats obtenus, des analyses au niveau moléculaire de type protéomique sont nécessaires pour déterminer (1) quelles sont les voies métaboliques impliquées tant dans la stratégie métabolique de compensation que de conservation, (2) l'induction de systèmes de défense sous l'effet des stress individuels et combinés, et (3) l'apparition potentielle de signes précoces d'hépatotoxicité.

ARTICLE 1

Environmental Science and Pollution Research. Vol 3 (10): 3323-3331.

Multi-stress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism

Gandar Allison ^{a,b}, Jean Séverine ^{a,b}, Canal Julie ^{a,b}, Marty-Gasset Nathalie ^{c,d}, Gilbert Franck ^{b,e}, Laffaille Pascal ^{a,b}

^a Université de Toulouse ; INPT, UPS ; EcoLab, ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France. ^b CNRS ; UMR 5245 EcoLab, 31062 Toulouse, France. ^c Université de Toulouse ; INPT, ENSAT; UMR 1388 GenPhySE (Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage), F-31326 Castanet-Tolosan, France. ^d INRA ; UMR 1388 GenPhySE, F-31326 Castanet-Tolosan, France. ^e Université de Toulouse ; INPT, UPS ; EcoLab (Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

Multistress effects on goldfish (*Carassius auratus*) behavior and metabolism

Allison Gandar^{1,2} · Séverine Jean^{1,2} · Julie Canal^{1,2} · Nathalie Marty-Gasset^{3,4} · Franck Gilbert^{2,5} · Pascal Laffaille^{1,2}

Received: 17 April 2015 / Accepted: 3 August 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Crossed effects between climate change and chemical pollutions were identified on community structure and ecosystem functioning. Temperature rising affects the toxic properties of pollutants and the sensitiveness of organisms to chemicals stress. Inversely, chemical exposure may decrease the capacity of organisms to respond to environmental changes. The aim of our study was to assess the individual and crossed effects of temperature rising and pesticide contamination on fish. Goldfish, *Carassius auratus*, were exposed during 96 h at two temperatures (22 and 32 °C) to a mixture of common pesticides (S-metolachlor, isoproturon, linuron, atrazine-desethyl, acclonifen, pendimethalin, and tebuconazol) at two environmentally relevant concentrations (total concentrations MIX1=8.4 µg L⁻¹ and MIX2=42 µg L⁻¹). We investigated the sediment reworking behavior, which has a major ecological functional role. We also focused on three physiological traits from the cellular up to the whole individual level

showing metabolic status of fish (protein concentration in liver and muscle, hepatosomatic index, and Fulton's condition factor). Individual thermal stress and low concentrations of pesticides decreased the sediment reworking activity of fish and entrained metabolic compensation with global depletion in energy stores. We found that combined chemical and thermal stresses impaired the capacity of fish to set up an efficient adaptive response. Our results strongly suggest that temperature will make fish more sensitive to water contamination by pesticides, raising concerns about wild fish conservation submitted to global changes.

Keywords Global change · Temperature warming · Pesticides · Fish · Bioturbation

Introduction

Agricultural and industrial development has led to a multiplication of pollutants in aquatic and terrestrial ecosystems that may have noxious effects on wildlife and community structures. In field, interactions between contaminants may occur and knowledge lacks about combined effects of these pollutants (Celander 2011). Aquatic ecosystems, which being the final receptacle of many pollutants, are particularly vulnerable to these interactions. France is the fourth largest consumer of pesticides, and chronic contamination of surface water is reported by water quality monitoring programs (CGDD 2011).

At the same time, climate change has been identified as one of the major drivers of ecosystem functioning in the coming decades (Drinkwater et al. 2010). In addition, the modifications in temperature, oxygenation, and acidity patterns may alter the occurrence and the behavior of pollutants (see reviews in Schiedek et al. 2007; Noyes et al. 2009; Holmstrup et al. 2010). They may also alter organism sensitiveness to

Responsible editor: Cinta Porte

✉ Allison Gandar
allison.gandar@gmail.com

✉ Séverine Jean
severine.jean@ensat.fr

¹ Université de Toulouse; INPT, UPS; EcoLab, ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France

² CNRS; UMR 5245 EcoLab, 31062 Toulouse, France

³ Université de Toulouse; INPT, ENSAT; UMR 1388 Génétique, Physiologie et Systèmes d'Élevage (GenPhySE), 31326 Castanet-Tolosan, France

⁴ INRA; UMR 1388 GenPhySE, 31326 Castanet-Tolosan, France

⁵ Université de Toulouse; INPT, UPS; Laboratoire Ecologie Fonctionnelle et Environnement (EcoLab), 118 Route de Narbonne, 31062 Toulouse, France

pollutants and even lead to multiple stress effects if they exceed acclimation limits (Noyes et al. 2009; Kennedy and Ross 2012). Inversely, chemical exposures may decrease the resistance of organisms and so their adaptive potential to environmental changes (Noyes et al. 2009). Consequently, importance of crossed effects between climate and pollutions of contaminants has been identified, both on distribution and abundance of species and on ecosystem functioning (Dossena et al. 2012). However, studies on crossed effects between climate change (e.g., temperature) and pesticides on wildlife are often limited (but see Noyes et al. 2009 and citations therein).

Contaminant–temperature interaction is particularly worrying for aquatic ectothermic species (e.g., fish), as the water temperature directly affects their basal and active metabolisms and intervenes in many of biochemical and physiological processes (Cech et al. 1985; López-Olmeda and Sánchez-Vázquez 2011; Manciocco et al. 2014). Pesticides may affect survival, reproduction, and growth of a wide range of aquatic species (Sekine et al. 1996; Graymore et al. 2001; Hayes et al. 2006). In fish, they may induce neurotoxicity, oxidative damages, and genotoxicity and disturb immune system and organ integrity (Polard et al. 2011; Keith et al. 2014). Establishing molecular defense systems (e.g., detoxification, reparation, and protection) has an energetic cost and leads to metabolic compensations (Handy et al. 1999; Marchand et al. 2004). By modifying metabolic rates, the temperature may alter the ability of fish to respond efficiently to chemical stresses (Lemly 1996; Noyes et al. 2009; Kennedy and Ross 2012). Inversely, the metabolic cost of the pollutant exposure may disturb molecular and physiological acclimation process to thermal changes (Gordon 2005; López-Olmeda and Sánchez-Vázquez 2011).

Metabolic, neurological, endocrine, and/or sensory perturbations affect the behavior of fish (Saglio and Trijasse 1998; Cook and Moore 2008). Behavioral changes may, in turn, alter predation avoidance, competitiveness, and ability to feed of fish, with likely consequences on communities and trophic chains (Graymore et al. 2001). Responsive, rapid, linking molecular and physiological responses to highest biologic levels, behavioral bioassays were so used to assess the effect of wide range of stress (Killen et al. 2012; Grassie et al. 2013; Melvin and Wilson 2013).

Sediment reworking by fish is the consequence of foraging activity, reproduction, and/or predator avoidance behavior (Reise 2002; De Vries 2012; Shirakawa et al. 2013) or simply results of swimming movements near the ground (Montgomery et al. 1996). Temperature is considered as the “abiotic master factor” influencing the behavior of fish (Brett 1971), and a significant effect of the temperature warming on the sediment reworking by fish was demonstrated in several freshwater species (Canal et al. 2015). In addition, contaminations at sub-lethal levels may cause “ecological death,”

which occurs when disruption on complex behaviors compromises individual survival and performance (Scott and Sloman 2004). The sediment bioturbation by aquatic species has substantial impacts on the streambed physicochemistry parameters and plays a critical role in aquatic system functioning (Shirakawa et al. 2013). Fish are important actors, although generally underestimated, of this sediment bioturbation (Shirakawa et al. 2013; Peoples et al. 2014), so any changes in their sediment reworking behavior can have deleterious effects on aquatic system functioning (Ieno et al. 2006).

To our knowledge, no study has yet investigated the effects of the water contamination by realistic pesticide cocktails on the sediment reworking by fish, despite its major ecosystemic role. The aim of this study was so to assess the effects of pesticide exposure and temperature rising on fish sediment reworking behavior. We also tested the hypothesis that metabolic perturbations can partly explain the behavioral changes observed.

The goldfish (*Carassius auratus*, Linnaeus 1758, Cyprinidae family) is an Asiatic species introduced in French lentic water areas during the twentieth century (e.g., ponds, backwaters of rivers, floodplain waterbody) (Keith et al. 2011). Moreover, its use in ecotoxicological tests is growing fast (Bretaud et al. 2000; Cavas and Konen 2007; Feng et al. 2013). Fish were exposed to a mixture of pesticides found in the rivers of the south-west France at two different environmental relevant concentrations (S-metolachlor, isoproturon, linuron, tebuconazol, aclonifen, atrazine-desethyl, and pendimethalin for total concentrations of 8.4 and 42 $\mu\text{g L}^{-1}$). Experiments were conducted at two realistic water temperatures which occur in this area (22 and 32 °C). Sediment reworking behavior was followed during 96 h, and physiological endpoints were assessed at the end (Fulton’s condition factor (FCF), hepatosomatic index (HSI), and protein concentrations in liver and white muscle).

Material and methods

Fish species and acclimation

Fish were purchased from the fish farming Carpio (Consac, France) in the size range 10–12 cm. They were first acclimatized for 2 weeks in opaque tanks under controlled conditions (18 °C with a 12:12-h light regime). Water was aerated and dechlorinated prior to fish introduction. Half of the water was renewed every day, and fish were fed daily with commercial pellets. They were gradually acclimatized to experimental temperatures during 15 days. The temperature was increased by 0.5 °C every 12 h until reaching the experimental temperature. Three days before the experiment, fishes were starved to optimize their foraging behavior during the experimental period. No mortality occurred during the acclimation period.

Mixtures of pesticides

The mixtures were developed on the basis of the pesticide contamination of the Save River (France), assessed from March 2008 to November 2009 (Polard 2011). The Save River watershed, located in the Gascogne area, is mainly used for intensive agriculture (corn, wheat, and sunflower). High contamination levels of surface waters and sediment by triazines (atrazine, DEA, cyanazine), ureas (isoproturon, linuron, chlorotoluron), and anilides (metolachlor, metazachlor) have been reported in the Gascogne area during spring flood (Devault et al. 2009; Polard et al. 2011). According to the analysis conducted by Pollard (2011), we selected six herbicides and one fungicide using three criteria: the frequency of detection, the concentration, and the representation of the different families of molecules detected. Selected molecules are S-metolachlor, isoproturon, linuron, tebuconazol, aclonifen, atrazine-desethyl, and pendimethalin (cf. Table 1). Pesticide standards were diluted in acetone (0.3 mL L⁻¹ of water) and demineralized water to obtain two mixtures: MIX1 and MIX2 for total concentrations of 8.4 and 42 µg L⁻¹, respectively. The proportions between the molecules, calculated from analysis conducted by Polard (2011), are preserved in the two mixtures. The MIX1 concentrations correspond to the highest level of contamination observed not only in the Save river after spring flood (Polard 2011), but also in other French rivers (Garnouma et al. 1998; Debenest 2007; IFEN 2007; Taghavi et al. 2010). The MIX2 is more concentrate to reflect situations of highest levels of contamination measured in Europe and USA (Kreuger 1998; Battaglin et al. 2000; Graymore et al. 2001).

Pesticides were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): S-metolachlor (CAS-No: 87392-12-9, PESTANAL[®], analytical standard), isoproturon (CAS-No: 34123-59-6, PESTANAL[®], analytical standard), linuron (CAS-No: 330-55-2, PESTANAL[®], analytical standard),

Atrazine-desethyl (CAS-No: 6190-65-4, PESTANAL[®], analytical standard), aclonifen (CAS-No: 74070-46-5, PESTANAL[®], analytical standard), pendimethalin (CAS-No: 40487-42-1, PROWL[®], analytical standard), and tebuconazol (CAS-No:107534-96-3, PESTANAL[®], analytical standard). Acetone (CAS: 67-64-1, Fisher Chemical, HPLC solvent) was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France).

Final concentrations of pesticides in water were quantified by HPLC-DAD for aclonifen and HPLC-MS/MS for other pesticides. Analyses were performed by the Laboratoire Départemental de l'Eau de la Haute-Garonne (county laboratory water, Saint Alban, France). At the end of the experience, observed concentrations were closed from expected concentrations, except for the MIX2 at 32 °C with a 19 and 64 % decrease in S-metolachlor and pendimethalin concentrations, respectively.

Experimental design

The experimental design is shown in Fig. 1a, b. Fish were placed individually in 30-L opaque aquaria in temperature-controlled rooms (22 and 32 °C, 12 fish for each combination pesticides-temperature). They were exposed during 96 h to three treatments of pesticides (CONTROL, MIX1, and MIX2). CONTROL aquaria received only acetone. Prior to fish introduction, aquaria and all equipment were presaturated with the mixture of pesticides that they will receive during 1 day. Air pumps were placed in each aquarium to supply water with oxygen. Water and pesticides solutions were renewed in half every day to limit concentration variations. No mortality occurs during the exposure.

Temperature, pH, conductivity, and oxygen concentration were assessed every day (Fig. 1c).

Table 1 Composition and characteristics of the two mixtures of pesticides: MIX1 and MIX2 for total concentrations of 8.4 and 42 µg L⁻¹, respectively

Chemicals	Family	Use	LC50-96 h fish (mg/L) (min-max)	Molecular weight (g/mol)	CLP classification (acute/chronic)	Mixture concentrations (µg L ⁻¹)	
						MIX1	MIX2
S-metolachlor	Chloroacetanilide	Herbicide	1.23–12	283.79	C1/C1	2.4	12.0
Linuron	Urea	Herbicide	3.15–31.1	249.11	C1/C1	2.0	10.0
Isoproturon	Substituted urea	Herbicide	18–54.41	206.28	C1/C1	1.2	6.0
Tebuconazole	Triazole	Fungicide	4.4	307.81	NC/C2	1.2	6.0
Aclonifen	Diphenyl ether	Herbicide	0.67	264.66	C1/C1	0.8	4.0
Atrazine-desethyl	Triazine	Herbicide	ND	187.63	ND	0.4	3.0
Pendimethalin	Dinitroaniline	Herbicide	0.138–0.418	281.31	C1/C1	0.4	2.0
Total concentrations						8.4	42.0

LC50-96 h concentration which causes 50 % mortality at 96 h of exposure, CLP classification of chemical risk in aquatic system (CE 1272/2008): C1 very toxic and C2 toxic, ND no data, NC not concerned

Assessment of the sediment reworking behavior

The method proposed by De Nadaï-Monoury et al. (2013) was used to experimentally quantify sediment reworking by fish. All aquaria were filled with a 5-cm layer of commercial white quartz sand (1–2.5 mm in diameter). A thin layer of dark blue sand (same diameter as the white sand) was used as tracers and sprinkled on the white sand surface. Tap water was added in the aquaria, paying attention not to disturb the sediment layer. Aquaria were placed on polystyrene plates (20 mm thick) to isolate them from vibrations and lighted by an indirect light source (12:12-h light regime) to reduce fish stress.

Pictures of the sediment layer were taken with a digital camera Canon EOS 20D before fish introduction (T0) and then every 24 h to follow sediment reworking (T24 to T96). Automatic pixel count was performed by Image-Pro Plus software (Media Cybernetics) (see details in De Nadaï-Monoury et al. 2013 and Canal et al. 2015). The number of white pixels was reported to the total surface of the aquarium, standardized with respect to the initial picture (T0) and to the weight of individuals to obtain the percentage of surface reworked per gram of fish (% g⁻¹).

Measures of physiological endpoints

At the end of the experiment, fish were weighted (to the nearest 10 mg) and measured (fork length to the nearest mm). Fish were euthanized by concussion, and livers and fillets (white muscles) were collected, immediately frozen in liquid nitrogen, and conserved at -80 °C. FCF, HSI, and protein concentrations were calculated as follows.

The Fulton’s condition factor (FCF) presents the global body condition and the “general well-being” of fish (Smolders et al. 2002). It was calculated from weight and length parameters of fish:

$$FCF = \frac{\text{weight (g)}}{\text{length (cm)}^3} \tag{1}$$

The hepatosomatic index (HSI) represents a global measurement of the liver growth status and is correlated with energy contents (Chellappa et al. 1995). It was calculated as the relation between the liver and the total weights:

$$HSI = \frac{\text{liver weight(g)}}{\text{total weight (g)-liver weight(g)}} \times 100 \tag{2}$$

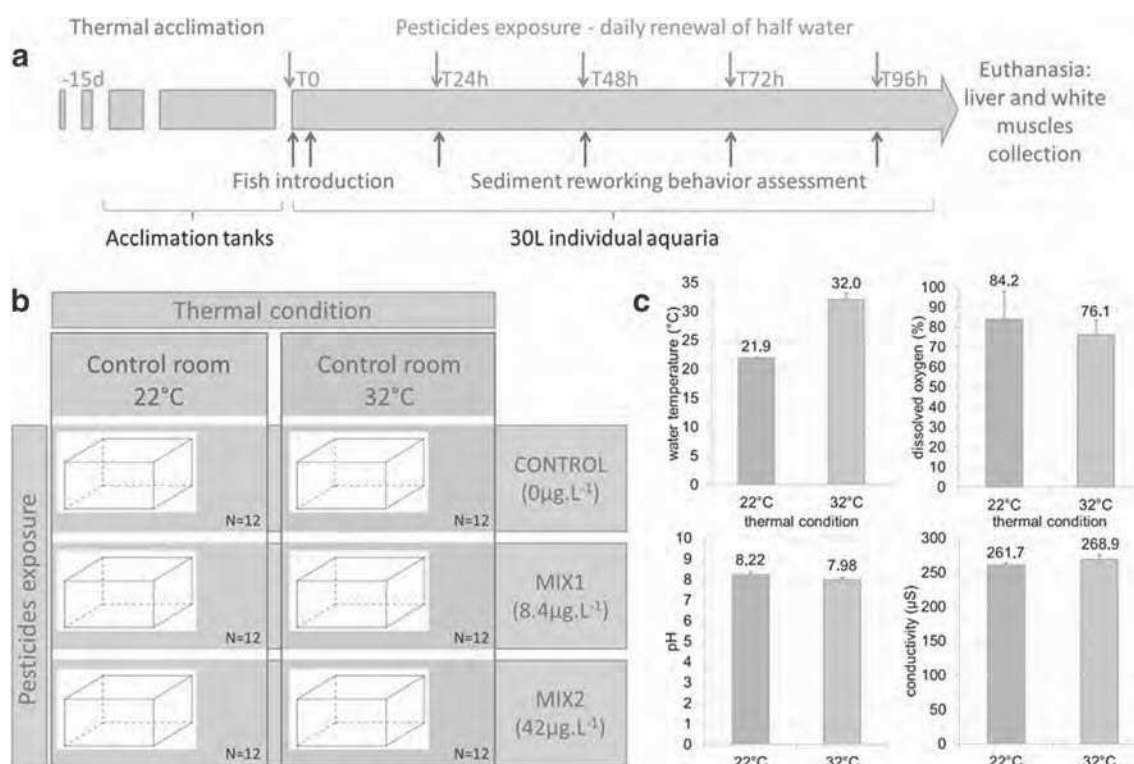


Fig. 1 Effects of pesticide exposure and temperature rising on behavior and physiological parameters of an aquatic fish species, *Carassius auratus*: experimental design. **a** Timeline of the experience: fish were acclimated during 15 days to experimental temperature in collective tanks and then exposed to pesticides during 96 h in 30 L individual aquaria. Sediment reworking behavior was measured daily, and physiological responses were assessed at the end of the experiment. **b** Experimental design: fish were exposed at two temperatures (22 and

32 °C) to a mixture of seven common pesticides at different concentrations: CONTROL (0 µg L⁻¹), MIX1 (total concentration= 8.4 µg L⁻¹), and MIX2 (total concentration=42 µg L⁻¹). N=12 fish for each thermal × exposure condition. **c** Measures of some water physicochemical parameters in each thermal condition: water temperature (°C), dissolved oxygen (%), pH, and conductivity (µS). Measures were realized daily in each aquarium. Mean±SD. N=12

Proteins are one of the major energy reserves in aquatic species. To obtain the protein concentration, samples of liver and muscles were homogenized in 4 vol (v/w) of 40 mM Tris-HCl (pH 8.8), 2 mM EDTA, and protease inhibitors (1 µL/1 mL of solution) at 4 °C using a FastPrep® homogenizer. Homogenates were centrifuged at 10,000g for 10 min at 4 °C. Process was repeated once, and supernatants were stored at -80 °C. Protein concentrations were quantified using a microplate spectrophotometer (FLUOstar OMEGA, BMG LABTECH), according to the principle of protein-dye binding (Bradford 1976).

Statistical analyses

Due to the lack of homogeneity of variances between some groups, comparisons between groups were performed using non-parametric statistics: the effect of pesticide exposure at each temperature was analyzed by Kruskal-Wallis (KW) tests and Dunn’s post-tests, while comparisons between temperature conditions were performed by Mann-Whitney (MW) tests. To evaluate the interaction effect between temperature and pesticide exposure, we used factorial ANOVA for physiological responses and multivariate analysis of variance (MANOVA) with repeated measures for the sediment reworking behavior, assuming that the ANOVA test is quite robust against violations of the homogeneity of variance assumption (Lindman 1974).

Results

Sediment reworking activity

We showed a significant crossed effect between temperature, pesticide concentrations, and time on the percentage of surface reworked by fish (MANOVA analysis, Table 2). The

percentage of surface reworked steadily increased over time whatever the condition of temperature or pesticide concentrations (Fig. 2), although a slight slowdown was observed from 48 h. Significant individual effects of pesticides and temperature were observed at 24, 48, 72, and 96 h of exposure (Table 2), while crossed effect between pesticides and temperature was significant at 48, 72, and 96 h of exposure. At 22 °C, the pesticide exposure significantly decreased the percentage of surface reworked by fish at each time step (Fig. 2a, Kruskal-Wallis (KW) test, $p < 0.01$). This effect increased over time and was significant after 24 h of exposure for MIX1 and 48 h for MIX2 (Dunn post-tests, $p = 0.001$ and 0.038 , respectively). After 96 h of exposure, the percentage of surface reworked was reduced by 54 and 41 % in fish exposed, respectively, to MIX1 and MIX2 compared to CONTROL (Dunn post-tests, $p = 0.000$ and 0.006 , respectively). In CONTROL fish, temperature rising decreased by 21 % the percentage of surface reworked after 96 h (Mann-Whitney (MW) test, $p = 0.017$). On the contrary, pesticide exposure at 32 °C had no significant effect on the percentage of surface reworked regard to 22 and 32 °C controls (Fig. 2b, KW test: $p > 0.05$ at each time step).

Physiological endpoints

Interaction between pesticides and temperature had no significant effects on the FCF (factorial ANOVA, $p = 0.15$). Temperature significantly increased the FCF (MW, $p < 0.000$ for all pesticide conditions, Fig. 3a). At 22 °C, pesticide exposure tended to decrease the FCF, but changes were not significant (Kruskal-Wallis (KW) tests, $p = 0.37$). At 32 °C, pesticide exposure had no effect on FCF (KW test, $p = 0.92$).

Concerning the hepatosomatic index (HSI), crossed effect between pesticide concentrations and temperature was significant (factorial ANOVA, $p = 0.022$, Fig. 3b). Pesticide exposure altered significantly the HSI at 22 °C but not at 32 °C

Table 2 Factorial MANOVA/ANOVA analyses of the effect of pesticide exposure, temperature warming, and time on the percentage of surface reworked by *Carassius auratus* (% g⁻¹)

Analysis	p values			
	Temperature	Pesticides	Temperature × pesticides	Time effect
Multivariate analysis	0.002	0.001	0.000	0.000
Interaction with time	0.406	0.182	0.003	–
Univariate analyses				
Percentage of surface reworked at T 24 h	0.005	0.030	0.072	–
Percentage of surface reworked at T 48 h	0.020	0.002	0.001	–
Percentage of surface reworked at T 72 h	0.002	0.005	0.000	–
Percentage of surface reworked at T 96 h	0.012	0.002	0.000	–

Fish were exposed during 96 h to a mixture of seven pesticides at different concentrations (CONTROL, MIX1 8.4 µg L⁻¹, and MIX2 42 µg L⁻¹) and two temperatures (22 and 32 °C). The percentage of surface reworked was assessed every 24 h. N=12

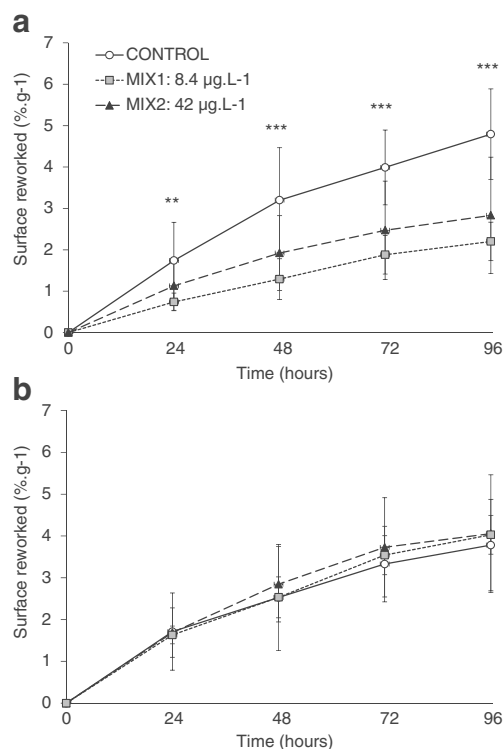


Fig. 2 Effects of pesticide exposure and temperature rising on sediment reworking activity of an aquatic fish species, *Carassius auratus*. Evolution of the mean surface reworked (% g⁻¹) by fish, exposed during 96 h to a mixture of seven pesticides at different concentrations (CONTROL, MIX1/4.8 µg L⁻¹, and MIX2/42 µg L⁻¹) and at two temperatures **a** 22 °C and **b** 32 °C. The percentage of surface reworked was assessed every 24 h. Bars show standard deviations. N=12. Asterisks: Kruskal–Wallis test of the pesticide effect at 22 and 32 °C with **p*<0.05, ***p*<0.01, and ****p*<0.001

(KW tests, *p*=0.004 and 0.278, respectively). At 22 °C, MIX1 exposure decreased the HSI compared to CONTROL (Dunn post-tests, *p*=0.009). In contrast, MIX2 exposure had no significant effect. At 32 °C, pesticide exposure increased the HSI, but not significantly (KW tests, *p*=0.27). A substantial but non-significant decrease of the HSI was observed with temperature rising in CONTROL fish (MW tests, *p*=0.065).

Pesticide concentrations and temperature had significant effects on protein concentrations in liver and muscle (Fig. 3c, d), but crossed effect between temperature and pesticide concentrations was significant only for the protein concentration in muscle (factorial ANOVA, *p*=0.002 for muscle and 0.073 for liver). At 22 °C, pesticide exposure decreased the protein concentration both in liver and in muscle (KW test,

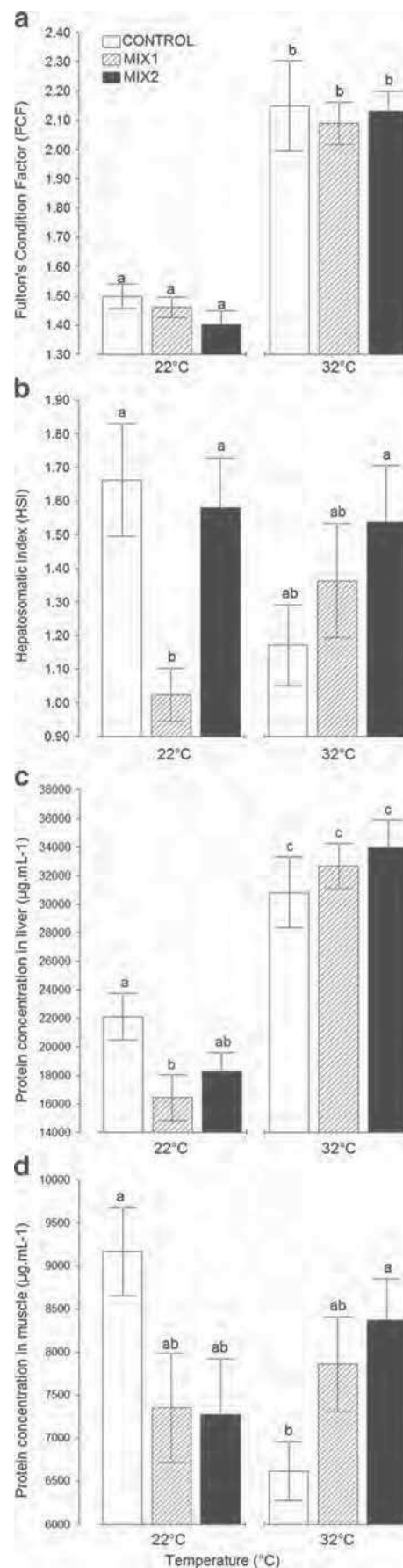


Fig. 3 Effects of pesticide exposure and temperature rising on physiological parameters of an aquatic fish species, *Carassius auratus*. **a** Fulton's condition factor, **b** hepatosomatic index, **c** protein concentration in liver (µg mL⁻¹), and **d** protein concentration in muscle (µg mL⁻¹). Goldfish were exposed during 96 h to a mixture of seven pesticides at different concentrations (CONTROL, MIX1/4.8 µg L⁻¹, and MIX2/42 µg L⁻¹) and at two different temperatures (22 and 32 °C). Letters indicate homogenous groups. Mean±SEM. N=12

$p=0.050$ and 0.059 in liver and muscle, respectively), but this decrease was only significant in liver for MIX1 compared to the CONTROL (Dunn's post-test, $p=0.048$). In the opposite, pesticide exposure at $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ increased protein concentration in muscle, with MIX2 significantly different from the CONTROL (Dunn's post-test, $p=0.038$). Temperature significantly increased protein concentration in liver (Dunn's post-test, $p<0.05$ for all conditions of exposure) and decreased protein concentration in muscle in CONTROL group (Dunn's post-test, $p=0.000$).

Discussion

Behavioral response to pesticide exposure and temperature rising

We found that pesticide exposure decreased the sediment reworking activity of goldfish, which is consistent with other studies. Shinn (2010) showed that a mixture of atrazine, linuron, and S-metolachlor (with respective concentrations of 10, 15, and $45\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) inhibits swimming behavior in *Oncorhynchus mykiss*. Atrazine alone affects burst swimming reactions of the goldfish after 24-h exposure at $0.5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ and alters grouping behavior, surfacing activity, and sheltering at $5\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ (Saglio and Trijasse 1998). Behavioral perturbations may follow neurological, endocrine, sensory, or metabolic disruptions (see review in Scott and Sloman 2004). Beyond the metabolic adjustment related to stress response, atrazine and S-metolachlor are known to entrain endocrine perturbations and sensory disruptions in fish (Bisson 2002; Wolf and Moore 2002; Becker et al. 2009). So, the behavioral response to pesticide exposure could be (1) an adaptive strategy to decrease the energy consumed by the general activity or (2) a toxic effect of the pesticides themselves.

Unexpectedly, temperature rising also decreased the sediment reworking activity of fish. Indeed, Reynolds & Casterlin (1979) measured the locomotor activity of the goldfish exposed to a gradient of temperatures and found a two-fold increase in locomotion at $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ compared to $22\text{ }^{\circ}\text{C}$. Temperature rising often leads to increase the basal and active metabolism of fish and so to increase their general locomotor activity (López-Olmeda and Sánchez-Vázquez 2011; Canal et al. 2015). But, behavioral adjustments to temperature are not linear and depend on the severity and the duration of the stress exposure. Sullivan et al. (2000) suggested that, in salmon species, general activity increases with temperature rising—parallel to the metabolic rate—and then decreases beyond a certain threshold which marks the boundary between the zones of thermal tolerance and resistance. Here, both experimental temperatures were on either side of the optimal temperature of the goldfish ($28\text{ }^{\circ}\text{C}$), within the theoretic tolerance range (Bret 1946). But, intraspecific genetic diversity

and/ or difference in thermal life history between populations may impact the thermal sensitiveness of fish (see a review in Pörtner 2002). Anyway, our results suggest that in our study, goldfish placed at $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ were outside their tolerance range. Particularly, at high temperatures, the cellular demand in oxygen increases, leading to an oxygen insufficiency (Pörtner 2002). Survival to thermal stress then depends on metabolic adjustments and cellular defense and repair systems. The subsequent drop in the aerobic scope and the metabolic compensation to defense system induction can cause a decrease in global activity (Sullivan et al. 2000; Sokolova 2013).

Physiological responses to pesticide exposure and temperature rising

We found that pesticide exposure and temperature rising significantly disrupt the metabolic balance of juvenile's goldfish, from the cellular to the individual level. Pesticides exposed fish had decreased protein concentration in liver and HSI and tended to have a lower FCF. Except for the FCF, the metabolic response was stronger at the lowest concentrations. Thermal-exposed fish had decreased protein concentration in white muscle but increased FCF and hepatic protein concentration.

Glycogen, lipids, and proteins are the three major energetic reserves in aquatic species. The HSI permits to estimate the energy status of the liver; insofar, it is correlated with lipids and glycogen reserves (Chellappa et al. 1995; Zheng et al. 2013). Under stress, hepatic glycogen rapidly provides glucose, via glycogenolysis pathway, which supplies other organs readily usable energy (Moon and Foster 1995). Moreover, a decrease in lipid stores and the disruption of lipid metabolism were shown for several pollutants and fish species (Smolders et al. 2003; Zheng et al. 2013; Castelli et al. 2014). Modification in the protein concentration results from a perturbation in the protein turnover, with an imbalance between the synthesis and the degradation rate of proteins (Smolders et al. 2003). In the white muscle, proteins are the main source of energy. Inversely, the liver metabolic response primarily involves lipid and glycogen reserves, and proteins are used ultimately when other reserves are depleted (Smolders et al. 2003). If not, the hepatic protein synthesis may be increased to produce defense systems, including heat shock proteins (Viant et al. 2003).

Fish exposed to the lowest pesticide concentrations (MIX1) at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ showed a significant decrease in the HSI and the protein concentrations in the white muscles (and to a lesser extent in liver). This global depletion in energy stores may indicate a drastic increase in energy requirement, which cannot be compensated by alimentation, fish being starved. This is consistent with the intermediary stress response describe by Selye (1950). Energetic stores were mobilized to furnish the energy necessary for the molecular and physiological defense system induction. In the opposite, fish exposed to the highest

concentration of pesticides (MIX2) have shown an HSI closed to the CONTROL value and a non-significant decrease in protein concentrations in organs. Unexpectedly, metabolic disruptions seemed to be more important at the lowest concentration. At highest concentrations, the metabolic response to pesticide exposure could be hidden by other adaptive responses or direct toxic effects of pesticides. Biagianti-Risbourg and Bastide (1995) have shown an increase in HSI due to the sequestration of fat-soluble pesticides in liver lipid droplets. Other authors suggested that liver may swell with pesticide exposure in order to increase its detoxification capacity (Arnold et al. 1995; Bacchetta et al. 2014) or in consequences of degenerative changes in the liver tissue (Arnold et al. 1995; Guardiola et al. 2014). The absence of classic dose/response relationship may have so three reasons: (1) different modes of action of pesticides at different concentrations, including a low-dose effect for the endocrine active substances (i.e., atrazine or S-metolachlor) (EFSA 2010), (2) different physiological responses—or strategies—depending on the concentration of toxic substances, or (3) the passage of a metabolic compensation state to a non-compensation state when stress becomes too severe (Sokolova 2013).

Thermal-exposed fish (CONTROL/32 °C) exhibited a significant decrease in the muscular protein concentrations in muscle while the protein concentration in liver increased. The dichotomy between the liver and the muscle protein responses to temperature rising was observed to in *O. mykiss* (Viant et al. 2003). These authors suggested that muscle proteins were used to compensate the metabolic cost of thermal acclimation, while the liver protein synthesis was enhanced, probably to produce thermal defenses. The decreased HSI, although not significant, may also indicate a growing energy requirement due to thermal acclimation.

Energetic strategy and multistress effects

Thermal and chemical stress required the induction of a whole range of defense systems, including detoxification, protection, and/or reparation systems, to maintain homeostasis (Iwama 1998; Martínez-Álvarez et al. 2005). Temperature warming induces heat shock proteins among other defense systems (Iwama et al. 1998). Atrazine and isoproturon are known to induce in the goldfish the hepatic expression of proteins involved in defense against oxidative stress (Fatima et al. 2007; Meng et al. 2011) and in general process of detoxification (Meng et al. 2011). Thermal- or low-pesticide-dose-exposed fish had decreased energy reserves, indicating a growing energy demand related to cost of defense system induction. It is a classic adaptive response to stress. The decrease in the sediment reworking behavior could then result energetic trade-offs between activity, reproduction, growth, and maintenance (see among others Handy et al. 1999; Marchand et al. 2004; Roze et al. 2013).

The energy balance is a key factor in the stress response (Selye 1950; Barton 2002). Ultimately, the ability of organisms to mobilize energy for defense systems determines, in large part, their ability to cope with a stressor (Sokolova 2013). When the organism cannot—or no longer—counteract for the effects of stress, harmful health effects appear. When defense systems are insufficient to combat the damage caused by stress, the metabolic responses disappeared and organism enters in “metabolic arrest” (Sokolova 2013). This metabolic arrest increases the survival time of stressed organisms. But, this strategy is unsustainable over the long term (Sokolova 2013). In this study, goldfish exposed to the highest concentration of pesticides presented behavioral changes but no metabolic responses. Moreover, when fish were exposed to combined thermal and pesticides stresses, their behavioral and metabolic responses to individual stressor decreased or disappeared. Most studies showed an increase in the toxicity of pesticides on fish with temperature. We can therefore hypothesize that in both cases, goldfish entered in metabolic arrest state. Pesticide exposure can so potentially compromise the adaptation of fish to temperature changes and vice versa.

In this study, we show for the first time that realistic pesticide contaminations in our experimental condition may alter a major fish ecosystemic function: the sediment reworking. Our results show behavioral and metabolic perturbations caused by each stressor separately and crossed effects between these two factors. Our findings suggest that (1) low environmental relevant concentrations of pesticides lead to behavioral and metabolic adaptive response in the goldfish, (2) fish may elicit different adaptive responses in function of the kind and the intensity of stress (metabolic compensation or metabolic arrest), and (3) fish may be unable to set up efficient adaptive responses when they are exposed to combined thermal and pesticide challenges, with potential dramatic consequences. Further analyses are however needed, including longer studies and molecular approaches, to deepen these results. Ultimately, this study confirms the difficulty to predict adverse outcomes of environmental pollutions on fish and so implications for aquatic ecosystem functioning, without taking into account physical parameters like temperature warming. It also strongly suggests that temperature will make fish more sensitive to water contamination by pesticides and, inversely, raising concerns about wild fish conservation submitted to global changes.

Acknowledgments We are grateful for technical help provided by Annie Perrault and Yannick Combarieu. Thanks are also due to Lisa Jacquin for helpful comments on an earlier draft.

Compliance with ethical standards Experimental procedures were conducted under French animal handler’s certificate no. 31-103, giving authorization to experiment on living vertebrates. This work has been carried out as a part of “ADAPTEAU” (ANR-11-CEPL-008), a project supported by the French National Research Agency (ANR) within the

framework of “The Global Environmental Changes and Societies (GEC&S) program.” AG was supported by a doctoral grant of the French Ministry of Higher Education and Research.

Conflict of interest The authors confirm no conflict of interest.

References

Arnold H, Pluta H-J, Braunbeck T (1995) Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton in vivo: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat Toxicol*. doi:10.1016/0166-445X(95)00006-P

Bacchetta C, Rossi A, Ale A, Campana M, Parma MJ, Cazenave J (2014) Combined toxicological effects of pesticides: a fish multi-biomarker approach. *Ecol Indic*. doi:10.1016/j.ecolind.2013.09.016

Barton BA (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr Comp Biol*. doi:10.1093/icb/42.3.517

Battaglin WA, Furlong ET, Burkhardt MR, Peter CJ (2000) Occurrence of sulfonyleurea, sulfonamide, imidazolinone, and other herbicides in rivers, reservoirs and ground water in the Midwestern United States, 1998. *Sci Total Environ*. doi:10.1016/S0048-9697(99)00536-7

Becker AG, Moraes BS, Menezes CC, Loro VL, Santos DR, Reichert JM, Baldisserotto B (2009) Pesticide contamination of water alters the metabolism of juvenile silver catfish. *Rhamdia quelen* *Ecotoxicol Environ Saf*. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.01.006

Biagiatti-Risbourg S, Bastide J (1995) Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an ultrastructural study. *Aquat Toxicol*. doi:10.1016/0166-445x(94)00065-x

Bisson M (2002) Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro. *Toxicol App Pharmacol*. doi:10.1006/taap.2002.9377

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3

Bret JR (1946) Rate of heat-tolerance in goldfish (*Carassius auratus*). In (ed) *Biological series n°53*. Ontario Fisheries Research Laboratory. pp 9-28

Brethead S, Toutant JP, Saglio P (2000) Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol Environ Saf*. doi:10.1006/eesa.2000.1954

Brett JR (1971) Energetic responses of salmon to temperature. A study of some thermal relations in the physiology and freshwater ecology of sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Am Zool*

Canal J, Laffaille P, Gilbert F, Lauzeral C, Buisson L (2015) Influence of temperature on sediment reworking surface sediment disturbance by freshwater fish: a microcosm experiment. *Intern J Limn*. doi:10.1051/limn/2015012

Castelli MG, Rusten M, Goksøyr A, Routti H (2014) mRNA expression of genes regulating lipid metabolism in ringed seals (*Pusa hispida*) from differently polluted areas. *Aquat Toxicol*. doi:10.1016/j.aquatox.2013.11.015

Cavas T, Konen S (2007) Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagen*. doi:10.1093/mutage/gem012

Cech J Jr, Massingill M, Vondracek B, Linden A (1985) Respiratory metabolism of mosquitofish, *Gambusia affinis*: effects of

temperature, dissolved oxygen, and sex difference. *Environ Biol Fish*. doi:10.1007/bf00002914

Celander MC (2011) Cocktail effects on biomarker responses in fish. *Aqua Toxicol*. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.002

CGDD (2011) Assessment of the presence of micro-pollutants in freshwater environments, period 2007-2009 (in French). *Études & documents: Volume 54*. Commissariat Général au Développement Durable (France)

Chellappa S, Huntingford FA, Strang RHC, Thomson RY (1995) Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J Fish Biol*. doi:10.1111/j.1095-8649.1995.tb06002.x

Cook M, Moore P (2008) The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish. *Orconectes rusticus Arch Environ Contam Toxicol*. doi:10.1007/s00244-007-9088-z

De Nadaï-Monoury E, Lecerf A, Canal J, Buisson L, Laffaille P, Gilbert F (2013) A cost-effective method to quantify surface sediment reworking in streams. *Hydrobiol*. doi:10.1007/s10750-013-1497-6

De Vries P (2012) Salmonid influence on rivers: a geomorphic fish tail. *Geologija*. doi:10.1016/j.geomorph.2011.04.040

Debenest T (2007) Characterization of the impact of agricultural pollution on benthic diatoms (in French). *Ph.D Thesis*, Université de Bordeaux 1. Bordeaux, France

Devault DA, Gérino M, Laplanche C, Julien F, Winterton P, Merlina G, Delmas F, Lim P, Sanchez-Pérez JM, Pinelli E (2009) Herbicide accumulation and evolution in reservoir sediments. *Sci Total Environ*. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.12.064

Dossena M, Yvon-Durocher G, Grey J, Montoya JM, Perkins DM, Trimmer M, Woodward G (2012) Warming alters community size structure and ecosystem functioning. *Proc R Soc B Biol Sci*. doi:10.1098/rspb.2012.0394

Drinkwater KF, Beaugrand G, Kaeriyama M, Kim S, Ottersen G, Perry RI, Pörtner H-O, Polovina JJ, Takasuka A (2010) On the processes linking climate to ecosystem changes. *J Mar Syst*. doi:10.1016/j.jmarsys.2008.12.014

EFSA (2010) Scientific report of the endocrine active substances task force. *Eur Food Safety Authority (EFSA) J*. doi:10.2903/j.efsa.2010.1932

Fatima M, Mandiki S, Douxfils J, Silvestre F, Coppe P, Kestemont P (2007) Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish *Immune and antioxidant effects*. *Aqua Toxicol*. doi:10.1016/j.aquatox.2006.11.013

Feng M, Qu R, Wang C, Wang L, Wang Z (2013) Comparative antioxidant status in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to six current-use brominated flame retardants: a combined experimental and theoretical study. *Aqua Toxicol*. doi:10.1016/j.aquatox.2013.07.001

Garnouma M, Teil MJ, Blanchard M, Chevreuil M (1998) Spatial and temporal variations of herbicide (triazines and phenylureas) concentrations in the catchment basin of the Marne river (France). *Sci Total Environ*. doi:10.1016/S0048-9697(98)00326-X

Gordon CJ (2005) *Temperature and toxicology: an integrative, comparative, and environmental approach*. CRC Press

Grassie C, Braithwaite VA, Nilsson J, Nilsen TO, Teien H-C, Handeland SO, Stefansson SO, Tronci V, Gorissen M, Flik G, Ebbesson LOE (2013) Aluminum exposure impacts brain plasticity and behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *J Exp Biol*. doi:10.1242/jeb.083550

Graymore M, Stagnitti F, Allinson G (2001) Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ Int*. doi:10.1016/S0160-4120(01)00031-9

Guardiola FA, González-Párraga P, Mesguera J, Cuesta A, Esteban MA (2014) Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immuno*. doi:10.1016/j.fsi.2013.10.020

Handy RD, Sims DW, Giles A, Campbell HA, Musonda MM (1999) Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat Toxicol.* doi:10.1016/s0166-445x(99)00004-1
- Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, Lee M, Mai VP, Marjuoa Y, Parker J, Tsui M (2006) Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact? *Environ Health Perspect.* doi:10.1289/ehp.8051
- Holmstrup M, Bindesbøl A-M, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, Köhler H-R, Loureiro S, Soares AMVM, Ferreira ALG, Kienle C, Gerhardt A, Laskowski R, Kramarz PE, Bayley M, Svendsen C, Spurgeon DJ (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. *Sci Total Environ.* doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
- Ieno EN, Solan M, Batty P, Pierce GJ (2006) How biodiversity affects ecosystem functioning: roles of infaunal species richness, identity and density in the marine benthos. *Mar Ecol Prog Ser.* doi:10.3354/meps311263
- IFEN (2007) Pesticides in water in 2005 (in French). *Les dossiers IFEN n°09.* Institut Français de l'Environnement
- Iwama GK (1998) Stress in fish. *Ann N Y Acad Sci.* doi:10.1111/j.1749-6632.1998.tb09005.x
- Iwama GK, Thomas P, Forsyth RB, Vijayan MM (1998) Heat shock protein expression in fish. *Rev Fish Biol Fish.* doi:10.1023/a:1008812500650
- Keith P, Persat H, Feuten E, Allardi J (2011) Freshwater fish species in France (in French). *Biotope.* Muséum national d'histoire naturelle, Paris
- Keith T, Farrell A, Brauner C (2014) Organic chemical toxicology of fishes. *Fish Physiology Volume 33.* Keith T, Farrell A, Brauner C. Academic Press
- Kennedy CJ, Ross PS (2012) Stress syndromes: heightened bioenergetic costs associated with contaminant exposure at warm temperatures in teleosts. *Integr Environ Assess Manag.* doi:10.1002/ieam.1261
- Killen SS, Marras S, Ryan MR, Domenici P, McKenzie DJ (2012) A relationship between metabolic rate and risk-taking behaviour is revealed during hypoxia in juvenile European sea bass. *Funct Ecol.* doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01920.x
- Kreuger J (1998) Pesticides in stream water within agricultural catchment in southern Sweden. *Sci Total Environ.* doi:10.1016/S0048-9697(98)00155-7
- Lemly AD (1996) Winter stress syndrome: an important consideration for hazard assessment of aquatic pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* doi:10.1006/eesa.1996.0067
- Lindman HR (1974) Analysis of variance in complex experimental designs. (Ed) W.H. Freeman & Co. San Francisco
- López-Olmeda JF, Sánchez-Vázquez FJ (2011) Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J Therm Biol.* doi:10.1016/j.jtherbio.2010.12.005
- Manciocco A, Calamandrei G, Alleve E (2014) Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms: the need of the etho-toxicology approach. *Chemosphere.* doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.072
- Marchand J, Quiniou L, Riso R, Thebaut M-T, Laroche J (2004) Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aqua Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2004.10.001
- Martínez-Álvarez R, Morales A, Sanz A (2005) Antioxidant defenses in fish: biotic and abiotic factors. *Rev Fish Biol Fisheries.* doi:10.1007/s11160-005-7846-4
- Melvin SD, Wilson SP (2013) The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: a meta-analysis. *Chemosphere.* doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.036
- Meng S, Chen J, Wu W, Hu G, Qu J, You Y (2011) Effect of atrazine on antioxidant enzyme and its bioaccumulation in kidney of crucian carp. *Carassius auratus J Northeast Agric Univ.* doi:10.1016/S1006-8104(13)60094-X
- Montgomery DR, Buffington JM, Peterson NP, Schuett-Hames D, Quinn TP (1996) Stream-bed scour, egg burial depth, and the influence of salmonid spawning on bed surface mobility and embryo survival. *Can J Fish Aqua Sci* 53:1061–1070
- Moon TW, Foster GD (1995) Chapter 4 Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: Mommsen TP (ed) Hochachka, P. W. Elsevier, Biochemistry and molecular biology of fishes, pp 65–100
- Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Van Tiem LA, Walcott KC, Erwin KN, Levin ED (2009) The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. *Environ Int.* doi:10.1016/j.envint.2009.02.006
- Peoples BK, McManamay RA, Orth DJ, Frimpong EA (2014) Nesting habitat use by river chubs in a hydrologically variable Appalachian tailwater. *Ecol Freshw Fish.* doi:10.1111/eff.12078
- Polard T (2011) Characterization of genotoxic effects on fish during floods (in French). *Ph.D Thesis,* Université Paul Sabatier-Toulouse III, Toulouse, France
- Polard T, Jean S, Gauthier L, Laplanche C, Merlina G, Sánchez-Pérez JM, Pinelli E (2011) Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aqua Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.014
- Pörtner HO (2002) Climate variations and the physiological basis of temperature dependant biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp Biochem Physiol A: Mol Int Physiol.* doi:10.1016/S1095-6433(02)00045-4
- Reise K (2002) Sediment mediated species interactions in coastal waters. *J Sea Res.* doi:10.1016/S1385-1101(02)00150-8
- Reynolds WW, Casterlin ME (1979) Effect of temperature on locomotor activity in the goldfish (*Carassius auratus*) and the bluegill (*Lepomis macrochirus*): Presence of an "activity well" in the region of the final preferendum. *Hydrobiol.* doi:10.1007/BF00032711
- Roze T, Christen F, Amerand A, Claireaux G (2013) Trade-off between thermal sensitivity hypoxia tolerance and growth in fish. *J Therm Biol.* doi:10.1016/j.jtherbio.2012.12.001
- Saglio P, Trijasse S (1998) Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch Environ Contam Toxicol.* doi:10.1007/s002449900406
- Schiedek D, Sundelin B, Readman JW, Macdonald RW (2007) Interactions between climate change and contaminants. *Mar Pollut Bull.* doi:10.1016/j.marpolbul.2007.09.020
- Scott GR, Sloman KA (2004) The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: integrating behavioural and physiological indicators of toxicity. *Aqua Toxicol.* doi:10.1016/j.aquatox.2004.03.016
- Sekine M, Nakanishi H, Ukita M (1996) Study on fish mortality caused by the combined effects of pesticides and changes in environmental conditions. *Ecol Model.* doi:10.1016/0304-3800(95)00061-5
- Selye H (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *Br Med J.* doi:10.1136/bmj.1.4667.1383
- Shinn C (2010) Impact of toxicants on stream fish biological traits. *Ph.D Thesis,* Université Paul Sabatier-Toulouse III, Toulouse, France
- Shirakawa H, Yanai S, Goto A (2013) Lamprey larvae as ecosystem engineers: physical and geochemical impact on the streambed by their burrowing behavior. *Hydrobiol.* doi:10.1007/s10750-012-1293-8
- Smolders R, Bervoets L, De Boeck G, Blust R (2002) Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem.* doi:10.1002/etc.5620210113
- Smolders R, De Boeck G, Blust R (2003) Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ Toxicol Chem.* doi:10.1002/etc.5620220429
- Sokolova IM (2013) Energy-limited tolerance to stress as a conceptual framework to integrate the effects of multiple stressors. *Int Comp Biol.* doi:10.1093/icb/ict028
- Sullivan K, Martin DJ, Cardwell RD, Toll JE, Duke S (2000) An analysis of the effect of temperature on salmonids on the Pacific northwest

- with implications for selecting temperature criteria. Sustainable Ecosystems Institute, Portland, Oregon
- Taghavi L, Probst JL, Merlina G, Marchand AL, Durbe G, Probst A (2010) Flood event impact on pesticide transfer in a small agricultural catchment (Montoussé at Auradé, south west France). *Int J Environ Anal Chem*. doi:10.1080/03067310903195045
- Viant MR, Werner I, Rosenblum ES, Gantner AS, Tjeerdema RS, Johnson ML (2003) Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiol Biochem*. doi:10.1023/b:fish.0000035938.92027.81
- Wolf MC, Moore PA (2002) Effects of the herbicide metolachlor on the perception of chemical stimuli by *Orconectes rusticus*. *J North Am Benthol Soc*. doi:10.2307/1468482
- Zheng J-L, Luo Z, Liu C-X, Chen Q-L, Tan X-Y, Zhu QL, Gong Y (2013) Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aqua Toxicol*. doi:10.1016/j.aquatox.2013.02.002

COMPLEMENT 1

Effets croisés des pesticides et de la température sur le comportement et la physiologie de *Carassius auratus* - compléments -

Allison Gandar^{a,b}, Séverine Jean^{a,b}, Lisa Jacquin^{c,d}, Mélissa Aguirre-Smith^{a,b,c,d}, Aurore Aguetzaz^{a,b,c,d}, Annie Perrault^{a,b}, Pascal Laffaille^{a,b}

^a Université de Toulouse ; INPT, UPS ; EcoLab, ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France. ^b CNRS ; UMR 5245 EcoLab, 31062 Toulouse, France. ^c Université de Toulouse ; UPS ; EDB ; 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse, France. ^d CNRS ; UMR 5174 EDB (Laboratoire Évolution et Diversité Biologique) ; 31062 Toulouse, France.

1. Introduction

L'étude précédente (article 1) a montré que la présence de pesticides et l'augmentation de la température entraînent la diminution du comportement de remaniement sédimentaire ainsi que les réserves énergétiques (i.e., indice hépatosomatique et concentrations en protéines dans le foie et les muscles) du carassin doré. Un effet croisé significatif entre les températures et les pesticides a également été observé avec une réponse de type antagoniste. En effet, l'effet des deux stress combinés sur le comportement et le statut métabolique était inférieur à la somme des effets individuels. Plusieurs hypothèses ont été développées pour expliquer ces résultats et sont résumées ici. La première est que l'exposition aux pesticides ou à une augmentation de la température entraînent une augmentation de la demande énergétique liée à l'induction des systèmes de défense et/ou à l'augmentation du métabolisme énergétique, qui est compensée par l'utilisation des réserves énergétiques et la diminution de l'activité. L'effet antagoniste entre les pesticides et la température peut quant à lui être expliqué par (1) la diminution de la biodisponibilité et/ou la toxicité des pesticides (Noyes et al., 2009; Schiedek et al., 2007), (2) l'augmentation de la capacité des organismes à tolérer la contamination chimique (Tedengren et al., 2000), ou (3) par le passage d'une stratégie métabolique de compensation à une stratégie de conservation (Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012). Dans cette dernière hypothèse, l'effet cumulé des deux

stress dépasse les capacités métaboliques compensatoires des poissons. Ceux-ci optent alors pour une stratégie métabolique de conservation, ce qui se traduit par une diminution du métabolisme énergétique et un arrêt de l'utilisation des réserves énergétiques (i.e. « arrêt métabolique ») (Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012).

L'objectif de cette étude complémentaire est de confirmer ou non cet effet antagoniste sur d'autres paramètres comportementaux et physiologiques des poissons et d'aider à trancher entre les différentes hypothèses.

Le comportement de remaniement sédimentaire est essentiellement la conséquence de l'activité de nage des poissons (Montgomery et al., 1996) et de la recherche alimentaire (Reise, 2002), qui elle-même implique à la fois un maintien de l'activité de nage, une exploration de l'environnement pour trouver de la nourriture (Wood-Gush and Vestergaard, 1989) et de l'appétit. Ainsi, nous avons testé la réponse de plusieurs traits comportementaux impliqués dans le remaniement sédimentaire : la locomotion, l'exploration et l'alimentation. La locomotion (mobilité et vitesse) reflète directement l'activité générale des poissons et leur capacité métabolique (i.e. énergie disponible pour l'activité) (Claireaux et al., 2000; Fitzgibbon et al., 2007; Pang et al., 2011). Le maintien de l'activité est essentielle pour permettre l'évitement des prédateurs et l'activité alimentaire (Fu et al., 2009). L'exploration donne des

informations sur la manière dont les poissons s'adaptent à un nouvel environnement (Péan et al., 2013). Elle est également liée à la recherche de nourriture (Wood-Gush and Vestergaard, 1989). Le comportement alimentaire est quant à lui directement lié à la croissance et au développement des organismes (Alonso et al., 2009; Pestana et al., 2007). Une perturbation de ce comportement est susceptible d'affecter tous les processus liés à la production et à la consommation d'énergie (Melvin and Wilson, 2013). Tous ces traits répondent à une exposition à des contaminants chimiques (Beitinger, 1990; Melvin and Wilson, 2013; Péan et al., 2013) et à l'augmentation de la température (Como et al., 2013; Pang et al., 2011). En accord avec les résultats de l'Article 1 et l'hypothèse 3 de coût métabolique de la défense, nous pouvons supposer que les pesticides et la température entraineront également une diminution des comportements locomoteurs, exploratoires et alimentaires, avec de potentiels impacts sur la fitness et finalement la survie des individus.

Deux traits physiologiques ont été évalués dans cette étude : l'évolution de la condition métabolique globale des poissons entre le début et la fin de l'exposition (i.e. perte de poids) et l'indice gonadosomatique qui reflète la maturation sexuelle et donc l'investissement énergétique dans la reproduction (Kime, 1999; Palstra and van den Thillart, 2010; Pérez et al., 2011). Selon l'hypothèse de coût métabolique, ces traits physiologiques devraient également être affectés par les pesticides et l'augmentation de la température (Smolders et al., 2005).

2. Matériel et méthodes

Les poissons ont été exposés pendant 96h au même cocktail de pesticides selon les trois mêmes concentrations (Témoin : 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, LD : 8,4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ et HD : 42 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et aux deux mêmes températures (22 et 32°C) suivant le protocole de l'étude précédente. 24 poissons ont été utilisés par condition. Plusieurs paramètres ont été évalués pour chaque trait comportemental :

- Locomotion : temps passé à nager, vitesse moyenne, distance parcourue ;
- Comportement exploratoire : nombre de zones visitées, nombre de changements de direction ;
- Comportement alimentaire : prise alimentaire, latence, taux d'alimentation.

Les comportements exploratoires et locomoteurs ont été évalués par observation directe et vidéo-tracking à T0, T24 et T96h (Dell et al., 2014). Ces temps d'observation ont été choisis en fonction des résultats obtenus précédemment (i.e. diminution du comportement de remaniement sédimentaire dès 24h d'exposition et réponses physiologiques mesurées à T96h). L'observation directe a été réalisée directement dans les bacs d'exposition, l'observateur étant camouflé derrière un rideau opaque percé d'une fenêtre d'observation pour limiter l'effet perturbateur de sa présence sur le comportement des poissons. Le temps passé à nager a été chronométré sur 5 minutes. Les poissons ont ensuite été transférés dans des aquariums de test dont le fond est quadrillé en 6 zones. Des webcams placées en surplomb à la verticale ont enregistré en continu pendant 10 minutes. L'acquisition des vidéos a été réalisée avec le logiciel VirtualDub (v1.10.4 ("Virtualdub software," 2015)). Les données comportementales ont ensuite été extraites par le logiciel Tracker (v4.8, comPADRE) à T0, T24 et T96h sur les 5 dernières minutes de film, les 5 premières minutes étant considérée comme un temps d'acclimatation au nouvel environnement. Le comportement alimentaire a été mesuré à la fin de l'expérience, après 96h d'exposition à jeun des poissons. Pour cela, 10 granulés flottants ont été déposés dans l'aquarium et laissés pendant 60 secondes. La latence (en seconde) correspond au temps mis par l'individu pour rejoindre la nourriture et avaler un premier granulé. Elle est notée 61s par défaut lorsque le poisson n'a pas réalisé le comportement pendant le temps imparti. Le taux d'alimentation correspond au nombre de granules avalés (noté 0 si aucun granulé n'a été avalé). La prise alimentaire est notée OUI si le poisson a avalé au moins un granulé sans le recracher dans le temps imparti, et NON dans le cas contraire.

Deux paramètres physiologiques ont été mesurés : l'évolution du poids entre T0 et T96h, ainsi que l'indice gonadosomatique à T96h.

La perte de poids (WL_{T96-T0}) a été calculée comme le pourcentage de différence à T96h par rapport à T0 :

$$WL (\%) = \frac{\text{poids } T96h (g) - \text{poids } T0 (g)}{\text{poids } T0 (g)} \times 100 \quad (1)$$

L'indice gonadosomatique (IGS) reflète la maturation gonadique et l'investissement énergétique dans la reproduction (Kime, 1999; Palstra and van den Thillart,

2010; Pérez et al., 2011). Il est calculé pour chaque sexe à partir du poids des gonades :

$$\text{IGS} = \frac{\text{poids des gonades (g)}}{\text{poids total (g)}} \times 100 \quad (2)$$

Les effets individuels et combinés des pesticides et de la température sont évalués en réalisant des ANOVAs et MANOVAs factorielles avec mesures répétées puis des tests-post-hoc LSD de Fisher pour évaluer (1) l'effet de la condition à un temps donné, (2) l'effet temps dans chaque condition (i.e. différence entre T0 et T96h) et (3) l'effet de la condition sur cette différence. Les comparaisons entre les groupes sont réalisées par le test post hoc de l'ANOVA LSD de Fisher ou par des tests de Kruskal-Wallis (KW) et son test post-hoc en cas de non-respect de la condition d'homogénéité des variances. Le comportement alimentaire dans chaque groupe a été évalué par une analyse de survie de Kaplan-Meier

(Muenchow et al., 1986) qui intègre les mesures de la latence et la prise alimentaire (OUI/NON). L'effet de la condition sur la fonction de survie a été testé par un test de Wilcoxon généralisé de Gehan, suivie d'une analyse post-hoc par un test F de Cox.

3. Résultats

3.1. Réponses comportementales

Les ANOVAs factorielles indiquent que les pesticides et surtout la température ont un effet significatif sur le comportement du carassin doré (Tableau 1). L'exposition aux pesticides affecte significativement le temps de nage après 96h d'exposition. La température affecte significativement le temps passé à nager (T0, T24h et T96h), la vitesse moyenne (T0), la distance parcourue (T0

Tableau 1. P-values des ANOVAs factorielles avec mesures répétées de l'effet individuel et combiné des pesticides, de la température et du temps sur le comportement du carassin doré (en gras, les p-values <0,05).

Variables	Effet (p-value)				
	Pesticides	Température	Pesticides * Température	Temps	
Temps passé à nager (min)	T0	0,290	0,000	0,261	0,000
	T24h	0,092	0,000	0,289	
	T96h	0,008	0,000	0,780	
Vitesse moyenne (m.s ⁻¹)	T0	0,733	0,000	0,950	0,007
	T96h	0,068	0,220	0,974	
Accélération moyenne (m.s ⁻¹ .s ⁻¹)		0,518	0,000	0,210	0,005
		0,999	0,084	0,858	
Distance parcourue (m)	T0	0,575	0,001	0,787	0,000
	T96h	0,099	0,043	0,959	
Nombre de zones explorées	T0	0,385	0,610	0,340	0,583
	T96h	0,613	0,018	0,531	
Nombre de changement de direction	T0	0,920	0,000	0,645	0,000
	T96h	0,539	0,009	0,900	
Nombre de granulés avalés		0,147	0,116	0,816	-
Latence pour aller se nourrir (s)		0,471	0,013	0,383	-

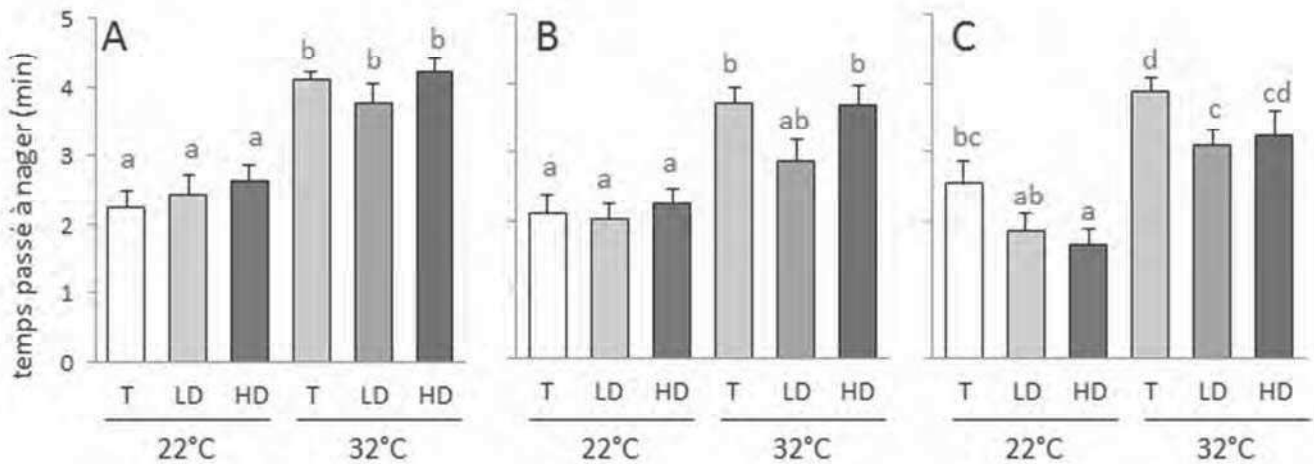


Figure 1. Effets des pesticides et de la température sur la locomotion du carassin doré

Le temps de nage moyen (en minutes) est chronométré sur un temps d'observation de 5 minutes à T0 (A), T24h (B) et T96h (C). N=24. Moyenne \pm SE. Lettres : homogénéité des groupes, Fisher LSD post-hoc test. Abréviations : T = témoins ; LD = faible dose ; HD = forte dose.

et T96h), le nombre de zones explorées (T96h), le nombre de changement de direction (T0, T24h et T96h) ainsi que la latence pour aller se nourrir. En revanche, les pesticides et la température ne présentent pas d'interaction significative sur ces paramètres comportementaux. Le temps a un effet significatif sur l'ensemble des comportements locomoteurs et exploratoires à l'exception du nombre de zones explorées.

Locomotion et comportement exploratoire

Chez les témoins, l'augmentation de la température augmente significativement le temps passé à nager à T0, T24 et T96h ($p < 0,001$, Fisher LSD post-hoc tests, Figure 1A, B et C respectivement). Elle augmente également la vitesse moyenne des poissons ($p = 0,007$), la distance parcourue ($p = 0,007$), le nombre de zones explorées ($p = 0,045$) et le nombre de changement de direction ($p = 0,000$) à T0. Cet effet est significatif à T96h pour le nombre de changement de direction ($p = 0,005$) et de zones explorées ($p = 0,042$).

Après 96h d'exposition, les pesticides diminuent le temps passé à nager, avec un effet significatif pour la HD à 22°C et la LD à 32°C par rapport à leur témoin respectif ($p = 0,021$ et $0,043$ respectivement, Fisher LSD post-hoc test, Figure 1C). Aucun effet significatif n'est observé sur les autres comportements locomoteurs et exploratoires, et ce quelle que soit la température d'exposition ($p > 0,05$ pour tous les paramètres, Table 1).

Le comportement des poissons évolue au cours de la période d'exposition (Tableau 1, $p < 0,01$ pour l'effet temps sur tous les paramètres, ANOVA avec mesures répétées). Les témoins à 22°C et 32°C ont une activité relativement stable entre T0 et T96h ($p = 0,32$ et $0,20$ respectivement, Fisher LSD post hoc). En revanche, les poissons exposés aux pesticides sont significativement moins actifs à T96h qu'à T0, avec un effet plus important à la HD ($p < 0,05$, Fisher LSD post hoc). Les témoins à 22°C sont plus rapides (+35%, $p = 0,005$ respectivement ; Fisher LSD post hoc, Figure 2A), parcourent plus de distance (+26%, $p = 0,033$; Fisher LSD post hoc, Figure 2B) et changent plus souvent de direction (+165%, $p < 0,001$; Fisher LSD post hoc, Figure 2C) à T96h qu'à T0. Une augmentation similaire est observée chez les poissons exposés à la LD à 22°C ($p > 0,05$ pour tous les paramètres, Fisher LSD post hoc – effet de la condition). En revanche, chez les poissons exposés à la HD à 22°C, cette augmentation est deux à trois fois moins importante que chez les témoins, avec un effet significatif sur le nombre de changements de direction ($p = 0,038$; Fisher LSD post hoc – effet de la condition). Le même effet est observé chez les poissons à 32°C, avec un effet maximal chez les poissons exposés à la HD à 32°C ($p < 0,05$ pour la vitesse moyenne, l'accélération moyenne et le nombre de changement de direction ; Fisher LSD post hoc - effet de la condition).

Comportement alimentaire

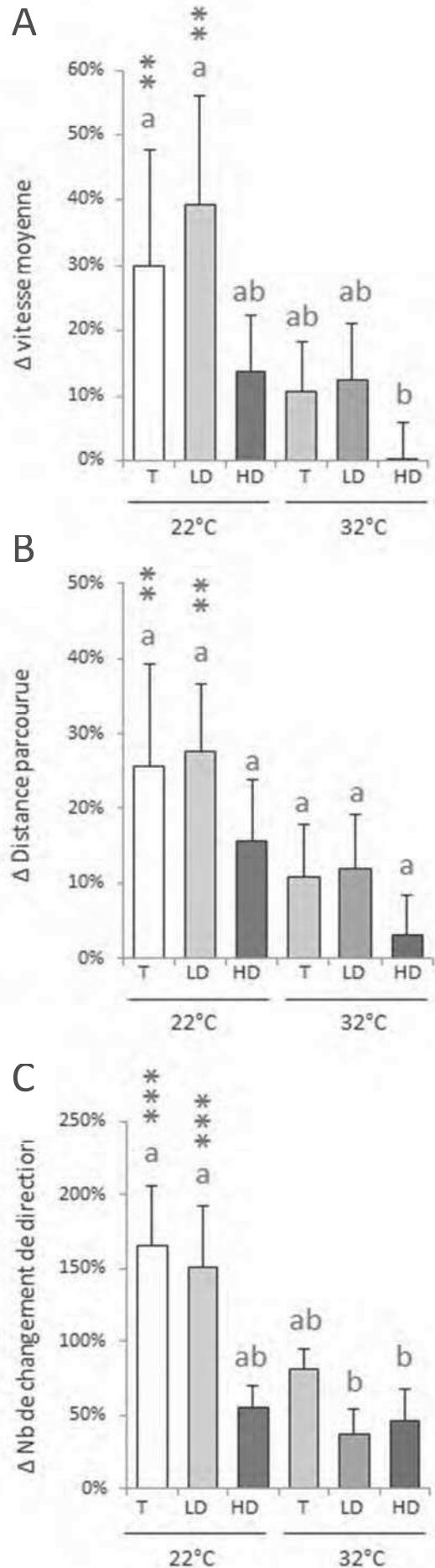
Le comportement alimentaire est évalué après 96h d'exposition aux pesticides à jeun. La faible dose (LD) en

pesticides n'affecte ni le taux d'alimentation (nombre de granulé avalé en 1 minute) ni la latence pour aller se nourrir et ce quelle que soit la température de l'eau ($p > 0,05$, KW post hoc tests, Figure 3 A et B). La forte dose (HD) en pesticides tend à augmenter le nombre de granulé avalés aux deux températures et à diminuer la latence à 22°C, mais les effets sont non significatifs comparés aux témoins ($p > 0,05$, KW post hoc tests). L'augmentation de la température diminue significativement la latence ($p = 0,002$, KW post hoc tests, Figure 3 B) et augmente le nombre de granulés avalés ($p = 0,004$, KW post hoc tests, Figure 3 A). Après 1 minute, 40,7% des poissons témoins à 22°C se sont nourris (Figure 3 C). Ce pourcentage augmente dans les autres conditions avec TEMOIN/22°C < LD/22°C < HD/22°C < TEMOIN/32°C < LD/32°C < HD/32°C. Cette augmentation est significative pour les trois groupes à 32°C comparés aux témoins à 22°C ($p = 0,018$, 0,005 et 0,004 pour les TEMOIN/32°C, LD/32°C et HD/32°C respectivement, test de proportion de Fisher).

La fonction de survie (Figure 4) calculée par la méthode de Kaplan-Meier montre que la condition influence significativement le comportement alimentaire des carassins (test Wilcoxon généralisé de Gehan : $p = 0,024$). Les poissons exposés à la LD/22°C ne présentent pas de différence significative par rapport aux témoins ($p < 0,05$, test post hoc F de Cox). En revanche, l'exposition à la HD à 22°C augmente significativement l'alimentation des poissons par rapport aux témoins ($p = 0,045$, test post hoc F de Cox). Le même effet est observé avec l'augmentation de la température (Témoins, LD et HD : $p = 0,011$, 0,004 et 0,003 respectivement par rapport au Témoins/22°C, test post hoc F de Cox).

Figure 2. Evolution du comportement entre T0 et T96h : effet des pesticides et de la température.

Evolution au cours du temps de la vitesse moyenne, (B) de la distance parcourue et (C) du nombre de changement de direction. La différence (en %) entre T0 et T96h est calculée pour chaque individu. $N = 24$. Moyenne \pm SE. Lettres : homogénéité des groupes, Fisher LSD post-hoc test (effet condition). Astérisques : différence T96h par rapport à T0 pour chaque groupe, LSD Fisher post hoc test (effet temps). * : $p < 0,05$, ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$. Abréviations : T = témoins ; LD = faible dose ; HD = forte dose.



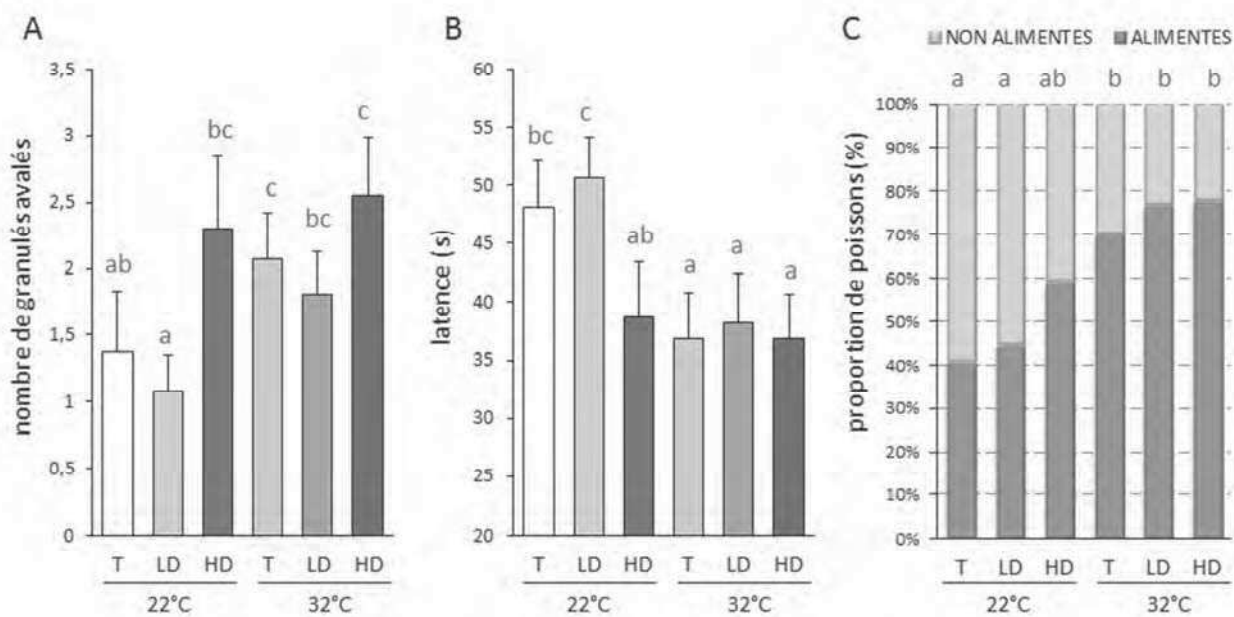


Figure 3. Effets des pesticides et de la température sur le comportement alimentaire des poissons

Le comportement alimentaire des poissons est étudié en déposant 10 granulés dans l'eau pendant 60s. Les paramètres mesurés sont (A) le nombre de granulés avalés pendant ces 60s, (B) la latence pour aller avaler le premier granulé (en seconde) et (C) le pourcentage de poisson ayant avalé au moins un granulé pendant ces 60s. N=24. Moyenne ± SE. Lettres : homogénéité des groupes, Kruskal-Wallis post-hoc tests (A et B) et test de comparaison de proportions de Fisher. Abréviations : T = témoins ; LD = faible dose ; HD = forte dose.

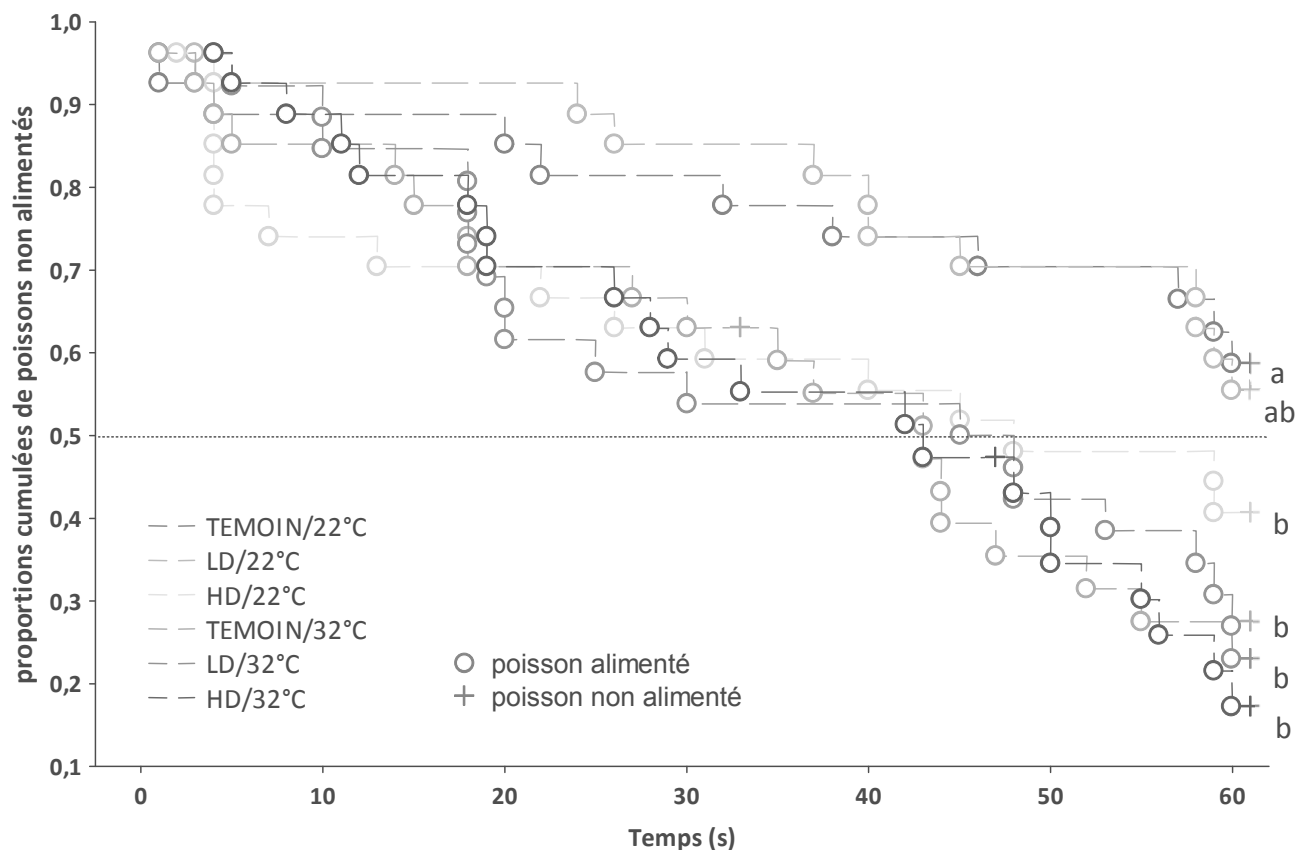


Figure 4. Estimation de la fonction de survie par la méthode de Kaplan-Meier pour le comportement alimentaire.

Après 96 heures d'exposition à jeun, 10 granulés flottants sont déposés à la surface de l'eau et laissé pendant 60s. Les cercles représentent les poissons se nourrissant à temps donné. Les croix représentent les poissons ne se nourrissant pas (données censurées). Lettres : comparaisons 2 à 2 des fonctions de survie par le test F de Cox. Abréviations : LD = faible dose. HD = forte dose.

3.2. Traits physiologiques

La température augmente significativement la perte de poids entre T0 et T96h par rapport aux groupes à 22°C ($p=0,009$ ANOVA test, Tableau 2). Cette diminution n'est toutefois significative que pour les témoins à 32°C ($p=0,032$, KW post hoc test, Figure 5A). Un effet croisé de la température et des pesticides est observé pour l'IGS des femelles (Tableau 2 et Figure 5B). L'IGS des femelles diminue significativement dans les groupes LD/22°C et T/32°C ($p=0,021$ et $0,025$ respectivement ; Fisher LSD post hoc), et non significativement dans le groupe HD/22°C ($p=0,068$; Fisher LSD post hoc). L'IGS des mâles ne présente pas de variation significative selon la condition ($p>0,05$; Fisher LSD post hoc).

4. Discussion

L'objectif de cette étude était (1) d'évaluer l'effet de différentes concentrations de pesticides et de l'augmentation de la température sur des traits comportementaux sous-jacents aux comportements de remaniement sédimentaire (locomotion, exploration et comportement alimentaire) et physiologiques liés au statut métaboliques des poissons (perte de poids et IGS) ; et (2) de confirmer ou d'infirmer les résultats discutés dans l'Article 1, à savoir que les pesticides et l'augmentation de la température entraînent individuellement une diminution de l'activité et du statut métabolique des poissons, avec une réponse antagoniste quand les deux stress sont combinés. Les résultats obtenus montrent que les pesticides et la température affectent bien le comportement et la physiologie des poissons, avec des effets croisés.

Toutefois ces résultats présentent certaines différences avec les résultats de l'Article 1 qui ouvrent de nouvelles perspectives présentées ici. L'ensemble des résultats présentés dans l'Article 1 et le Complément 1 permettent de définir globalement trois réponses comportementales et physiologiques différentes selon les conditions :

- (1) **Pesticides seuls** : diminution de l'activité générale (surtout à la HD) et du remaniement sédimentaire, utilisation des réserves énergétiques et diminution de l'investissement énergétique dans la reproduction (surtout à la LD) ;
- (2) **Augmentation de la température** : augmentation de l'activité générale, diminution du remaniement

Tableau 2. ANOVA factorielle de l'effet des pesticides et de la température sur différents traits physiologiques du carassin doré (en gras, les p-values <0,05).

Paramètres	p-value		
	Pesticides	Température	Pesticides* Température
Δ poids _{T96/T0}	0,739	0,009	0,601
IGS femelle	0,708	0,836	0,023
IGS mâle	0,857	0,536	0,361

Δ poids_{T96/T0}: perte de poids entre T0 et T96h (%) ; IGS : indice gonadosomatique.

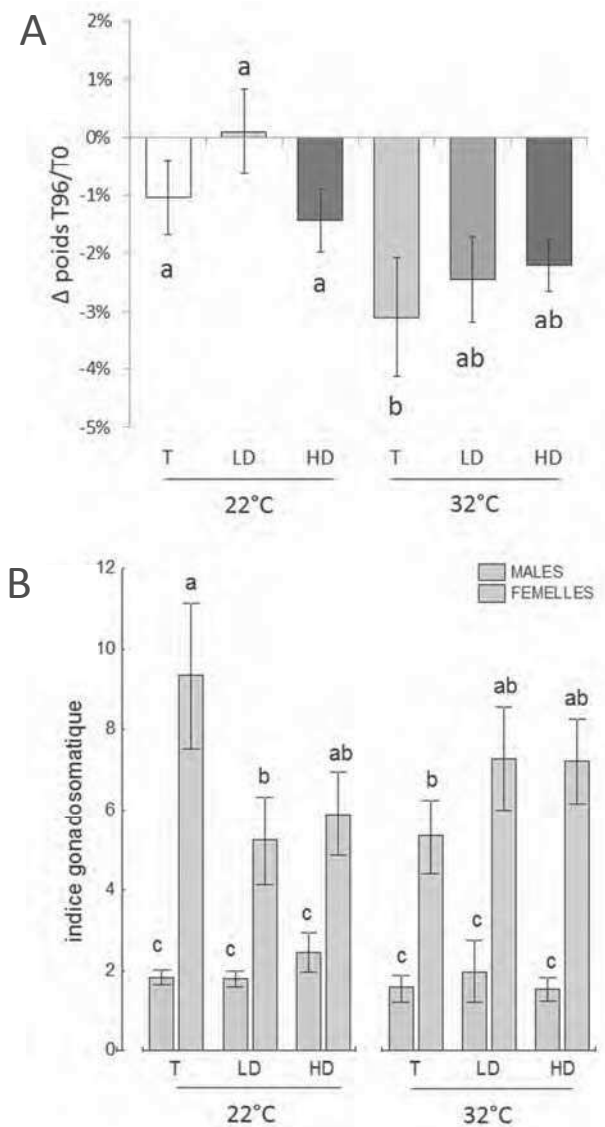


Figure 5. Effets des pesticides et de la température sur la perte de poids (A) et l'IGS (B) du carassin doré.

A : perte de poids (%) entre T0 et T96h. B : indice gonadosomatique (IGS) des mâles et de femelles à T96h. Moyenne \pm SE. N=24. Lettres : homogénéité des groupes (Kruskal-Wallis test et post-hoc et LSD Fisher post hoc test respectivement). Abréviations : T = témoins ; LD = faible dose ; HD = forte dose.

sédimentaire utilisation des réserves énergétique, augmentation de la synthèse de protéines dans le foie et diminution de l'investissement énergétique dans la reproduction ;

- (3) **Effets croisés** : diminution de l'activité générale et disparition des réponses physiologiques aux stress individuels.

Ces réponses et leurs potentielles conséquences à des échelles biologiques plus élevées sont discutées ici.

4.1. Effet des pesticides

Cette étude montre que l'exposition à un cocktail de pesticides à des concentrations environnementales entraîne une diminution du temps passé à nager au bout de 96 heures d'exposition, et ce quelle que soit la concentration des pesticides et la température de l'eau. La forte dose de pesticides tend également à inhiber la mobilité (vitesse et distance parcourue) et l'exploration (nombre de changement de direction) après 96h d'exposition.

Cette diminution de l'activité générale des poissons est cohérente avec la littérature. Des truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) exposées pendant 5 jours à un mélange d'atrazine, de linuron et de métolachlore à des concentrations respectives de 10, 15 et 45 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ montrent une diminution significative de leur mobilité (Shinn, 2010). L'atrazine est d'ailleurs classée dans la catégorie des substances entraînant un syndrome d'hypoactivité (Drummond and Russom, 1990). Une diminution de l'activité a également été montrée chez des poissons exposés à d'autres pesticides (Goulding et al., 2013; Little et al., 1990; Tierney et al., 2007) ou à des métaux lourds (Handy et al., 1999; McGeer et al., 2000; Rajotte and Couture, 2002).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette diminution de l'activité. La première est une diminution de la capacité locomotrice liée à des dommages épithéliaux au niveau des branchies, pouvant entraîner une diminution de la capacité d'absorption d'oxygène. Sachant que les contaminants chimiques augmentent la consommation d'oxygène pour une même vitesse de nage chez les poissons exposés, cela pourrait expliquer la baisse d'activité observée (Saglio and Trijasse, 1998). Des dommages histologiques sur les branchies des poissons ont été montrés pour l'atrazine à partir de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

(Alazemi et al., 1996; Nesković et al., 1993; Paulino et al., 2012a, 2012b), ainsi que pour d'autres herbicides tels que le glyphosate (Jiraungkoorskul et al., 2003; Nešković et al., 1996), le trifluraline (Poleksić and Karan, 1999), le paraquat (Rojik et al., 1983) et le 2,4-D (Nešković et al., 2008). Des analyses histopathologiques en cours sur les branchies des carassins exposés nous permettront d'évaluer la présence de dommages pouvant expliquer la diminution de l'activité des poissons.

Une deuxième hypothèse est que la diminution de l'activité chez les poissons exposés aux pesticides est due à une modification de la capacité métabolique aérobie des individus (différence entre le métabolisme en activité et le métabolisme standard). Cette modification peut être liée à l'induction des systèmes de défenses, la diminution de l'alimentation ou à l'effet direct du stress sur les voies métaboliques de production de l'énergie (Sokolova, 2013) Quelle qu'en soit la cause, une diminution de la capacité métabolique des individus entraîne une diminution de l'énergie disponible pour les activités discrétionnaires (e.g. recherche alimentaire, digestion, comportement sociaux) (Fry, 1947; Sokolova et al., 2012).

L'exposition à la forte dose (HD) à 22°C augmente l'alimentation des poissons. Une augmentation de l'appétit a aussi été montrée chez des truites arc-en-ciel exposées à des concentrations sublétales de cuivre (McGeer et al., 2000). Cette augmentation est mise en relation avec une augmentation de la demande en énergie pour l'osmorégulation, du taux métabolique basal et de la consommation en oxygène pendant la nage. L'augmentation du comportement alimentaire chez les poissons exposés à la forte dose est donc probablement une réponse adaptative permettant de compenser l'augmentation de la demande énergétique en réponse au stress chimique. Dans la nature, les poissons exposés aux contaminants peuvent également être soumis à une diminution de la quantité et de la qualité de la nourriture en raison soit de variations saisonnières de la production primaire soit de la dégradation de l'environnement (Heugens et al., 2001; Kennedy and Ross, 2012). Dans ces conditions, l'augmentation de la demande énergétique ne peut être compensée par une augmentation de l'alimentation. Cette concomitance de stress chimique et alimentaire peut entraîner une diminution de la condition globale des poissons et de leur capacité de tolérance aux

polluants (Heugens et al., 2001; Kennedy and Ross, 2012).

Le coût métabolique de l'induction des systèmes de défense, de détoxification et de réparation en réponse à un stress chimique peut être également compensé par une diminution des fonctions non vitales consommatrice d'énergie comme la croissance et la reproduction (Handy et al., 1999; Smolders et al., 2005). L'investissement énergétique dans la reproduction a été mesuré *via* l'indice gonadosomatique qui reflète la maturation des gonades (Kime, 1999; Palstra and van den Thillart, 2010; Pérez et al., 2011). Une diminution de l'IGS est observée chez les femelles exposées aux pesticides à 22°C, sans aucun effet visible chez les mâles. L'investissement énergétique nécessaire à la formation des ovaires et des œufs est généralement supérieur à celui requis pour la formation des spermatozoïdes. Dans l'hypothèse du coût métabolique, il n'est donc pas étonnant que la diminution de l'énergie disponible pour la reproduction impacte davantage les femelles que les mâles (Lawrence and Hemingway, 2003). De nombreuses études ont d'ailleurs montrées que les femelles et les mâles répondaient différemment aux stress chimiques (Kling et al., 2008; Spanò et al., 2004; Versonnen et al., 2003). La diminution de l'IGS peut également être le signe d'un dysfonctionnement des gonades liée à une diminution de l'activité de l'hypothalamus, de l'hypophyse ou des gonades elles-mêmes (Kime, 1999). Plusieurs études ont cherché à évaluer les effets d'une exposition de 21 jours à différents herbicides sur la reproduction des poissons (Solomon et al., 2013). Dans l'ensemble, ces études ne montrent pas d'effet sur les hormones reproductrices, l'IGS, le développement des gonades ou les caractéristiques sexuelles, indiquant un faible potentiel de perturbation endocrinienne des herbicides (Solomon et al., 2013). Par contre, le potentiel de perturbateur endocrinien chez les poissons a été montré pour plusieurs fongicides dont le tébuconazole (Ankley et al., 2002; Kinnberg et al., 2007; Koakoski et al., 2014). Des analyses histopathologiques sont en cours pour déterminer la présence de potentiels dommages cellulaires et tissulaires.

4.2. Effet de la température

Les résultats présentés dans l'article 1 montraient une diminution du comportement de remaniement sédimentaire à 32°C par rapport à 22°C. Dans cette étude

complémentaire, l'augmentation de la température s'accompagne d'une augmentation significative de l'activité de locomotion des poissons, du comportement exploratoire et de l'alimentation.

L'augmentation de l'activité générale des poissons avec la température est cohérente avec la littérature. Fry et Hart (1946 (Fry and Hart, 1946)) et Reynolds et Casterlin (1979 (Reynolds and Casterlin, 1980)) ont montré une augmentation respectivement de la vitesse de nage et de la locomotion du carassin doré à 32°C par rapport à 22°C. L'augmentation de la température, dans les limites de tolérance de l'espèce (Fry and Hart, 1946; Sullivan et al., 2000), entraîne une augmentation du métabolisme actif et basal ainsi que de la capacité métabolique aérobie (Claireaux et al., 2000; Fry and Hart, 1946; López-Olmeda and Sánchez-Vázquez, 2011), et donc de l'énergie disponible pour l'activité (Como et al., 2013; Fitzgibbon et al., 2007; Pang et al., 2011).

La diminution de l'activité de remaniement sédimentaire montrée dans l'Article 1 n'est donc pas liée à une diminution générale de l'activité. Elle peut indiquer une modification du profil vertical de déplacement des poissons et de la position dans la colonne d'eau en réponse à la diminution de la dissolution de l'oxygène dans l'eau et de l'augmentation de la demande cellulaire en oxygène. La combinaison de ces deux facteurs peut entraîner une insuffisance en oxygène (Pörtner et al., 2004), les poissons nageant alors plus près de la surface ou à proximité des sources d'oxygène (obs. pers).

Dans cette étude l'alimentation augmente avec la température, probablement pour compenser l'augmentation de la demande énergétique (Biro et al., 2007; Como et al., 2013; Ferreira et al., 1998). Le même effet a été montrée chez d'autres espèces de poissons (Como et al., 2013; Fonds et al., 1992; Luo et al., 2013). L'augmentation de la demande énergétique chez les carassins à jeun entraîne ainsi une perte de poids significativement plus importante à 32°C qu'à 22°C ainsi qu'une diminution de l'investissement dans la reproduction (diminution significative de l'IGS chez les femelles). Bien qu'une légère augmentation de la température entraîne généralement une augmentation de la fécondité, une augmentation plus forte (de l'ordre de 6-8°C) ou durant plusieurs mois entraîne un échec de la reproduction chez le chabot commun (*Cottus gobio*) avec une diminution de la masse et de la maturation des gonades, de leur contenu en lipides, de la fécondité et du

diamètre des œufs (Abdoli et al., 2005; Dorts et al., 2012; Reyjol et al., 2009). Ainsi, une augmentation de la température dans la gamme de tolérance de l'espèce peut malgré tout entraîner une diminution de l'investissement énergétique dans la reproduction avec des implications écologiques sur les populations.

4.3. Effet croisés de la température et des pesticides

Dans l'article 1, les résultats montraient un effet antagoniste des stress chimiques et thermiques sur le comportement des carassins dorés. Dans cette étude en revanche, l'exposition aux pesticides diminue le temps passé à nager après 96h d'exposition aux deux températures, et inhibe l'activité et du comportement exploratoire surtout à 32°C.

Toutefois, les réponses physiologiques des poissons (i.e. perte de poids et IGS) sont moins importantes lorsque les stress sont combinés que dans le cas d'une exposition aux stress individuels, indiquant un effet antagoniste de la température et des pesticides sur le métabolisme des poissons. A cette échelle, ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans l'Article 1 (i.e. effet antagoniste sur l'utilisation des réserves énergétiques).

Des effets antagonistes de la température et des polluants sur les organismes aquatiques ont été reportés dans la littérature (Jackson et al., 2015). Plusieurs hypothèses permettent de l'expliquer. La première est que l'augmentation de la température modifie le comportement dans l'eau des molécules (i.e. volatilisation), leur biodisponibilité et/ou leur toxicité (Noyes et al., 2009; Schiedek et al., 2007). La seconde hypothèse est que l'augmentation de la température diminue la sensibilité des poissons au stress chimique (1) en accélérant la métabolisation des contaminants et leur détoxification (Jackson et al., 2015; Noyes et al., 2009), (2) en entraînant la synthèse de systèmes de défense polyvalents qui peuvent protéger l'organisme contre un stress chimique consécutif (i.e. HSPs et antioxydants) (Polla et al., 1996; Tedengren et al., 2000) ou encore (3) en modifiant le fonctionnement de l'axe Hypothalamo-Hypophysio-Interrénal (HHI) et par conséquent la sécrétion des corticostéroïdes impliqués dans la réponse métabolique au stress (Romero, 2004). Toutefois ces hypothèses n'expliquent pas l'inhibition de la réponse physiologique à l'augmentation de la température. De plus, la grande majorité des études montrent un effet

synergétique entre la température et les pesticides chez les poissons, et notamment les herbicides (Holmstrup et al., 2010; Macek et al., 1969; Osterauer and Köhler, 2008; Sekine et al., 1996).

La balance énergétique est un mécanisme clé dans la réponse au stress (Barton, 2002; Selye, 1950) et détermine en grande partie la capacité des organismes à répondre à ce stress (Sokolova, 2013). L'augmentation du métabolisme basal avec la température, associée au coût métabolique de l'induction des systèmes de défense face aux contaminants et à la limitation de des ressources alimentaires entraîne une augmentation importante de la demande énergétique (Kennedy and Ross, 2012). Lorsque la demande énergétique devient trop importante (i.e. lorsque l'intensité du stress augmente, devient chronique ou que plusieurs stress se cumulent) les réponses adaptatives au stress peuvent devenir délétères pour l'organisme (Pickering and Pottinger, 1989; Santos et al., 2010). Sokolova (2012, 2013 (Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012)) a décrit un état d' "arrêt métabolique" lorsque la demande énergétique dépasse les capacités de compensation métabolique. Cet état se caractérise par une disparition de la réponse métabolique au stress associée à une diminution de l'activité générale. Il s'agit d'une stratégie métabolique de conservation, par opposition à la stratégie métabolique dite de compensation, permettant à l'organisme de survivre au stress jusqu'à ce que les conditions environnementales s'améliorent. Cette réponse est réversible mais les individus ne peuvent survivre à long terme dans ces conditions environnementales. L'absence de compensation métabolique et la diminution plus importante de l'activité chez les poissons exposés à la forte dose à 32°C vont dans le sens de cette hypothèse, les poissons répondant au stress thermique et chimique combinés par une stratégie de conservation. Le passage d'une réponse métabolique de compensation à une réponse de conservation indique le passage d'un stress modéré à un stress extrême.

5. Conclusion

L'Article 1 et les données complémentaires obtenues dans cette étude montrent qu'une exposition de courte durée à un cocktail de pesticides représentatif des contaminations observées dans les rivières du sud-ouest de la France a des effets sur le comportement, le statut physiologique et la reproduction du carassin doré.

Les résultats montrent que la balance énergétique est fortement impliquée dans la réponse aux pesticides comme à l'augmentation de la température, avec des modifications des processus produisant et consommant de l'énergie. Les effets observés sur le comportement, la condition et la reproduction peuvent être en grande partie expliqués par des modifications du métabolisme basal et actif et des compromis énergétiques. L'ensemble de ces données semblent confirmer les hypothèses sur la stratégie métabolique mise en place par les poissons pour résister à ce stress chimique, à savoir :

Pesticides seuls : stratégie de compensation du coût métabolique de l'induction des systèmes de défense avec (1) l'utilisation des réserves énergétiques, (2) la diminution de l'investissement énergétique dans la reproduction, et (3) la diminution de l'activité générale.

Augmentation de la température : augmentation du métabolisme se traduisant par une augmentation de l'activité générale et une compensation métabolique (utilisation des réserves énergétiques), associée à l'augmentation de la synthèse de protéines dans le foie (e.g. protéines de défense type HSP et antioxydant (Viant et al., 2003));

Effets combinés : stratégie de conservation avec diminution de l'activité générale et arrêt métabolique.

Toutefois des analyses complémentaires sont en cours, notamment pour déterminer la présence de dommages causés par les pesticides sur les branchies, le foie et les gonades.

L'action antagoniste des pesticides et de la température sur la réponse métabolique peut donc paradoxalement indiquer une augmentation du niveau de stress subis par les poissons, avec le passage d'une stratégie de compensation à une stratégie de conservation, non soutenable sur le long terme. Cette réponse suggère que l'augmentation de la température diminue les limites de tolérance des poissons face à la contamination de l'eau par les pesticides (Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012).

Le foie, organe central de la régulation du métabolisme énergétique et de la détoxification des substances chimiques, est particulièrement impliqué dans la réponse aux stress chimiques et thermique, avec des réponses contrastées selon la nature du stress. Afin d'approfondir les résultats obtenus, des analyses au niveau moléculaire sont nécessaires pour déterminer (1) quelles sont les voies métaboliques impliquées tant dans la stratégie

métabolique de compensation que de conservation nécessaires, (2) l'induction de systèmes de défense sous l'effet des stress individuels et combinés, et (3) l'apparition potentielle de signes précoces d'hépatotoxicité.

Références

- Abdoli, A., Pont, D., Sagnes, P., 2005. Influence of female age, body size and environmental conditions on annual egg production of the bullhead. *J. Fish Biol.* 67, 1327–1341. doi:10.1111/j.0022-1112.2005.00829.x
- Alazemi, B.M., Lewis, J.W., Andrews, E.B., 1996. Gill Damage in the Freshwater Fish *Gnathonemus petersii* (Family: Mormyridae) Exposed to Selected Pollutants: An Ultrastructural Study. *Environ. Technol.* 17, 225–238. doi:10.1080/09593331708616381
- Alonso, A., De Lange, H.J., Peeters, E.T.H.M., 2009. Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor. *Chemosphere* 75, 341–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.12.031
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L., 2002. Evaluation of the Aromatase Inhibitor Fadrozole in a Short-Term Reproduction Assay with the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 67, 121–130. doi:10.1093/toxsci/67.1.121
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525. doi:10.1093/icb/42.3.517
- Beitinger, T.L., 1990. Behavioral Reactions for the Assessment of Stress in Fishes. *J. Great Lakes Res.* 16, 495–528. doi:10.1016/S0380-1330(90)71443-8
- Biro, P.A., Post, J.R., Booth, D.J., 2007. Mechanisms for climate-induced mortality of fish populations in whole-lake experiments. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 9715–9. doi:10.1073/pnas.0701638104
- Claireaux, G., Webber, D.M., Lagardère, J.-P., Kerr, S.R., 2000. Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Sea Res.* 44, 257–265. doi:10.1016/S1385-1101(00)00053-8
- Como, S., Lefrançois, C., Maggi, E., Antognarelli, F., Dupuy, C., 2013. Behavioral responses of juvenile golden gray mullet *Liza aurata* to changes in coastal temperatures and consequences for benthic food resources. *J. Sea Res.* doi:10.1016/j.seares.2013.10.004
- Dell, A.I., Bender, J.A., Branson, K., Couzin, I.D., de Polavieja, G.G., Noldus, L.P.J.J., Pérez-Escudero, A., Perona, P., Straw, A.D., Wikelski, M., Brose, U., 2014. Automated image-based tracking and its application in ecology. *Trends Ecol. Evol.* 29, 417–428. doi:10.1016/j.tree.2014.05.004
- Dorts, J., Grenouillet, G., Douxfils, J., Mandiki, S.N.M., Milla, S., Silvestre, F., Kestemont, P., 2012. Evidence that Elevated Water Temperature Affects the Reproductive Physiology of the European Bullhead *Cottus Gobio*. *Fish Physiol.*

- Biochem. 38, 389–399. doi:10.1007/s10695-011-9515-y
- Drummond, R.A., Russom, C.L., 1990. Behavioral toxicity syndromes: A promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 37–46. doi:10.1002/etc.5620090106
- Ferreira, D.E.L., Peret, A.C., Coutinho, R., 1998. Seasonal grazing rates and food processing by tropical herbivorous fishes. *J. Fish Biol.* 53, 222–235. doi:10.1111/j.1095-8649.1998.tb01029.x
- Fitzgibbon, Q.P., Strawbridge, A., Seymour, R.S., 2007. Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mullet, *Argyrosomus japonicus* (Pisces: Sciaenidae). *Aquaculture* 270, 358–368. doi:10.1016/j.aquaculture.2007.04.038
- Fonds, M., Cronie, R., Vethaak, a. D., Van Der Puyl, P., 1992. Metabolism, food consumption and growth of plaice (*Pleuronectes platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) in relation to fish size and temperature. *Netherlands J. Sea Res.* 29, 127–143. doi:10.1016/0077-7579(92)90014-6
- Fry, F., 1947. Effects of the environment on animal activity. Univ. of Toronto Press, Toronto.
- Fry, F.E.J., Hart, J.S., 1946. The relation of temperature to oxygen consumption in the goldfish. *Anat. Rec.* 96, 586. doi:10.2307/1538211
- Fu, S.-J., Zeng, L.-Q., Li, X.-M., Pang, X., Cao, Z.-D., Peng, J.-L., Wang, Y.-X., 2009. The behavioural, digestive and metabolic characteristics of fishes with different foraging strategies. *J. Exp. Biol.* 212, 2296–302. doi:10.1242/jeb.027102
- Goulding, A.T., Shelley, L.K., Ross, P.S., Kennedy, C.J., 2013. Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 157, 280–286. doi:10.1016/j.cbpc.2013.01.001
- Handy, R.D., Sims, D.W., Giles, a., Campbell, H. a., Musonda, M.M., 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat. Toxicol.* 47, 23–41. doi:10.1016/S0166-445X(99)00004-1
- Heugens, E.H.W., Hendriks, A.J., Dekker, T., Straalen, N.M. van, Admiraal, W., 2001. A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 247–284. doi:10.1080/20014091111695
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
- Jackson, M.C., Loewen, C.J.G., Vinebrooke, R.D., Chimimba, C.T., 2015. Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis. *Glob. Chang. Biol.* doi:10.1111/gcb.13028
- Jiraungkoorskul, W., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grans, S., Pokethitiyook, P., 2003. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Environ. Toxicol.* 18, 260–7. doi:10.1002/tox.10123
- Kennedy, C.J., Ross, P.S., 2012. Stress syndromes: Heightened bioenergetic costs associated with contaminant exposure at warm temperatures in teleosts. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8, 202–204. doi:10.1002/ieam.1261
- Kime, D.E., 1999. A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *Sci. Total Environ.* 225, 3–11. doi:10.1016/S0048-9697(98)00328-3
- Kinnberg, K., Holbeck, H., Petersen, G.I., Bjerregaard, P., 2007. Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145, 165–70. doi:10.1016/j.cbpc.2006.11.002
- Kling, P., Norman, a., Andersson, P.L., Norrgren, L., Förlin, L., 2008. Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of brominated flame retardants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 319–327. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.12.010
- Koakoski, G., Quevedo, R.M., Ferreira, D., Oliveira, T.A., da Rosa, J.G.S., de Abreu, M.S., Gusso, D., Marqueze, A., Kreutz, L.C., Giacomini, A.C.V., Fagundes, M., Barcellos, L.J.G., 2014. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. *Chemosphere* 112, 85–91. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.083
- Lawrence, A., Hemingway, K., 2003. Effects of Pollution on Fish. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. doi:10.1002/9780470999691
- Little, E.E., Archeski, R.D., Flerov, B.A., Kozlovskaya, V.I., 1990. Behavioral indicators of sublethal toxicity in rainbow trout. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 19, 380–385. doi:10.1007/BF01054982
- López-Olmeda, J.F., Sánchez-Vázquez, F.J., 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Therm. Biol.* 36, 91–104. doi:10.1016/j.jtherbio.2010.12.005
- Luo, M., Guan, R., Li, Z., Jin, H., 2013. The effects of water temperature on the survival, feeding, and growth of the juveniles of *Anguilla marmorata* and *A. bicolor pacifica*. *Aquaculture* 400-401, 61–64. doi:10.1016/j.aquaculture.2013.03.003
- Macek, K.J., Hutchinson, C., Cope, O.B., 1969. The effects of temperature on the susceptibility of bluegills and rainbow trout to selected pesticides. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 4, 174–183. doi:10.1007/BF01560960
- McGeer, J.C., Szebedinszky, C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2000. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Ionoregulatory disturbance and metabolic costs. *Aquat. Toxicol.* 50, 231–243. doi:10.1016/S0166-445X(99)00105-8
- Melvin, S.D., Wilson, S.P., 2013. The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: A meta-analysis. *Chemosphere* 93, 2217–2223.

- doi:10.1016/j.chemosphere.2013.07.036
- Montgomery, D.R., Buffington, J.M., Peterson, N.P., Schuett-Hames, D., Quinn, T.P., 1996. Stream-bed scour, egg burial depths, and the influence of salmonid spawning on bed surface mobility and embryo survival. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 1061–1070. doi:10.1139/f96-028
- Muenchow, G., Ecology, S., Feb, N., Muenchow, G., 1986. Ecological use of failure time analysis. *Ecology* 67, 246–250. doi:10.2307/1938524
- Nesković, N.K., Elezović, I., Karan, V., Poleksić, V., Budimir, M., 1993. Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 25, 173–82. doi:10.1006/eesa.1993.1016
- Nešković, N.K., Karan, V., Elezović, I., Poleksić, V., Budimir, M., 2008. Toxic effects of 2,4-D herbicide on fish. *J. Environ. Sci. Heal. Part B.*
- Nešković, N.K., Poleksić, V., Elezović, I., Karan, V., Budimir, M., 1996. Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56, 295–302. doi:10.1007/s001289900044
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L. a., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971–986. doi:10.1016/j.envint.2009.02.006
- Osterauer, R., Köhler, H.R., 2008. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 86, 485–494. doi:10.1016/j.aquatox.2007.12.013
- Palstra, A.P., van den Thillart, G.E.E.J.M., 2010. Swimming physiology of European silver eels (*Anguilla anguilla* L.): Energetic costs and effects on sexual maturation and reproduction. *Fish Physiol. Biochem.* 36, 297–322. doi:10.1007/s10695-010-9397-4
- Pang, X., Cao, Z.D., Fu, S.J., 2011. The effects of temperature on metabolic interaction between digestion and locomotion in juveniles of three cyprinid fish (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Spinibarbus sinensis*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 159, 253–260. doi:10.1016/j.cbpa.2011.03.013
- Paulino, M.G., Sakuragui, M.M., Fernandes, M.N., 2012a. Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*. *Chemosphere* 86, 1–7. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.08.033
- Paulino, M.G., Souza, N.E.S., Fernandes, M.N., 2012b. Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80, 6–13. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.02.001
- 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. *Neurotoxicol. Teratol.* 39, 45–56. doi:10.1016/j.ntt.2013.07.001
- Pérez, L., Peñaranda, D.S., Dufour, S., Baloché, S., Palstra, a. P., Van Den Thillart, G.E.E.J.M., Asturiano, J.F., 2011. Influence of temperature regime on endocrine parameters and vitellogenesis during experimental maturation of European eel (*Anguilla anguilla*) females. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 51–59. doi:10.1016/j.ygcen.2011.08.009
- Pestana, J.L.T., Ré, A., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., 2007. Effects of Cadmium and Zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda). *Chemosphere* 68, 1556–62. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.02.053
- Pickering, A.D., Pottinger, T.G., 1989. Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol. Biochem.* 7, 253–258. doi:10.1007/bf00004714
- Poleksić, V., Karan, V., 1999. Effects of trifluralin on carp: biochemical and histological evaluation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 43, 213–21. doi:10.1006/eesa.1999.1790
- Polla, B.S., Kantengwa, S., François, D., Salvioli, S., Franceschi, C., Marsac, C., Cossarizza, A., 1996. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6458–6463. doi:10.1073/pnas.93.13.6458
- Pörtner, H.O., Mark, F.C., Bock, C., 2004. Oxygen limited thermal tolerance in fish?—Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 243–260. doi:10.1016/j.resp.2004.03.011
- Rajotte, J., Couture, P., 2002. Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*). *Can. J. Fish. ...* 1304, 1296–1304. doi:10.1139/F02-095
- Reise, K., 2002. Sediment mediated species interactions in coastal waters. *J. Sea Res.* 48, 127–141. doi:10.1016/S1385-1101(02)00150-8
- Reyjol, Y., Léna, J.-P., Hervant, F., Pont, D., 2009. Effects of temperature on biological and biochemical indicators of the life-history strategy of bullhead *Cottus gobio*. *J. Fish Biol.* 75, 1427–45. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02373.x
- Reynolds, W.W., Casterlin, M.E., 1980. The role of temperature in the environmental physiology of fishes, in: Ali, M.A. (Ed.), *Environmental Physiology of Fishes*, NATO Advanced Study Institutes Series. Springer US, pp. 497–518. doi:10.1007/978-1-4899-3659-2_19
- Rojik, I., Nemcsók, J., Boross, L., 1983. Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides. *Acta Biol. Hung.* 34, 81–92.
- Romero, L.M., 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19, 249–255. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.008
- Saglio, P., Trijasse, S., 1998. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 484–491. doi:10.1007/s002449900406
- Santos, G.A., Schrama, J.W., Mamauag, R.E.P., Rombout, J.H.W.M., Verreth, J.A.J., 2010. Chronic stress impairs performance, energy metabolism and welfare indicators in European seabass (*Dicentrarchus labrax*): The

- combined effects of fish crowding and water quality deterioration. *Aquaculture* 299, 73–80. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.11.018>
- Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R.W., 2007. Interactions between climate change and contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1845–1856. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.09.020
- Sekine, M., Nakanishi, H., Ukita, M., 1996. Study on fish mortality caused by the combined effects of pesticides and changes in environmental conditions. *Ecol. Modell.* 86, 259–264. doi:10.1016/0304-3800(95)00061-5
- Selye, H., 1950. Stress and the General Adaptation Syndrome. *BMJ* 1, 1383–1392. doi:10.1136/bmj.1.4667.1383
- Shinn, C., 2010. Impact of toxicants on stream fish biological traits. *Lab. Evol. Divers. Biol. (UMR 5174)*. Université Paul Sabatier, Toulouse III, Toulouse.
- Smolders, R., Coen, W. De, Blust, R., 2005. Integrative measures of toxicant exposure in zebra fish (*Danio rerio*) at different levels of biological organization, in: Ostrander, G.K. (Ed.), *Techniques in Aquatic Toxicology - Volume 2*. pp. 5–7.
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integr. Comp. Biol.* doi:10.1093/icb/ict028
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A. a., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. doi:10.1016/j.marenvres.2012.04.003
- Solomon, K.R., Dalhoff, K., Volz, D., Van Der Kraak, G., 2013. Effect of herbicides on fish, in: Tierney, K.B., Farrell, A., Brauner, C.J. (Eds.), *Organic Chemical Toxicology of Fishes. Fish Physiology: Volume 33*. pp. 369–409.
- Spanò, L., Tyler, C.R., Aerle, R. van, Devos, P., Mandiki, S.N., Silvestre, F., Thomé, J.-P., Kestemont, P., 2004. Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 66, 369–379. doi:10.1016/j.aquatox.2003.10.009
- Sullivan, K., Martin, D.J., Cardwell, R.D., 2000. An analysis of the effect of temperature on salmonids of the Pacific northwest with implications for selecting temperature criteria, Institute . ed. Portland, Oregon.
- Tedengren, M., Olsson, B., Reimer, O., Brown, D.C., Bradley, B.P., 2000. Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP 70 levels in Baltic Sea mussels. *Aquat. Toxicol.* 48, 1–12. doi:10.1016/S0166-445X(99)00030-2
- Tierney, K.B., Singh, C.R., Ross, P.S., Kennedy, C.J., 2007. Relating olfactory neurotoxicity to altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used pesticides. *Aquat. Toxicol.* 81, 55–64. doi:10.1016/j.aquatox.2006.11.006
- Versnoren, B.J., Arijs, K., Verslycke, T., Lema, W., Janssen, C.R., 2003. In vitro and in vivo estrogenicity and toxicity of o-, m-, and p-dichlorobenzene. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 329–335. doi:10.1897/1551-5028(2003)022<0329:IVAIVE>2.0.CO;2
- Viant, M.R., Werner, I., Rosenblum, E.S., Gantner, a. S., Tjeerdema, R.S., Johnson, M.L., 2003. Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 159–171. doi:10.1023/B:FISH.0000035938.92027.81
- Virtualdub software [WWW Document], 2015. URL <http://www.virtualdub.org/> (accessed 11.3.15).
- Wood-Gush, D.G.M., Vestergaard, K., 1989. Exploratory behavior and the welfare of intensively kept animals. *J. Agric. Ethics* 2, 161–169. doi:10.1007/BF01826929

CHAPITRE 4.

Réponse du protéome hépatique

RESUME DU CHAPITRE

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la réponse du protéome hépatique du carassin doré (*Carassius auratus*) exposé à un cocktail de pesticides réaliste d'un point de vue environnemental à deux températures afin de déterminer (1) le mode d'action du cocktail de pesticides et (2) la réponse générale aux stress individuels et combinés et (3) de détecter des signes précoces d'hépatotoxicité le cas échéant. Cette étude est présentée dans l'Article 2.

Dans le chapitre précédent nous avons montré que l'exposition à un cocktail de pesticides représentatif des contaminations observées dans le Sud-ouest de la France et à une augmentation de la température entraînent une réponse comportementale et métabolique chez le carassin doré, avec des effets croisés significatifs. Plusieurs hypothèses ont été proposées pour expliquer ces réponses. La première est que les modifications comportementales et physiologiques observées chez les poissons exposés aux pesticides constituent une réponse classique d'adaptation au stress. Le coût métabolique de l'induction des systèmes de défense (protection, détoxification et réparation) et du maintien de l'homéostasie est compensé par des compromis énergétiques avec l'activité et la reproduction et l'utilisation des réserves énergétiques. Il est toutefois également possible que le mélange de pesticides entraîne des dommages cellulaire et/ou tissulaire sur les organes (branchies, foie et/ou gonades) affectant par conséquent le bon fonctionnement de l'organisme. D'un autre côté, l'augmentation du métabolisme basal et actif et de la capacité métabolique aérobie avec la température se traduit par une augmentation de l'activité et de l'alimentation des poissons. Elles sont compensées en condition de nourriture limitée par l'utilisation des réserves énergétiques et une diminution de l'investissement énergétique dans la reproduction. Lorsque les deux stress sont combinés, la réponse comportementale est plus importante mais les réponses métaboliques et physiologiques aux deux stress individuels disparaissent (interaction antagoniste). La principale hypothèse retenue pour expliquer cet effet est le passage d'une stratégie métabolique de compensation à une stratégie de conservation. Autrement dit, le coût bioénergétique de l'adaptation dépasse les capacités métaboliques des poissons qui entrent alors en arrêt métabolique (i.e. disparition de la capacité métabolique aérobie, diminution du métabolisme basal et stockage de l'énergie).

Ces réponses adaptatives au stress et/ou toxiques se traduisent aux échelles moléculaires par la modification des voies impliquées dans la production/stockage de l'énergie, dans la détoxification, la protection ou la réparation de dommages cellulaires ou encore dans la régulation du cycle de vie et du

fonctionnement cellulaire [9,150,454]. Le foie est un organe central chez les vertébrés dans la mesure où il régule le métabolisme et assure le maintien de l'homéostasie énergétique essentielle au bon fonctionnement des autres organes, et notamment du cerveau. C'est également un organe fortement impliqué dans les processus de détoxification des contaminants. Toutefois les effets moléculaires des mélanges complexes de pesticides à des concentrations environnementales ont été très peu étudiés [8,9]. De plus, à notre connaissance, aucune étude sur les effets croisés de la température et des pesticides sur la réponse moléculaire hépatique des poissons n'a été réalisée.

La protéomique est une technique d'analyse moléculaire issue du champ biomédical et utilisée de façon croissante en écotoxicologie depuis 30 ans [455,456]. Les protéines sont à l'interaction entre le génome et le phénotype des organismes [457] et assurent les fonctions biologiques nécessaires au fonctionnement des organismes. La protéomique quantitative ou semi-quantitative permet d'étudier l'influence des conditions environnementales sur le protéome (i.e. ensemble des protéines présentes à un instant donné dans les cellules) d'un tissu, d'un organe ou d'un organisme entier [457,458]. Elle permet ainsi d'évaluer le mode d'action d'une substance toxique et de déterminer de potentiels biomarqueurs d'exposition ou d'effet [455,456,459]. Elle peut également être utilisée pour évaluer la réponse d'un organisme soumis à des stress multiples, qu'ils soit chimiques (mélanges de contaminants) ou non (e.g. température, salinité ou pathogènes...), et de prédire les potentiels effets adverses aux échelles d'organisation biologiques plus élevées [456,460,461].

L'objectif de cette étude est donc d'identifier les protéines et les réseaux de protéines perturbés par une exposition à un cocktail de pesticides réaliste et/ou à une augmentation de la température afin de déterminer le mode d'action du cocktail de pesticides, la réponse générale aux stress individuels et combinés, ainsi que de potentiels signes d'hépatotoxicité des pesticides à des concentrations environnementales. Cette étude est présentée dans l'article 2.

Le design expérimental est présenté au Chapitre 2 – Partie 2 – Expérience 1 (p132). Brièvement, les poissons ont été acclimatés pendant 15 jours à 22 et 32°C respectivement, à raison d'un degré d'augmentation par jour. Ils ont ensuite été exposés individuellement et à jeun pendant 96h à un cocktail de pesticides composé de six herbicides (S-métolachlore, désethyl-atrazine, isoproturon, linuron, aclonifen et pendiméthaline) et d'un fongicide (tébuconazole) selon trois modalités (CONTROL : 0 $\mu\text{g.L}^{-1}$, LD : 8,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et HD : 42 $\mu\text{g.L}^{-1}$ en concentration totale). La réponse comportementale et physiologique des poissons a été étudiée et est présentée dans le chapitre précédent (article 1). La réponse moléculaire de ces poissons a ensuite été analysée sur des extraits de foie par protéomique-2D et intégrée dans une analyse réseau grâce au logiciel Ingenuity Pathway Analysis.

L'analyse en protéomique a permis d'identifier 40 protéines régulées dans le foie des carassins doré exposés aux cocktails de pesticides et/ou à l'augmentation de la température. Les profils de réponse

montrent un effet important de la concentration du mélange et de la température sur la réponse du protéome hépatique aux pesticides.

A 22°C, 23 protéines sont régulées en réponse aux mélanges de pesticides. Elles sont impliquées dans la réponse générale de stress, le métabolisme des acides aminés, lipides et carbohydrates, le cycle de la méthionine, le maintien de l'homéostasie, la structure, le fonctionnement, l'organisation et le cycle de vie cellulaire. L'analyse en protéomique montre deux profils de réponse très différents entre la faible dose (LD) et la forte dose (HD).

L'exposition à la faible dose de pesticides entraîne une réponse générale de stress impliquant (1) l'induction de systèmes de défense (i.e. protéines chaperonnes HSPs), (2) la modulation de voies participant au maintien de l'homéostasie, à la régulation du fonctionnement et du cycle de vie cellulaire et favorisant la régénération des organes (HSPs, régucalcine et cycle de la méthionine) [462–465], et (3) une stratégie métabolique de compensation [150]. L'induction de la synthèse de la HSP60 mitochondriale indique une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans les mitochondries [61]. La modification du métabolisme énergétique passe par la régulation de protéines impliquées dans la glycolyse, la gluconéogenèse, le catabolisme des acides aminés et la production de corps cétoniques. L'augmentation de la production de corps cétonique par le foie, ou cétose, indique une balance énergétique négative et l'épuisement des réserves hépatiques en carbohydrates [466–468]. Les lipides du corps sont alors mobilisés et convertis dans le foie en corps cétoniques puis excrétés dans le sang pour alimenter le cerveau en énergie. La transformation du foie en organe cétogène indique que l'exposition des poissons à une faible concentration de pesticides entraîne un coût énergétique important à l'échelle de l'organisme. La synthèse des protéines a un coût énergétique important, et l'induction des systèmes de défense peut expliquer au moins en partie l'augmentation de la demande énergétique [342].

L'exposition à la forte dose de pesticides inhibe l'expression de protéines impliquées dans la défense cellulaire (HSP70 et peroxyrédoxine 1), entraîne peu de modifications des voies métaboliques, induit l'expression de protéines du cytosquelette (actine, plusieurs tubulines et kératine 8) et régule le cycle de la méthionine dans un sens opposé à la faible dose. Ces réponses suggèrent une augmentation du stress cellulaire (i.e. stress oxydant), une perturbation de la structure et de l'organisation des cellules et la modification des processus de méthylation cellulaire. La perturbation des protéines du cytosquelette peut indiquer des dommages à l'échelle tissulaire [240,291]. Des analyses histopathologiques sur le foie sont actuellement en cours pour confirmer ces observations.

L'augmentation de la température entraîne une réponse importante au niveau moléculaire, avec la régulation de 32 protéines impliquées dans la réponse générale de stress, le cycle de la méthionine et du folate, le métabolisme des carbohydrates, des acides aminés et des lipides, la production de corps

cétoniques, la production d'énergie, la structure et l'organisation cellulaire, le cycle cellulaire et l'homéostasie. La modulation de protéines ou de voies participant à la défense contre le stress oxydant et la dénaturation des protéines et à la régulation du cycle cellulaire (HSPs, peroxyrédoxines, régucalcine et cycle de la méthionine) indique que l'augmentation de la température induit un stress cellulaire notamment par le biais de la surproduction de ROS. Le coût de l'induction des systèmes de défense ainsi que l'augmentation du métabolisme directement induite par l'augmentation de la température entraîne une forte augmentation de la demande énergétique compensée par l'utilisation des réserves énergétiques et la production de corps cétoniques par le foie. Ces réponses sont cohérentes avec les effets décrits de la température sur les poissons [54,75,150,336].

Les poissons exposés aux pesticides à 32°C ont une réponse du protéome hépatique très proche de la réponse à la température seule, indiquant que l'effet de la température prédomine nettement à l'échelle moléculaire. Toutefois certaines différences sont visibles, notamment dans les voies participant à la réponse de stress et à la régulation du cycle cellulaire. L'exposition aux pesticides entraîne notamment des modifications importantes dans la régulation de protéines antioxydantes (HSP60, peroxyrédoxines 1 et 6) et/ou impliquées dans la détoxification (glutathion-S-transférase), le contrôle de la mort cellulaire (HSP60, protéine 14-3-3 et 15-hydroxyprostaglandine déshydrogénase) et les processus de méthylation (cycle de la méthionine), avec un effet plus important à la forte concentration. La forte concentration en pesticides entraîne également une diminution de la concentration en actine, ce qui suggère une perturbation du cytosquelette [454,469]. Considérés ensemble, ces réponses suggèrent une augmentation du stress oxydant entraînant des perturbations de la structure, du fonctionnement et du cycle cellulaire. Par ailleurs, l'inhibition de l'expression de certaines protéines impliquées dans le métabolisme énergétique indique une diminution de la gluconéogenèse et de la cétogenèse aux deux concentrations de pesticides. Dans la mesure où ces voies sont essentielles au maintien de l'homéostasie énergétique en réponse à une augmentation de la demande énergétique, leur diminution peut indiquer le passage d'une stratégie de compensation métabolique à une stratégie de conservation de l'énergie [150,151].

L'objectif de cette étude était d'évaluer le mode d'action et le risque hépatotoxique d'un mélange d'herbicides et de fongicides à des concentrations environnementales. L'analyse en protéomique montre que le cocktail de pesticides induit un stress oxydant dans les cellules hépatiques qui cible notamment les mitochondries. A la plus forte concentration, il peut induire des perturbations importantes de la structure, du fonctionnement et du cycle cellulaire dont la direction et l'importance varient en fonction de la température de l'eau. Bien que cela doive être considéré avec précautions, un certain nombre de protéines régulées sous l'effet des pesticides sont des marqueurs de dommages

tissulaires [462,464,470,471] et de cancérogenèse [465,472–477]. Des analyses histopathologiques et des expositions à plus long termes sont nécessaires pour confirmer ces prédictions.

Cette étude montre également l'augmentation de la température sensibilise les poissons à la contamination de l'eau par les pesticides, et inversement. Les poissons répondent aux stress modérés (faible concentration en pesticide à 22°C et augmentation de la température) par l'induction de systèmes de défense et de voies de compensation métabolique du coût énergétique de ces systèmes. Cette compensation métabolique se traduit notamment par la transformation du foie en organe glucogène et cétogène qui permet à l'organisme de maintenir une certaine homéostasie énergétique. Ce phénomène de compensation métabolique disparaît lorsque les poissons sont exposés à la forte concentration en pesticide à 22°C ou à l'effet combiné des pesticides et de l'augmentation de la température. Le passage d'une stratégie de compensation métabolique à une stratégie de conservation lorsque le stress devient trop important permet aux organismes de survivre sans épuiser leur ressources énergétiques jusqu'à ce les conditions redeviennent adéquates [150,151]. Toutefois, des effets importants sur les performances, la fitness et finalement la survie des individus sont visibles si le stress perdure [150,151].

Cette étude suggère que la perturbation de la réponse générale de stress est susceptible de jouer un rôle important dans les effets croisés de la température et des mélanges de pesticides. Pour confirmer cette hypothèse, une analyse approfondie de la réponse générale de stress chez des poissons exposés aux pesticides et/ou à une augmentation de la température sur une plus longue durée est nécessaire, incluant l'étude du contrôle endocrinien de la réponse de stress (sécrétion de cortisol), des réponses dites secondaires (i.e. induction des systèmes de défense et réponse métabolique) et des conséquences à l'échelle individuelle.

ARTICLE 2

Article en préparation

Proteome stress response in *Carassius auratus* exposed to environmental pesticides mixtures and temperature rising

Allison Gandar^{a,b}, Pascal Laffaille^{a,b}, Caroline Molette^c, Nathalie Marty-Gasset^c, Séverine Jean^{a,b}

^a Université de Toulouse ; INPT, UPS ; EcoLab, ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France. ^b CNRS ; UMR 5245 EcoLab, 31062 Toulouse, France. ^c INRA ; UMR 1388 GenPhySE, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

.

Article en préparation

Proteome stress response in *Carassius auratus* exposed to environmental pesticides mixtures and temperature rising

Allison Gandar^{a,b}, Pascal Laffaille^{a,b}, Caroline Molette^c, Nathalie Marty-Gasset^c, Séverine Jean^{a,b}

^a Université de Toulouse ; INPT, UPS ; EcoLab, ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France. ^b CNRS ; UMR 5245 EcoLab, 31062 Toulouse, France. ^c INRA ; UMR 1388 GenPhySE, F-31326 Castanet-Tolosan, France.

ABSTRACT

The modes of action of most herbicides and fungicides found in rivers on non-target species – like fish – are little known. In addition, studies on the toxicity of complex mixtures of pesticides on fish are scarce. Moreover, temperature effects on herbicides and fungicides toxicity on fish have been seldom studied. The current study explored the effects of environmental contaminations by pesticides and temperature rising on the goldfish (*Carassius auratus*) using 2-D proteomic and proteome mapping. For that, fish were exposed for 96 hours to a mixture of pesticides (S-metolachlor, isoproturon, linuron, atrazine-desethyl, aclonifen, pendimethalin and tebuconazole) at two environmental relevant concentrations (total concentrations of 8.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 42 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and two temperatures (22 and 32°C). The molecular response was assessed in the liver by 2D-proteomics and data generated were integrated and analyzed in terms of biological pathways using Ingenuity Pathway Analysis software. The pesticide mixtures elicited pathways involved in cellular stress response, carbohydrate, protein and lipid metabolisms, methionine cycle, cellular functions, cell structure and death control, with dose and temperature-dependent profiles of response. Our study showed that combined temperature rising and pesticide exposure induced an increased oxidative stress in liver cell, deeply affected the cellular stress response, including antioxidant defenses and cell death control, decreased the metabolic response to individual stress factor and altered the cytoskeleton. Finally, our result suggests that temperature rising could sensitive fish to pesticide exposure, and *vice versa*.

Keywords: Herbicides; Climate Change; Proteomic; Biological pathways; Fish.

1. Introduction

The evaluation of the effects of complex mixtures of pollutants are one of the major current challenges of ecotoxicology (Eggen et al., 2004). Aquatic systems are the final receptacle of many pollutants, including pesticides. France is the first European country in terms of agricultural area (Alim'agri, 2012) and the fourth largest consumer of pesticides in the world (Sénat, 2012). Pesticides essentially contaminate surface waters through leaching of soils and rainwater runoff from agricultural land; with transient but important increased in pollution during heavy rainfall events (Boithias et al., 2011; Debenest et al., 2008; Polard et al., 2011). The 15 most frequently detected molecules in surface waters

are herbicides and fungicides, essentially used to control weeds production and pathogen invasion in field crops and viticulture (Butault et al., 2010). The risk assessment procedures for aquatic systems use acute or chronic toxicity tests performed for each molecule considered individually. Moreover, the vast majority of scientific studies on sublethal effects of herbicides concern a few flagship molecules at non-environmental concentrations, especially when studied organisms are aquatic vertebrates (e.g. fish or amphibians) (Solomon et al., 2013). The lack of knowledge of sublethal effects at realistic concentrations led to a global consensus that environmental concentrations of herbicides or fungicides have no effects on aquatic vertebrates, or at least unproven (Solomon et al., 2013; Van Der Kraak et al.,

2014). However, additive or synergetic effects between compounds in environmental pesticide mixtures may lead to a dangerous underestimation of their impacts on aquatic vertebrates (Coors and Frische, 2011; Hayes et al., 2006). A few studies on fish models showed that environmental mixtures of herbicides and/or fungicides may entrain genotoxicity (Polard et al., 2011), changes in gene expression (Evrard et al., 2010; Marchand et al., 2006), and decrease in resistance to pathogens (Fatima et al., 2007). In a previous work (Gandar et al., 2015), we found that a cocktail of herbicides and fungicides at environmental concentrations decreased the sediment reworking behavior of the goldfish (*Carassius auratus* L.), and affected both muscular and hepatic metabolic status. These results show that pesticide cocktails encountered by fish in their environment are likely to result in significant effects at the molecular, physiological and behavioral scales.

In addition, environmental factors such as temperature are likely to affect their toxicity on aquatic organisms. Temperature changes may result from both natural (i.e. seasonal fluctuations) and anthropogenic factors (i.e. thermal pollution or climate change). In ectotherms species, e.g. fish, temperature changes strongly affect the homeostasis and the physiological status of organisms (Pörtner and Knust, 2007; Pörtner et al., 2006), making them potentially more sensitive to pollutants (Sokolova and Lannig, 2008; Sokolova et al., 2012). An increase in toxicity with temperature is commonly observed for metals and pesticides, particularly when chemical exposure occurs at temperatures closed to the limits of the tolerance range (Heugens et al., 2001; Laskowski et al., 2010; Sokolova and Lannig, 2008). Despite the importance of the environmental temperature effect in pollutant toxicity on aquatic organisms, very few studies have focused on cross-effects between temperature and pesticides in fish. In Gandar et al. (2015), we showed that temperature increase interact on the goldfish behavioral and metabolic responses to a cocktail of herbicides and fungicides at environmental concentrations. These results suggested that temperature increase may potentiate the effect of pesticide cocktails on fish and, inversely, that exposure to a mixture of herbicides and fungicides at realistic concentrations may sensitize fish to thermal changes.

The use of protein expression as a biomarker of exposure to pollutants is not a recent field study in the area of ecotoxicology. For years, protein expression has been used to measure the exposure of organisms to pollutants or to assess their toxic properties. However, the specificity of these biomarkers to a class of pollutants and their reproducibility between experiments and/or organism models are now widely questioned (Benninghoff, 2007). Toxicoproteomics is a relatively new discipline that involves the application of proteomics techniques to ecotoxicological studies to explore without *a-priori* the proteins and physiological pathways impacted by chemicals (Benninghoff, 2007; Denslow et al., 2005; Wetmore and Merrick, 2004). Key link between the genotype and the phenotype of an organism, the study of the global proteome response also allows to observe cellular mechanisms of adaptation to a changing environment (Silvestre et al., 2012). So it helps to identify potential effect biomarkers and direct or indirect targets, to predict the effects of pollutants at higher scales of organization and to evaluate their mode-of-action. In fish, proteomics has been used to study the effects of pesticides (Biales et al., 2011; Chen and Huang, 2011; Laldinsangi et al., 2014; Sanchez et al., 2009), heavy metals (Dorts et al., 2011; Karlsen et al., 2011; Ling et al., 2009; Wang et al., 2013), perfluorooctane sulfonate (PFOS) (Roland et al., 2014), or brominated flame retardants (Kling and Förlin, 2009; Kling et al., 2008). This technique may also be used to study the effects of environmental factors (hypoxia: Douxfils et al., 2012; osmotic stress: Kumar et al., 2009) or multiple environmental stresses in fish (Wang et al., 2008).

According to our previous observations on behavior and metabolic status of the goldfish, we hypothesis that the exposure to individual and combined pesticide cocktail and temperature rising entrain metabolic and physiological perturbations at the molecular scale. So the aim of this study was to evaluate the proteome response of the goldfish exposed for 96 hours at two temperatures (22 and 32°C) to a mixture of herbicides and fungicides at environmental concentrations (S-metolachlor, desethyl-atrazine, isoproturon, linuron, aclonifen, pendimethalin and tebuconazol for total concentrations of 8.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and 42 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). For that, 2-D proteomic analysis was performed to identify the differential proteins in the liver of exposed fish, an essential organ for the detoxification of pollutants and systemic metabolic regulation.

Table 1. Composition and characteristics of the two mixtures of pesticides: LD and HD for total concentrations of 8.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 42 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectively. $\text{LC}_{50-96\text{h}}$: concentration which causes 50% mortality at 96h of exposure. CLP classification of chemical risk in aquatic system (CE 1272/2008): C1=very toxic; C2=toxic; ND=no data; NC= not concerned.

Chemicals	Family	Use	$\text{LC}_{50-96\text{h}}$ fish	CLP	Mixtures concentrations	
			(mg.L^{-1})	classification	($\mu\text{g.L}^{-1}$)	
			(min-max)	(acute/chronic)	LD	HD
S-Metolachlor	chloroacetanilide	herbicide	1.23 - 12	C1 / C1	2.4	12.0
Linuron	urea	herbicide	3.15 - 31.1	C1 / C1	2.0	10.0
Isoproturon	substituted urea	herbicide	18 - 54.41	C1 / C1	1.2	6.0
Tebuconazole	triazole	fungicide	4.4	NC / C2	1.2	6.0
Aclonifen	diphenyl ether	herbicide	0.67	C1 / C1	0.8	4.0
Atrazine-desethyl	triazine	herbicide	ND	ND	0.4	2.0
Pendimethalin	dinitroaniline	herbicide	0.138 - 0.418	C1 / C1	0.4	2.0
Total concentrations					8.4	42.0

Proteome profiles were then compared using a proteome mapping software, Ingenuity Pathway Analysis, to explore functional link between effect observed at the molecular and individual level and, eventually, to evaluate the hepatotoxic risk under the different conditions.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Pesticides were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): S-metolachlor (CAS-No: 87392-12-9, PESTANAL[®], analytical standard), Isoproturon (CAS-No: 34123-59-6, PESTANAL[®], analytical standard), Linuron (CAS-No: 330-55-2, PESTANAL[®], analytical standard), Atrazine-desethyl (CAS-No: 6190-65-4, PESTANAL[®], analytical standard), Aclonifen (CAS-No: 74070-46-5, PESTANAL[®], analytical standard), Pendimethalin (CAS-No: 40487-42-1, PROWL[®], analytical standard), Tebuconazol (CAS-No:107534-96-3, PESTANAL[®], analytical standard). Acetone (CAS: 67-64-1, Fisher Chemical, HPLC solvent) was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France).

2.2. Fish

The goldfish was introduced in France from Asia in the eighteenth century for aquariums and ornamental ponds. Today, this non-native species could be found into some of lentic water areas (e.g. ponds, backwaters of rivers, floodplain waterbody) (Keith et al., 2011). Moreover, its use in ecotoxicological tests is growing fast (Bretaud et al., 2000; Cavas and Konen, 2007; Zheng et al., 2013). Fish were purchased from the fish farming Carpio (Consac, France) in the size range 10-12cm. They

were first acclimatized for two weeks in opaque tanks under controlled conditions (18°C with a 12:12h light regime). Water was aerated and dechlorinated prior to fish introduction. Half of the water was renewed every day and fish were fed daily with commercial pellets. No mortality occurred during the acclimation period.

2.3. Pesticides mixtures

The mixtures were developed on the basis of the pesticide contamination of the Save River (France), assessed from March 2008 to November 2009 (Polard, 2011). The Save River watershed is mainly used for intensive agriculture (corn, wheat and sunflower) and the water presents a typical pesticide contamination of the rivers of the south-west of France (Polard et al., 2011). High contamination levels of surface waters and sediment by triazines (atrazine, DEA, cyanazine), ureas (isoproturon, linuron, chlorotoluron), and anilides (metolachlor, metazachlor) have been reported in the Gascogne area during spring flood (Boithias et al., 2011; Debenest et al., 2008; Devault et al., 2009; Polard et al., 2011). According to the analysis conducted by Polard (2011), we selected six herbicides and one fungicide using three criteria: the frequency of detection, the concentration, and the representation of the different families of molecules detected. Selected molecules are S-metolachlor, isoproturon, linuron, tebuconazol, aclonifen, atrazine-desethyl, and pendimethalin (cf. Table 1). Pesticide standards were diluted in acetone (0.3 mL.L^{-1} of water) and demineralized water to obtain two mixtures: Low Dose (LD) and High Dose (HD) for total concentrations of 8.4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 42 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectively. The proportions between the molecules, calculated from analysis conducted by Polard (2011), are preserved in the

two mixtures. The LD concentrations correspond to the level of contamination observed not only in the Save river after spring flood (Polard, 2011), but also in other French rivers (Debenest, 2007; Eau-Evolution, 2007; Garmouma et al., 1998; Taghavi et al., 2011). The HD is ten times more concentrate to reflect situations of highest levels of contamination measured in Europe and USA (Battaglin et al., 1998; Graymore et al., 2001; Kreuger, 1998). Finales concentrations of pesticides in water were quantified by HPLC-DAD for Aclonifen and HPLC-MS/MS for other pesticides. Analyzes were performed by the Laboratoire Départemental de l'Eau de la Haute-Garonne (county laboratory water, Saint Alban, France). At the end of the experience, observed concentrations were closed from expected concentrations, except for the HD at 32°C with a 19% and 64% decrease in S-Metolachlor and Pendimethalin concentrations respectively.

2.4. Experimental design

Fish were individually exposed during 96h to three treatments of pesticides (CONTROL, LD and HD) at two temperature (22 and 32°C, N=12 fish for each condition pesticides x temperature). CONTROL aquaria received only acetone. For that there were gradually acclimatized to experimental temperatures. The temperature was increased by 0.5°C every 12 hours until reaching the experimental temperature. Three days before the experiment, fishes were starved. They were then placed in 30L opaque aquaria in temperature controlled rooms. Prior to fish introduction, aquaria and all equipment were pre-saturated with the mixture of pesticides they will receive during one day. To limit the risk of anoxia, air pumps were placed in each aquarium to supply water in oxygen. Water and pesticides solutions were renewed in half every day to limit concentration variations. No mortality occurs during the thermal acclimation or pesticide exposures.

Temperature, pH, conductivity and oxygen concentration were assessed every day (cf. Figure 1). Temperature and oxygen concentration were stable over the time and between exposure conditions for each target temperature. Conductivity and pH were stable between conditions and times.

2.5. Protein extraction and concentration

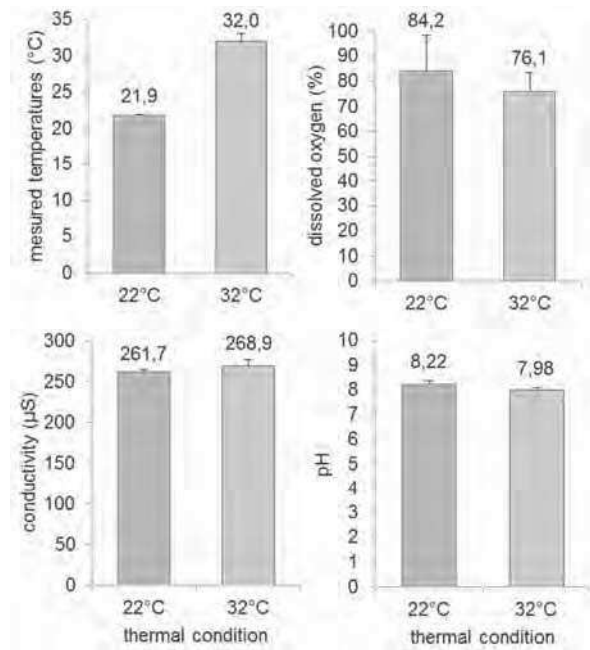


Figure 1. Physico-chemical parameters of the experiment.

After 96h of exposure, fish were euthanized by concussion and liver immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Samples of liver were homogenized in 4 vol (v/w) of 40mM Tris-HCl (pH8.8), 2mM EDTA and protease inhibitors (1µL/1mL of solution) at 4°C using a Fastprep® homogenizer. Homogenates were centrifuged at 10,000g for 10min at 4°C. A second cycle of homogenization and centrifugation was realized in the same conditions and supernatants were stored at -80°C. Protein concentrations were quantified using a microplate spectrophotometer (FLUOstar OMEGA, BMG LABTECH), according to the principle of protein-dye binding (Bradford 1976).

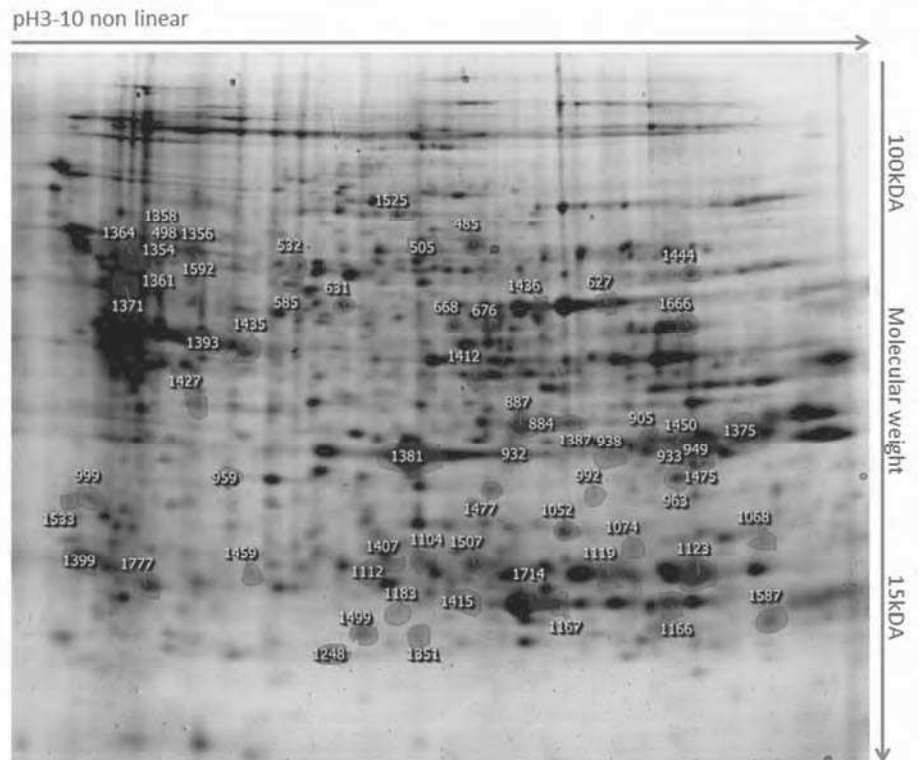
2.6. 2D-gel electrophoresis

Proteins were separated in the first dimension by isoelectrofocalisation. For that, 600µg of protein was loaded onto pH3-10 nonlinear, 17 cm ReadyStrip™ immobilized pH gradient (IPG) strips (Bio-Rad laboratories, Inc.). Proteins were then separated in the second dimension in denaturing conditions on SDS-PAGE 12% polyacrylamide gels.

Protein spots on gel were revealed by PageBlue™ Protein staining solution (ThermoScientific). The blue-staining gels were scanned and analyzed using Progenesis Samespots software (Nonlinear Dynamics Ltd, Nonlinear USA Inc.). Protein spots were detected and aligned between gels. For each gel, the volume of spots

Figure 2. Representative 2-D gel with regulated proteins according to pesticides and temperature exposure.

Goldfish were exposed for 96h to pesticide mixtures at three concentrations (CONTROL: 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, LD: 8.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and HD: 42 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) at 22°C or 32°C. 2D-proteomic analysis was realized on liver extracts. Proteins were separated on the first dimension along a pH3-10 non-linear gradient. Proteins were then separated in the second dimension according to their molecular weight in denaturing conditions on SDS-PAGE 12% polyacrylamide gels. Protein spots were aligned between gels using Progenesis Samespots software (Nonlinear Dynamics Ltd, Nonlinear USA Inc.). Differential spots were identified using ANOVA test ($p < 0.05$) followed by LSD post hoc test for inter-conditions comparisons.



was normalized relative to the total valid spot volume to avoid inter-gel variations. Comparisons between conditions were realized with ANOVA with Benjamini-Hochberg (B-H) procedure to control the false discovery rate. Spots expressed differently depending on the conditions were selected for identification. For each spot, comparisons between groups were realized using Fisher LSD post-hoc tests. Differences were considered as significant for a $p\text{-value} < 0.05$. Principal component analysis was performed using the normalized volume of the regulated proteins as variables to observe the separation within groups.

2.7. Protein identification by LC-MS/MS

Gels were washed with ddH₂O and protein spots were excised individually. Spots excised were destained in 100 μL of 25mM NH₄HCO₃-5% acetonitrile buffer during 30 minutes, and then in 100 μL of 25mM NH₄HCO₃-50% acetonitrile buffer 30 minutes twice. Spots were then dehydrated ten minutes in 200 μL of 100% acetonitrile. Acetonitrile was removed and samples were dried using a Speed Vac.

Proteins were hydrolyzed in peptides using 12 μL of a 25 mM NH₄HCO₃ -12.5 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ trypsin solution. After a night of incubation, peptides were extracted using sonication with 9.6 μL of 100% acetonitrile. Supernatants were

transferred in HPLC vials and dried using Speed Vac for 10 minutes. 8 μL of equilibration solution (H₂O/Formic acid - 100/0.5) was added before analysis.

8 μL of sample were injected in a nano HPLC Ultimate 3000 (Dionex) coupled *via* a nano electrospray source to an ION TRAP mass spectrometer (LTQ velos, ThermoScientific). Peptides were separated on a C18 column (15cm length and 75 μm diameter) using an acetonitrile gradient (80/20 CAN/H₂O, 0.5% Formic acid) from 4 to 90% in 29 minutes (total duration of 38 minutes). Peptides were ionized and analyzed in the mass spectrometer, using a scan range from 400 to 4000 Da. Each MS analysis was followed by five MS/MS analysis performed on the five most intense peaks of the MS analysis. MS and MS/MS spectra were analyzed using MASCOT software and the NCBI database with taxonomy restrictions: *Carassius sp.* (taxonomy ID: 7956), *Cyprinus carpio* (taxonomy ID: 7962) and *Danio rerio* (taxonomy ID: 7955). Identifications were considered as significant for a MASCOT score greater than or equal to 41 which indicate identity or extensive homology.

2.8. Proteome mapping

Proteome profiles were compared between conditions using QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis® (IPA®, QIAGEN Redwood City, www.qiagen.com/ingenuity),

using *Mus musculus* (mouse) annotations database. To get the mouse homologous protein names, we applied the NCBI tool BLASTp (version 2.2.30) using the protein sequence obtained as mentioned above and searching against the mouse protein database. The best blast hits from the mouse sequences (with an e-value threshold of $1e^{-5}$) were considered as mouse homologs of the fish proteins. The Ingenuity Pathway Analysis® software generated lists of canonical pathways and biological functions associates with regulated proteins, based on scientist literature. Statistical significances were calculating using right tailed Fisher's Exact Test, integrating the number of regulated molecules which contribute to the function in regard to the total number of molecules known to be associated with this function. A p-value of 0.05 was considered as a significance threshold.

3. Results

3.1. Separation and identification of differential proteins using 2D proteomic

2D proteomic analysis was performed to detect modifications in the protein abundance under different conditions of pesticides exposure and temperature. Each gel presented approximatively 900 spots (cf. Figure 2). 56 spots showed significant differences between conditions (ANOVA $p < 0.05$ and positive discoveries under B-H procedure) and were extracted for identification. Among those, 49 were successfully identified by MALDI-TOF MS/MS (Mascot Score greater than 41). 40 different proteins were identified, including 6 that are represented by several spots (2 to 3 spots) corresponding to post-translational modifications or different isoforms. Names, abbreviations, accession numbers and identification parameters of differential proteins are shown in Table 2.

3.2. Proteins regulated in response to pesticide exposure and temperature increase

PCA analyses were performed on the normalized values of the regulated proteins to observed separation between groups. PCA score plots were shown on the Figure 3. PCA score plot for the pesticide effects at 22°C (cf. Figure 3A) showed a good separation between control, LD and HD groups, indicating distinct profiles of response in fish exposed to the LD compared to the HD mixtures. Temperature effect entrained distinct proteome profiles in control groups (cf. Figure 3B). At the

opposite, pesticide exposure at 32°C had no clear effect on the proteome profile of goldfish (cf. Figure 3C).

For each spots, fold changes compared to CON/22 group and LSD post-hoc test results were shown on the Table 3.

At 22°C, 29 spots corresponding to 23 proteins showed differential regulation according to pesticides concentrations (ANOVA LSD post-hoc tests, $p < 0.05$, Table 3). 12 proteins showed significant changes in the LD/22 treated group compared to the CONTROL group. 5 proteins were down-regulated: GPDH (887), AHCY (668), HPDA (1052), OXCT1b (532) and RGN (1381). 7 were up-regulated: HSC70 (1068), MAT1a (1427), TPI1b (1166), HSP60 (1356 and 1358), GAPDH (933, 938 and 963), ALDOB (1112 and 1375) and UGP2a (1444). 14-3-3p (1399) tended to decreased but the difference was non-significant ($p = 0.072$).

11 proteins showed significant changes in the HD/22 treated group compared to the CON/22 group. 3 proteins were down-regulated: SORD (1477), HSC70 (1068) and ALDOB (1112). 8 were up-regulated: TUBa8I2 (1582), TUBa8I4 (498), TUBb2c (1364), UGP2a (1444), ACTb1 (1393), AHCY (676), PAH (631) and IFP (1361). HSP60 (1356 and 1358) tended to increased but difference was non-significant ($p = 0.125$ and 0.078 respectively). 4 proteins showed significant differences between LD/22°C and HD/22°C exposed groups while they showed no significant differences compared to the CONTROL group. QDPRa (1351), AST (1183) and NKEF (1499) were down-regulated in HD-treated group compared to LD. PMT (585) was up-regulated in HD-treated group compared to LD.

36 spots corresponding to 32 different proteins showed significant regulation in CONTROL fish at 32°C compared to 22°C (ANOVA LSD post-hoc tests, $p < 0.05$, Table 3). 17 proteins were down-regulated: HSP60 (1356, 1358), NKEF-B (1248), IFP (1361), TUBa6 (1354), TUBa8I4 (498), TUBa8I2 (1592), TUBb2c (1364), RGN (1381), ENO3 (627, 1436), F1,6BP (884), PYGL (1525), CPB1 (1435), PAH (631), GPDH (887), ATP5b (1371), OXCT1b (532) and FTCD (505). 15 proteins were up-regulated: HSC70 (1068), NKEF (1499), TPM3 (999), TPM4 (1533), ALDOB (1104, 1112), GAPDH (938, 949), TPI1b (1166), TKT (992), AHCY (1415), AST (1183), HPDA (1052), MAT1a (1427), QDPRa (1351), Zgc: 56585 (1407) and FDH (1074).

Table 2. Names, abbreviations, a accession numbers and identification parameters of the differential proteins according to pesticide and temperature exposure.

#spot	ID	Protein name	Species	NCBI accession no.	Coverage (%)	Peptides matches	Σ# PSMs	# AAs	Validation (%)	Mascot score
498	TUBa8/4	tubulin, alpha 8 like 4	<i>D. rerio</i>	NP_956479.1	37,11	11	36	450	70	1414.56
505	FTCD	formimidoyltransferase-cyclodeaminase	<i>D. rerio</i>	NP_957371.2	23,15	10	35	540	100	1031.89
532	OXCT1b	3-oxoacid CoA transferase 1b	<i>D. rerio</i>	NP_001070618.1	22,05	7	30	526	89	974.39
585	PMT	phosphoethanolamine methyltransferase	<i>D. rerio</i>	NP_001070105.1	16,16	7	14	489	56	565.22
627	ENO3	beta-enolase	<i>D. rerio</i>	NP_999888.1	33,03	9	28	433	100	976.32
631	PAH	phenylalanine hydroxylase	<i>D. rerio</i>	AAH56537.1	25,61	10	19	449	100	661.20
668	AHCY	adenosylhomocysteinase	<i>D. rerio</i>	NP_954688.1	46,42	15	79	433	100	1198.06
676	AHCY	adenosylhomocysteinase	<i>D. rerio</i>	NP_954688.1	46,42	15	79	433	100	1926.99
884	FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase	<i>C. gibelio</i>	ADD91325.1	32,64	7	20	337	100	850.03
887	GPDH	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1b	<i>D. rerio</i>	NP_956000.1	22,86	7	41	350	100	1177.18
932		non identified								
933	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	<i>C. auratus</i>	AFV60028.1	68,35	11	44	237	100	452.94
938	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	<i>C. auratus</i>	AFV60028.1	68,35	11	44	237	100	1355.70
949	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, partial	<i>C. auratus</i>	AFV60028.1	68,35	11	44	237	100	712.31
959		non identified								
992	TKT	Tkt protein	<i>D. rerio</i>	AAI65166.1	27,20	10	39	625	100	1105.44
999	TPM3	tropomyosin 3	<i>D. rerio</i>	AAH44420.1	25,00	7	16	248	100	453.04
1052	HPDA	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	<i>D. rerio</i>	NP_957461.1	6,20	2	3	387	100	113.78
1068	HSC70	heat shock cognate 71 kDa protein	<i>D. rerio</i>	NP_001103873.1	16,49	8	18	649	100	624.55
1074	FDH	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	<i>D. rerio</i>	ACG75896.1	8,31	7	24	903	100	702.36
1104	ALDOB	fructose-bisphosphate aldolase B	<i>D. rerio</i>	NP_919348.3	17,79	2	30	208	100	365.36
1112	ALDOB	fructose-bisphosphate aldolase B	<i>D. rerio</i>	NP_919348.3	17,79	2	30	208	100	152.20
1123	GSTp	rho-class glutathione S-transferase	<i>C. auratus</i>	AGO58895.1	48,41	4	31	126	100	827.10
1166	TPI1b	triosephosphate isomerase 1b	<i>D. rerio</i>	NP_705954.2	48,39	11	86	248	100	1038.02
1167	TPI1b	triosephosphate isomerase 1b	<i>D. rerio</i>	NP_705954.2	48,39	11	86	248	79	1623.05
1183	AST	aspartate transaminase, cytoplasmic	<i>D. rerio</i>	NP_998222.1	26,70	4	9	410	67	247.32
1248	NKEF-B	NKEF-B	<i>C. carpio</i>	ACJ04423.1	27,41	5	14	197	100	389.94
1351	QDPRa	Qdpra protein	<i>D. rerio</i>	AAI15317.1	6,33	2	3	237	53	67.81
1354	TUBa6	tubulin alpha 6	<i>D. rerio</i>	AAQ94598.1	34,00	10	26	450	51	1034.81
1356	HSP60	HSP60	<i>C. auratus</i>	ABI26641.1	37,91	15	57	575	100	917.30

While the PCA score plot showed superposed groups at 32°C (cf. Figure 3C), pesticide exposures at 32°C led to differential regulation in some proteins compared to control groups (ANOVA LSD post-hoc tests, $p < 0.05$, Table 3). Concerning stress response proteins, HSP60 (1356) was up-regulated in LD/32 group compared to CON/32 group, while HSP60 (1358) was up-regulated in both LD/32 and HD/32 groups. GSTp (1123) increased significantly in HD/32 group compared to CON/32 group, and in LD/32 and HD/32 groups compared to all 22°C groups. PRDX6 (1714) was down-regulated in HD/32 group compared to all 22°C groups, while non-significant decrease was observed compared to CON/32 group ($p = 0.07$). Cell structure protein ACT1 (1393) was down-regulated in HD/32 compared to CON/32 group. The 14-3-3 protein (1399) was up-regulated in both LD and HD/32 groups compared to CON/32. Inversely, the zgc:56585 (1407) was down-regulated in both LD and HD groups compared to CON/32. Concerning the proteins involved in the carbohydrate metabolism, F1,6BP (884) and TPI1b (1167) were respectively up and down-regulated in HD/32 group compared to CON/32. SORD (1477) was down-regulated in both LD/32 and HD/32 groups compared to control group at 22°C. In amino-acid metabolism, AHCY (1415) and PAH (631) were down-regulated in LD/32 and HD/32 groups respectively compared to CON/32 group. OXCT1b protein, involved in the ketone body metabolism, was up-regulated in HD/32 compared to CON/32 group.

3.3. Proteome mapping

Mouse homologous proteins were researched in the *Mus musculus* database using the NCBI tool HomoloGene. Blast results (i.e. query scores, E-values and identities) are presented in the Additional File: Table 1. Homologies were validated for all the proteins concerned (e-value under the threshold of $1e^{-5}$) with the exception of the TPM4 and the PMT proteins. For TPM4, a human homologous gene was found with an e-value under the threshold of $1e^{-5}$ and an identity of 85%. Human gene ID was used in biological pathways analysis. The PMT (so called PEAMT) is an enzyme which belongs to the methyltransferase group implied in the phospholipid biosynthesis. Homologue Pmt genes exist in plants,

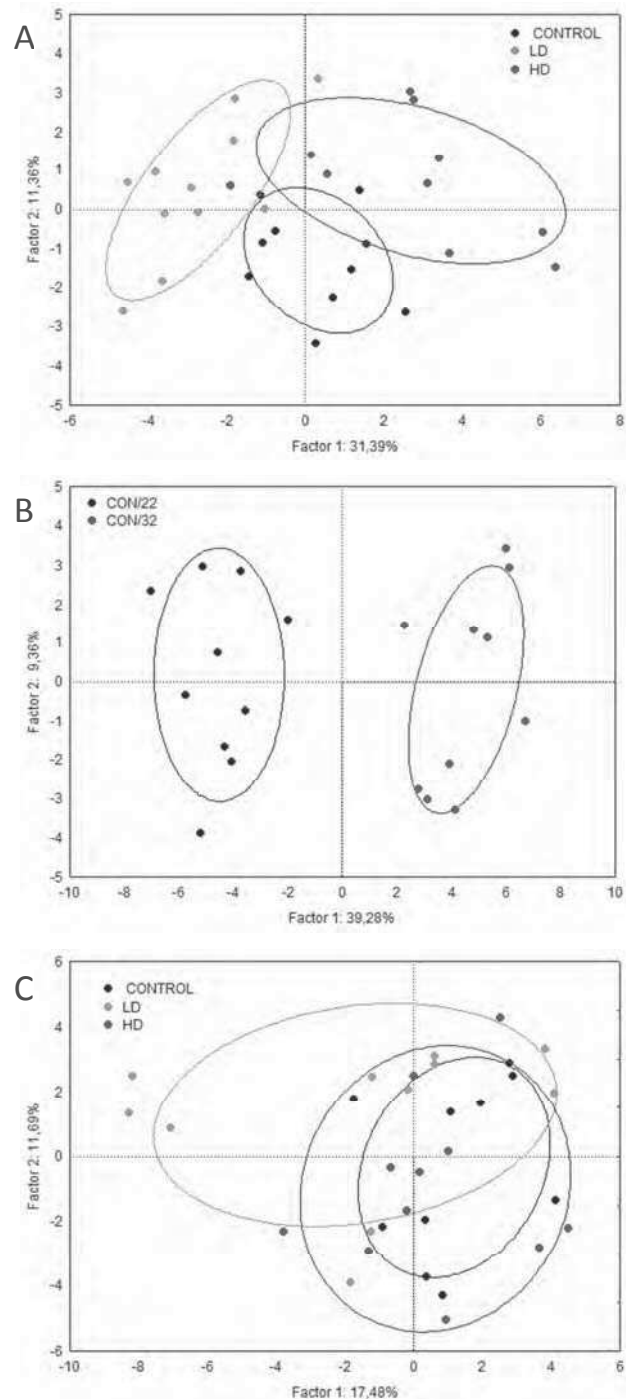


Figure 3. PCA score plots for 2D-proteomic analysis in liver extract of goldfish exposed to pesticide mixtures and temperature rising.

Fish were exposed for 96h to pesticide mixtures at three concentrations (CONTROL: $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, LD: $8.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and HD: $42 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) at 22°C or 32°C. Differential proteins were identified in the liver of fish using 2-D proteomic. Principal component analyses were performed to observe separation between groups: (A) pesticide effects at 22°C; (B) temperature effects in control groups; (C) pesticide effects at 32°C. Points represent the fish. Ellipses represent the confidence interval (95%) for each group.

Table 3. Fold-changes of differential proteins identified by 2-D proteomic on liver extract of goldfish exposed to pesticide mixtures and/or temperature rising

#spot	ID	protein name	Fold change compared to CON/22					ANOVA sign
			LD/22	HD/22	CON/32	LD/32	HD/32	
Stress response								
1123	GSTp	rho-class glutathione S-transferase	1,02a	1,01a	1,15ab	1,27bc	1,46c	*
1068	HSC70	heat shock protein 8	1,72a	-1,47b	1,35a	1,54a	1,40a	***
1356	HSP60	heat shock 60 protein 1	1,33a	1,23a	-1,66c	-1,31b	-1,55bc	**
1358	HSP60	heat shock 60 protein 1	1,50a	1,24a	-1,60c	-1,01ab	-1,16b	**
1499	NKEF	natural killer enhancing factor	1,19b	-1,14a	1,66c	1,38ab	1,38ab	*
1248	NKEF-B	NKEF-B	1,08a	1,05a	-1,49b	-1,33b	-1,14ab	**
1714	PRDX6	peroxiredoxin 6	-1,13a	1,12a	-1,47ab	-1,19ab	-1,98b	**
Cell structure								
1393	ACT1	actin, beta 1	1,14ab	1,47a	-1,08b	1,08b	-1,50c	***
1361	IFP	intermediate filanent protein	-1,03b	1,37a	-3,06c	-2,72c	-2,87c	***
999	TPM3	tropomyosin 3 [Danio rerio	-1,02a	-1,07a	1,42b	1,52b	1,42b	**
1533	TPM4	tropomyosin 4a [Danio rerio	1,32ab	1,12a	1,71b	1,78b	1,81b	**
1354	TUBa6	tubulin, alpha 6	-1,10b	1,24a	-2,01c	-1,70c	-2,34c	***
1592	TUBa8l2	tubulin, alpha 8 like 2	1,25b	1,97a	-2,49c	-1,75c	-1,99c	***
498	TUBa8l4	tubulin, alpha 8 like 4	1,00b	1,57a	-2,35c	-1,67c	-2,27c	***
1364	TUBb2c	tubulin, beta 4B class Ivb	1,01b	1,35a	-2,53c	-2,18c	-2,34c	***
Cell cycle								
1399	14-3-3p	14-3-3 protein	-1,32a	-1,14a	1,05a	1,32b	1,29b	*
1381	RGN	regucalcin	-1,18b	1,07a	-1,49b	-1,51b	-1,42b	**
Carbohydrate metabolism								
1104	ALDOB	aldolase b, fructose-bisphosphate	1,22ab	-1,22a	1,32b	1,11ab	1,33b	**
1112	ALDOB	aldolase b, fructose-bisphosphate	1,33b	-1,24a	1,55b	1,66b	1,55b	***
1375	ALDOB	aldolase b, fructose-bisphosphate	1,20a	-1,00b	-1,25bc	-1,46c	-1,46c	*
627	ENO3	enolase 3, (beta, muscle)	-1,34a	-1,14a	-2,39b	-1,83b	-2,17b	***
1436	ENO3	enolase 3, (beta, muscle)	-1,07a	-1,00a	-1,41b	-1,28b	-1,25b	*
884	F1,6BP	fructose-1,6-bisphosphatase 1a	-1,24a	-1,05a	-1,75b	-1,76b	-1,32a	**
933	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,48a	1,01b	-1,10b	-1,03b	-1,03b	*
938	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,34a	1,36a	1,64a	1,40a	1,81a	**
949	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,38a	-1,09b	1,64a	1,11ab	1,54a	***
1412	PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2	1,05a	-1,12a	-1,10a	-1,37b	1,08a	**
1525	PYGL	phosphorylase, glycogen, liver	-1,37a	-1,12a	-2,63b	-2,19b	-1,71ab	**
1477	SORD	sorbitol dehydrogenase	1,11a	-1,20b	-1,07ab	-1,72b	-1,28b	***
1166	TPI1b	triosephosphate isomerase 1b	1,34a	1,18a	1,26a	1,27a	1,34a	*
1167	TPI1b	triosephosphate isomerase 1b	-1,20a	1,00a	-1,39a	-1,44ab	-1,83b	**
992	TKT	transketolase b	1,22ab	1,12a	1,94b	1,87b	2,52b	***
1444	UGP2a	UDP-glucose pyrophosphorylase 2a	1,26a	1,43a	-1,18b	1,01b	-1,18b	*
Amino-acid metabolism								
668	AHcy	adenosylhomocysteinase	-1,73a	1,30b	-1,10a	-1,17a	-1,02ab	**
676	AHcy	adenosylhomocysteinase	-1,00b	1,34a	-1,32b	-1,14b	-1,61b	**
1415	AHcy	adenosylhomocysteinase	-1,01a	-1,02a	2,94c	1,69b	1,90bc	***
1183	AST	aspartate transaminase	1,11b	-1,26a	2,13c	2,03c	2,28c	**
1435	CPB1	carboxypeptidase B1 (tissue)	-1,27ab	-1,07a	-1,72b	-1,54b	-1,69b	**
1052	HPDA	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase a	-1,52c	-1,02b	1,53a	1,26ab	1,22ab	**
1427	MAT1	methionine adenosyltransferase I, alpha	1,43b	-1,03a	1,42b	1,20a	1,76b	***
631	PAH	phenylalanine hydroxylase	1,02b	1,51a	-1,82c	-1,47c	-2,28d	**
585	PMT	phosphoethanolamine methyltransferase	-1,32b	1,35a	-1,12b	-1,00ab	-1,10b	**
1351	QDPRa	quinoid dihydropteridine reductase a	1,20b	-1,26a	1,81b	1,52b	1,61b	***
Lipid metabolism								
887	GPDH	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1b	-1,97b	1,05a	-2,29b	-2,37b	-2,24b	***
1407	zgc:56585	zgc:56585	-1,31a	-1,16a	1,80c	1,30b	1,04ab	**
Energy production								
1371	ATP5b	ATP synthase mitochondrial beta	-1,01a	1,17a	-1,85b	-1,94b	-1,82b	**
Ketone body metabolism								
532	OXCT1b	3-oxoacid CoA transferase 1b	-1,55b	-1,14a	-1,55b	-1,20ab	-1,12a	**
One carbon pool by folate								
1074	FDH	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	1,02a	-1,11a	1,83b	1,60b	1,90b	***
505	FTCD	formimidoyltransferase cyclodeaminase	-1,22a	-1,24a	-1,48b	-1,23ab	-1,36ab	*

Pesticide mixture concentrations: CON = control; LD = low dose (8.4 µg/L); HD = high dose (42 µg/L). Temperature conditions: 22 = 22°C; 32 = 32°C.

Asterisks: ANOVA tests with *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001

Black values: fold change compared to the control condition at 22°C (CON/22)

Blue values: significant change compared to the control condition at 22°C (CON/22) with p<0.05 (LSD post hoc tests).

Letters: homogeneous groups (LSD post hoc tests with a threshold of 0.05)

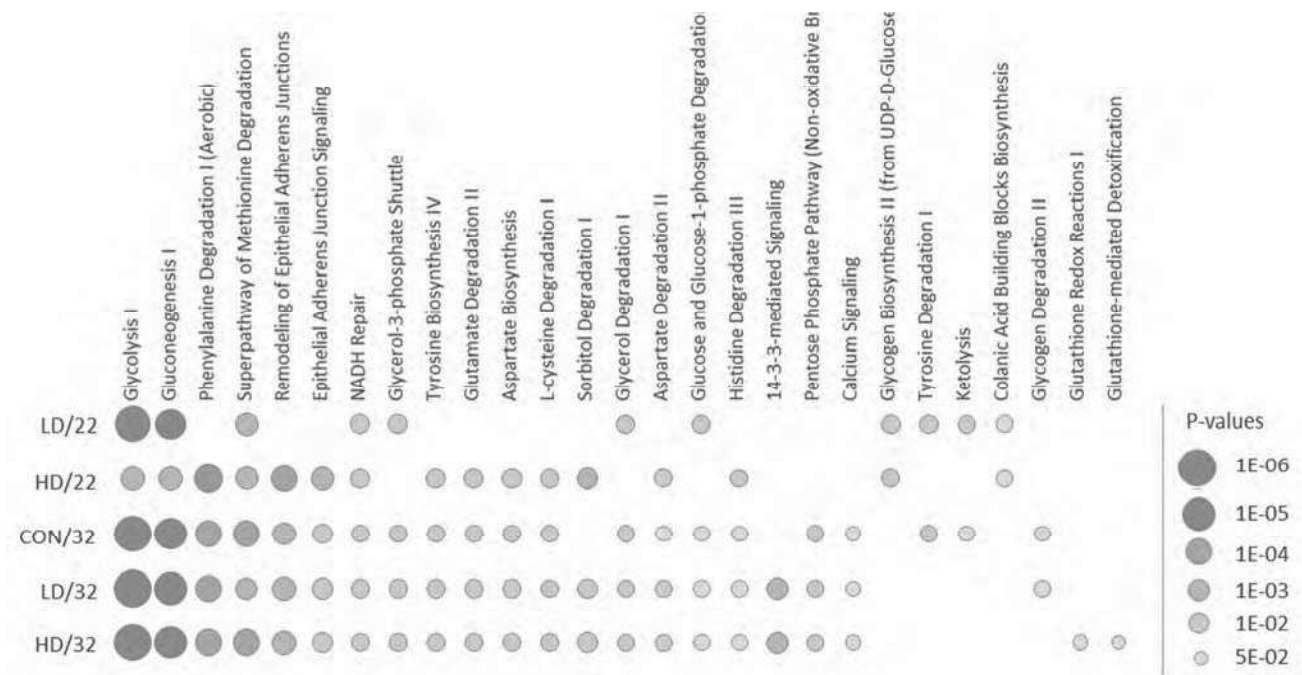


Figure 4. Canonical pathways implied in the liver proteome response of *Carassius auratus* to pesticide exposure and temperature rising.

Fish were exposed for 96h to pesticide mixtures at three concentrations (CONTROL: $0 \mu\text{g.L}^{-1}$, LD: $8.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ and HD: $42 \mu\text{g.L}^{-1}$) at 22°C or 32°C . Differential proteins were identified in the liver of fish using 2-D proteomic. Canonical pathway analysis was performed with QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis® software, using *Mus musculus* homologous gene names of proteins significantly regulated between the different conditions. Statistical significances of pathways were calculating using right tailed Fisher's Exact Test, integrating the number of regulated molecules which contribute to the pathway in regard to the total number of molecules known to be associated with it. A p-value of 0.05 was considered as a significance threshold. The smaller the p-value was, the more likely the canonical pathway was involved. The size of the circles is inversely proportional to the p-values.

nematodes and some vertebrates like frogs and fish, but not in mammals (Lykidis, 2007). However, a protein having a similar role in rodents was used instead: the PEMT (Lykidis, 2007). The mouse homologous names and the fold change compared to CON/22 of differential proteins were used for each group as entry lists in the Ingenuity Pathway Analysis software. IPA software realized proteome mapping to compare the biological pathways involved in the responses to pesticides and/or thermal exposure.

The Canonical Pathways involved in the response to pesticide and thermal exposures were presented in the Figure 4. The circle sizes are inversely proportional to the p-value (right tailed Fisher's Exact Test), insofar as the smaller the p-value was, the more likely the pathway was involved. Among the most prominent pathways involved in all conditions, we can note the presence of Glycolysis, Gluconeogenesis and the Superpathway of Methionine degradation. At 22°C , pathways specifically involved in the LD exposure are Glycerol-3-phosphate shuttle, Glycerol degradation, Glucose and Glucose-1-phosphate Degradation, Ketolysis and Tyrosine degradation. In

HD/22 group, specific pathways include Phenylalanine degradation, Remodelling of Epithelial Adherens Junctions and Epithelial Adherens Junction Signalling, Aspartate biosynthesis and Degradation, L-Cysteine Degradation, Sorbitol Degradation, Histidine Degradation. Glycogen Biosynthesis was specifically involved in both LD and HD/22 groups. In additions to these pathways, the proteome response to temperature rising implied proteins involved in the Pentose Phosphate Pathway, Calcium Signaling and Glycogen Degradation. The 14-3-3-mediated Signaling Pathway was specifically involved in the response to pesticides exposure at 32°C (LD and HD/32 groups), while Glutathione Redox Reactions and Glutathione-mediated Detoxification pathways were only implied in the HD/32 group response.

380 diseases and biological functions associated with regulated proteins were identified. Significant pathway terms were mapping for LD and HD exposure at 22°C (cf. Figure 5A and B respectively). Biological pathways are represented by circles with sizes inversely proportional to the p-value (right tailed Fisher's Exact Test). The

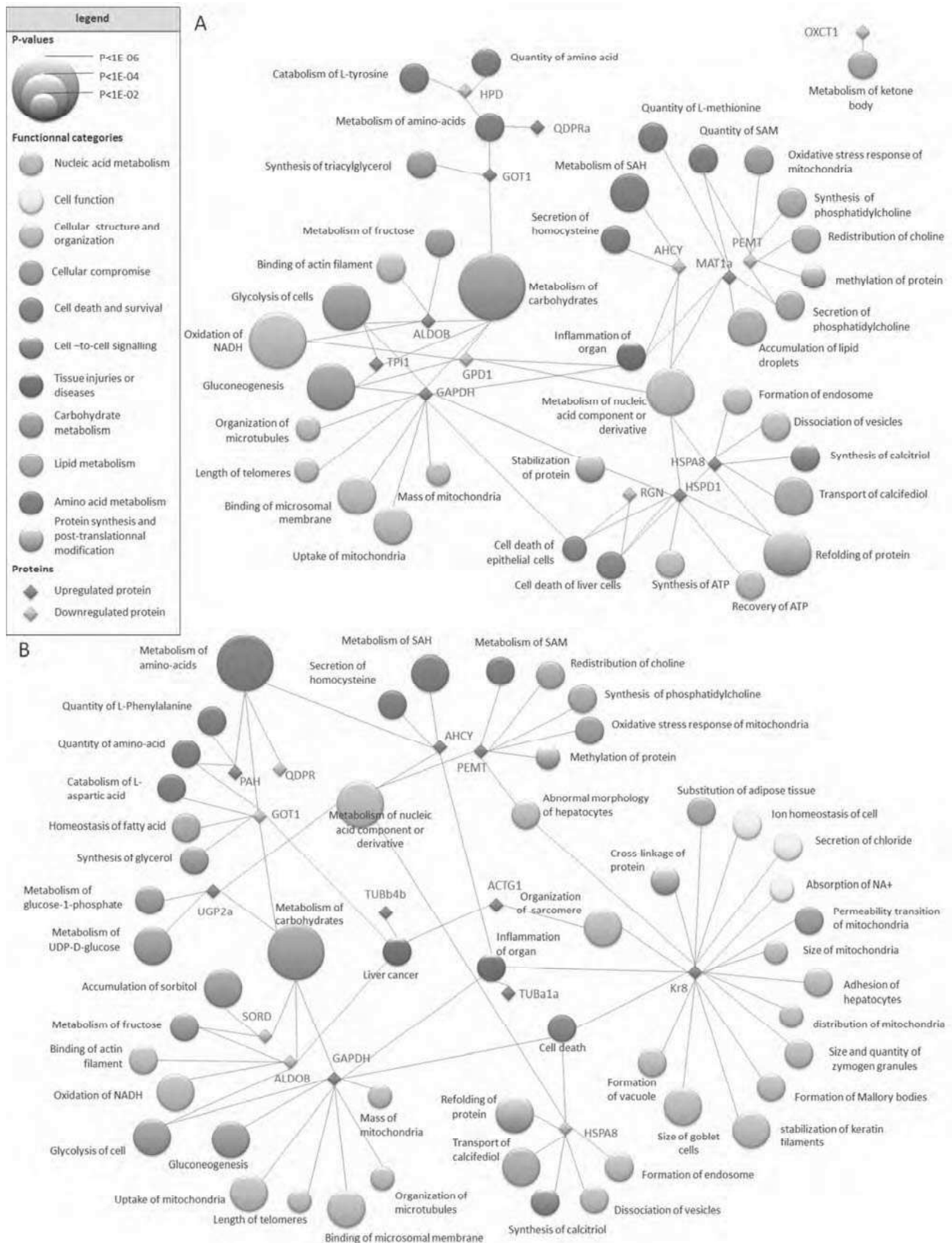


Figure 5. Diseases and biological functions involved in the liver response of goldfish exposed to (A) low dose (LD) and (B) high dose (HD) of pesticide mixture at 22°C.

Fish were exposed for 96h to pesticide mixtures at three concentrations (CONTROL: 0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, LD: 8.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and HD: 42 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) at 22°C. Differential proteins were identified in the liver of fish using 2-D proteomic. Disease and biological function analysis was performed with QIAGEN's Ingenuity Pathway Analysis® software. Statistical significances of pathways were calculating using right tailed Fisher's Exact Test, integrating the number of regulated molecules which contribute to the pathway in regard to the total number of molecules known to be associated with it. A p-value of 0.05 was considered as a significance threshold. ACTG1: actin, AHCY: adenosylhomocysteinase, ALDOB: fructose-bisphosphate aldolase B, GOT1: aspartate aminotransferase, CPB1: carboxypeptidase B1, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GPD1: glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1, HSPA8: heat shock protein 70 cognate, HSPD1: mitochondrial 60 kDa heat shock protein, KR8: keratin 8/intermediate filament protein, MAT1a: S-adenosylmethionine synthase 1, OXCT1b: 3-oxoacid CoA transferase 1, PAH: phenylalanine-4-hydroxylase, PEMT: phosphatidylethanolamine N-methyltransferase, QDPR : quinoid dihydropteridine reductase, RGN: regulacin, TPI1: triosephosphate isomerase 1, TUB: tubulin isoforms.

biological pathways were also classified in different functional categories (see colors in the legend). The diamonds represent up and down-regulated proteins involved in the biological pathways (in red and green respectively). Briefly, LD/22 exposure led to changes in nucleic acid, carbohydrate, lipid and amino-acid metabolisms, cellular structure and organization, cell death and survival, cell-to-cell signaling, protein synthesis and post-translational modifications and inflammation (cf. Figure 5A). In addition to these pathways, HD/22 exposure induced modifications in cell function and was associated with cellular compromises and liver cancer.

4. Discussion

The aim of these study was to explore the proteome response of goldfish exposed to a complex mixture of herbicides and fungicide at environmental concentrations (low dose and high dose for total concentrations of 8.4 and 42 $\mu\text{g.L}^{-1}$ respectively) at two temperature (22 and 32°C). 2D-Proteomic analysis allowed the identification of 41 proteins involved in liver response to pesticides exposure and/or thermal stress. Regulated proteins are involved in cellular response to stress, free radical scavenging, drug metabolism, energy production, carbohydrate, lipid and amino acid metabolism, nucleic acid metabolism and cell cycle, function, maintenance, assembly and organization. Biological and molecular functions of these different proteins were discussed and the proteome profile of response to each experimental condition was discussed in term of physiological significance, biomarker identification and potential adverse outcomes.

4.1. Proteome response to pesticide exposure at 22°C

This study showed that both pesticide mixture concentrations elicited a proteome response in the liver of goldfish exposed for 96h at 22°C. We found alterations in 23 proteins abundance involved in cellular response to stress, energy production including carbohydrates, lipid metabolism and amino acid metabolisms, cell death and survival, cellular compromise and cell structure and organization. However, the proteome response was largely different between the low dose (LD) and the high dose (HD) exposure. Of the 23 proteins found to be differentially regulated by pesticide exposure, 9 were unique to the LD and 7 to the HD concentrations.

Oxidative stress and cellular stress response

In this study, we found that pesticide mixtures at environmental concentrations elicited proteins related to oxidative stress and cellular stress responses.

The proteomic analysis showed that LD exposure upregulated both HSC70 and HSP60 compared to control fish. A similar increase in HSP70 and HSP60 levels was found in the kidney of common carp (*Cyprinus carpio*) exposed to atrazine (Xing et al., 2015). HSC70 and HSP60 belong to the Heat Shock Proteins (HSPs) family. They are induced when protein denaturation occurs in the cell. Classically, they protect new folding protein, repair damaged proteins, degrade the too damaged proteins and regulate the cytosol potential redox (Basu et al., 2002). The Heat Shock Cognate 70 (HSC70) is the constitutive form of 70kda HSPs which intervene in the cellular response to heat stress but also to a wide range of stress factor as chemical exposure (Basu et al., 2002; Cui et al., 2014). Less abundant, HSP60 is primarily found in mitochondria and intervenes in response to reactive oxygen species (ROS) production (Cui et al., 2014). HSP60 maintains mitochondrial functions and integrity, plays a role in regulation of cellular apoptotic and inflammatory processes and increases tissue regeneration capacity (Polla et al., 1996). Increased HSP60 and HSC70 levels in the LD-exposed fish revealed an overproduction of ROS in the hepatic cells of fish, which primarily targeted mitochondria. ROS and free radicals are produced naturally, in particular in the mitochondrial matrix, in results of cellular respiration. The dysregulation of the ROS generation and antioxidant defenses equilibrium may entrain ROS over-accumulation in the cell. High cellular level of ROS leads to protein denaturation, phospholipid peroxidation and DNA alterations, which could result at higher level by organ alterations, tissue injuries and degenerative diseases (Lushchak, 2011a; Maksymiv et al., 2015; Sakuragui et al., 2013). Pesticides are pro-oxidant pollutants as they can induce ROS production by different ways, among them the impairment of membrane-bound electron transport, redox cycling, inactivation of antioxidant enzymes and depletion of ROS scavengers (Slaninová et al., 2009). The potential of herbicides and fungicides to induce ROS overproduction in fish was shown in several study (Jin et al., 2010; Stara et al., 2012; Toni et al., 2011). However, studies on oxidative stress induced by herbicides or fungicides at environmental relevant concentrations are

scarce. Increased HSPs indicated that the LD pesticide mixture induced cellular ROS production, in particular in mitochondria, and elicited cellular stress defense induction which protects cellular components from oxidative damages.

At the opposite, the HD concentration of pesticides induced a significant decrease in HSC70 and a non-significant increase in HSP60 abundances (LSD post-hoc test: $p=0.077$). In addition, we found a significant decrease in the natural killer cell enhancing factor (NKEF) in the HD-exposed fish compared to the LD exposure. The NKEF, so called PRDX1, belong to the peroxiredoxin (PRDX) family (Loo et al., 2012). PRDXs are a highly conserved family of antioxidant proteins which classically act by scavenging ROS (Lushchak, 2011b; Pérez-Sánchez et al., 2011). While the PRDX expression and functions are largely uninvestigated in fish, their antioxidant capacities were confirmed in the turbot (*Scophthalmus maximus*) and the rock bream (*Oplegnathus fasciatus*) exposed to bacterial challenges (De Zoysa et al., 2012; Zheng et al., 2010). The transcriptional induction of *prdx* genes was shown in the European flounder (*Platichthys flesus*) exposed to cadmium (Shedden et al., 2006). PRDXs upregulation was also found in the zebrafish exposed to brominated flame retardants (Kling et al., 2008). At the opposite, a decreased abundance of the PRDX proteins could also indicate an oxidative stress. In fact, high concentrations of ROS can lead to oxidation of PRDXs and consequent activation of cell cycle arrest (So et al., 2008). Moreover, Loo et al. (2012) and Pérez-Sánchez et al. (Pérez-Sánchez et al., 2011) showed down-regulation of *prdx* genes in fish response to oxidative stress induced by parasitic infection. The decreased in PRDX1/NKEF abundance could increase the ROS-induced cytotoxicity (Loo et al., 2012). The downregulation of both HSPs and PRDX1 in the liver of fish exposed to the HD mixture could lead to oxidative damages and decreased regeneration capacities.

Another protein involved in the cellular stress response is the regucalcin (RGN) which intervenes in cellular calcium ion homeostasis, calcium-mediated signaling pathway and cell cycle (Fujisawa et al., 2011). In zebrafish (*Danio rerio*), *Rgn* gene expression was found to decrease after acute liver injury and hepatotectomy. Insofar as RGN inhibits the cell proliferation, its down-regulation emphasizes tissue regeneration (Fujisawa et al., 2011; Yamaguchi, 2000). The down-regulation of RGN in LD but

not in HD group indicated an increased regeneration capacity in the liver of fish exposed to the low dose of pesticide compared to the highest concentration.

The evidence of oxidative stress induced by the pesticide mixtures was supported by the regulation of several proteins involved in the “Superpathway of Methionine Degradation”, including MAT1a, PMT and AHCY proteins. This pathway occurs principally in the liver and participates to fundamental cellular process as cellular methylation, oxidative stress response and folate cycle (Martinov et al., 2010). MAT1a (methionine adenosyltransferase I alpha) is the key protein of this pathway which activates methionine in S-AdenosylMethionine (SAM), a major methyl donor. SAM is then transformed in S-adenosylhomocysteine (SAH) by methyltransferases. AHCY (adenosylhomocysteinase) catalyzes the reversible hydrolysis of SAH to adenosine and homocysteine which is in turn remethylated in methionine. SAM dependent methylation intervenes in the synthesis of DNA and RNA, amino acids and phospholipids (Martinov et al., 2010). In rodents, the SAM contributes to mitochondrial function, enhances liver regeneration and antioxidant capacity and decreases the hepatocarcinoma risk (for reviews of the role of methionine cycle in liver cancer and regeneration see among others Chen et al. (2004) and Frau et al. (2013)). Induction of *mat1a* gene expression was previously reported in European flounder *Platichthys flesus* exposed to a complex herbicides mixture composed of glyphosate, AMPA, mecoprop, acetochlor and 2,4D (Evrard et al., 2010). Marchand et al (2006) found another gene involved in the methionine pathway, the BHMT, in *P. flesus* exposed to cocktail of atrazine, diuron, and isoproturon. In our study, increased MAT1a and decreased AHCY level in the liver of fish exposed to the pesticide LD could indicate SAM accumulation in the cellular space and subsequent increases in protection against oxidative stress and liver regeneration capacity.

At the opposite, we found that HD exposure increased both PMT and AHCY levels. Increased PMT and AHCY levels could lead to methionine and SAM depletions and homocysteine accumulation in the cellular space and finally in plasma (Martinov et al., 2010; Vance, 2013). In mammals, increased homocysteine level in plasma is associated with vascular diseases (Vance, 2013). In addition, abnormal homocysteine accumulation in cell can entrain detrimental effect on tissues and organ

failures (Schalinske and Smazal, 2012; Veeranki and Tyagi, 2013). In another hand, homocysteine is involved in glutathione (GSH) biosynthesis. GSH is a non-enzymatic antioxidant defense which prevents damages oxidative damages by scavenging free radicals and ROS (Regoli and Giuliani, 2014). In addition, the PMT (phosphoethanolamine methyltransferase) catalyzes the methylation steps in the biosynthesis of phosphocholine, a precursor of phosphatidylcholine (Lykidis, 2007). The greater need for phosphocholine could result of the peroxidation of the membrane lipids by ROS and the consequent necessity for cell to rebuilding phospholipids (Li et al., 2014; Xu et al., 2015). Lipid peroxidation was shown in the liver of fish exposed to herbicides or fungicides (Jin et al., 2010; Stara et al., 2012; Toni et al., 2011). While the regulation of the methionine cycle in response to oxidative stress is complex and rest misunderstood for a part (Martinov et al., 2010), these responses could indicate cellular component oxidative damages and hepatic function alterations in HD-exposed fish.

Metabolic responses

We found several proteins involved in carbohydrate, amino-acid and lipid metabolisms regulated in response to pesticide exposure, with different profiles of response between the LD and the HD concentrations.

The LD exposure induced up-regulation in several proteins involved in glycolysis and gluconeogenesis pathway, including the fructose-bisphosphate aldolase (ALDOB), the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and the triosephosphate isomerase 1b (TPI1b). Similar carbohydrate metabolism perturbations was shown in fish exposed to heavy metals (Eyckmans et al., 2012), toxins (Karim et al., 2011) or perfluorooctanoic acid (Hagenaars et al., 2013). These results could indicate a growing energy demand for cellular maintenance.

Another evidence of increase energetic requirement was the down-regulation of OXCT1b in LD-exposed fish. The 3-oxoacid CoA transferase 1b (OXCT1b) is a hepatic protein which degrades the ketone bodies in excess (i.e. ketolysis). Ketone bodies are small lipid-derived molecules that served as a circulating energy substrate and gene transcription control factor upon starvation (Krebs, 1966; Newman and Verdin, 2014). They are formed in the liver primarily from fatty acids when

glycogen reserves are exhausted, and then distributed via the blood system to brain and other tissues which require energy substrates (Soengas and Aldegunde, 2002). The down-regulation of OXCT1b in LD-exposed fish suggests an increased concentration of ketone bodies in the liver, which reflect an increased energy demand and the depletion of liver glycogen reserves. This result was consistent with a previous study in which we observed that LD pesticide exposure entrained a significant decrease in the hepatosomatic index, which furnish a global indication of metabolic status of liver (Gandar et al., 2015). Increased glycolysis and/or gluconeogenesis and ketone body formation indicated that LD exposure induced growing energy requirement and global depletion in hepatic energy reserves. Interestingly, ketone bodies also have cytoprotective effects and enhance the resistance to oxidative stress in mouse kidney exposed to paraquat (Shimazu et al., 2013). Increased ketone bodies may also be considered as an oxidative stress response of hepatic cell in LD-exposed fish.

Other protein changes indicated metabolic perturbation in LD-exposed fish. The 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase a (HPDA) intervenes in phenylalanine and tyrosine catabolism. These amino-acids are important sources of energy as they can enter in the citric acid cycle (Walton and Cowey, 1982). The down-regulation of HPDA may indicate a decrease in the protein concentration or an attempt to compensate the protein denaturation by oxidative stress (Eyckmans et al., 2012). This is consistent with the significant decrease in liver protein concentration observed in goldfish exposed to the same mixture (Gandar et al., 2015). In another way, the Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (GPDH) also plays a pivotal role in lipid and carbohydrate metabolism and energy production (Hall et al., 2006). GPDH catalyzed the conversion of dihydroxyacetone phosphate (DHAP) to glycerol-3-phosphate (G3P). G3P is required for triglycerides, phospholipids and glycerol synthesis (Lewis et al., 2010; Vanya Ewart et al., 2001). The cytosolic and mitochondrial GPDH proteins also form a glycerol phosphate shuttle that intervenes in the internalization of NADH from the cytosol to mitochondria. NADH enters in the mitochondrial respiratory chain which produces the cellular energy. Decreased HPDA and GPDH abundance suggested a perturbation in energy production and a decrease in protein concentration and

lipid deposition in the liver of LD-exposed fish. Viant et al (2003) shown a decrease of the metabolic conditions in fish exposed to heat stress associated with HSP induction. Taken together, these results indicate a growing energy demand in LD-exposed fish, probably to compensate the cost of the defense system induction.

In parallel, we found only four proteins involved in metabolism pathways which are differentially expressed in HD exposed group. The sorbitol dehydrogenase (SORD) and the UDP-glucose pyrophosphorylase 2a (UGP2a) are important enzymes involved in carbohydrates interconversion. UGP2a forms UDP-glucose which is a glycogen precursor. Sorbitol can be used to produced fructose, glucose or glycogen (Blackley 1951). Concomitant increased UGP2a and decreased sorbitol dehydrogenase may indicate liver glycogen deposition. The aspartate transaminase (AST) catalyzes the catabolism of the aspartate amino-acid in oxaloacetate which enters in the citric acid cycle or in the gluconeogenesis pathway (Walton and Cowey, 1982). The observed down-regulation in ALDOB and AST abundance indicated glycolysis and gluconeogenesis decreases. The glycogen deposition, the glycolysis and gluconeogenesis slowing down and the absence of ketone bodies overproduction suggested a decreased metabolic compensation in the HD-exposed fish compared to the LD exposure.

Cell structure and organization

The HD pesticide exposure upregulated several proteins involved in the cell structure and organization, including actin, tubulin isoforms and intermediary filament protein. The dynamic properties of actin proteins play pivotal role in the structural framework of cell, their motility and their division (Hall, 1998). The microtubule cytoskeleton consists of microtubule polymers composed of alpha and beta tubulin polypeptides (Lopez-Fanarraga et al., 2001). It intervenes in several cellular functions such as cell division, locomotion, signaling and intracellular transport. The intermediary filament protein (IFP), also called keratin 8 (Kr8), is involved in numerous pathways including cellular homeostasis, mitochondrial and cellular structure. Individually, each of these proteins was identified as a marker of organ diseases in rodents and human (Mogensen et al., 1999; Sparrow et al., 2003; Tischfield et al., 2011; Toivola et al., 2004). In addition, the upregulation of cytoskeletal genes, including microtubule, keratin 8 and actin genes, was suspected to

play an important role in the development of hepatocarcinogenesis in mouse (Sun et al., 2007). Inversely, Kr8 was found to have cytoprotective properties in severe toxic liver injuries by inducing the formation of Mallory bodies (i.e. cytoplasmic protein aggregates containing cytokeratins) (Zatloukal et al., 2000). In fish, perturbations of cytoskeleton proteins was found in response to toxins (Karim et al., 2011), herbicide mixtures (Marchand et al., 2006), insecticides (Biales et al., 2011) and heavy metals (Karlsen et al., 2011; Wang et al., 2013). These results demonstrate that the HD-pesticide exposure induce a significant disruption of cytoskeletal organization. While it must be considered with cautions, our study also suggests that the HD concentration is susceptible to induce liver injuries and diseases. Data on histopathological effects of realistic concentrations of herbicides or fungicides are scarce. However, few studies showed degenerative changes in the liver tissue of fish exposed to low dose of atrazine, including vacuolization, lipid infiltrations, hydropic degeneration and necrosis (Mela et al., 2013; Xing et al., 2012). Histopathological analyses would be necessary to confirm the molecular changes observed in this study.

4.2. Crossed-effect between temperature rising and pesticide exposures

The molecular response of fish to temperature changes was extensively studied (Kassahn et al., 2009; Pörtner, 2002; Pörtner et al., 2007, 2004). Temperature rising affects the protein conformation, enzymatic activities, lipid composition in membranes and nucleic acid stability. In order to maintain cellular homeostasis and function, a multifaceted thermal acclimation process occurs in ectothermic species, as fish. As expected from the literacy (Kassahn et al., 2009; Pörtner et al., 2007; Sokolova et al., 2012; Sørensen et al., 2003), the thermal response observed in this study elicited an important response of the goldfish liver proteome, with the regulation of 32 proteins involved in carbohydrate, lipid and amino-acid metabolisms, methionine and folate cycles, cellular structure and organization, cell death and survival, energy production and cellular response to stress. The principal component analysis showed none significant separation between control and pesticides exposed fish at 32°C, which suggest that the temperature response masked the pesticide effects. However, we found significant changes in the regulation of some

proteins involved in cellular response to stress, cell cycle regulation, energy metabolism and cell structure.

Cellular stress response and cell death control

Regarding the proteins involved in the cellular stress response, we found that CON/32 exposed fish induced HSC70 and NKEF and inhibited HSP60 and NKEF-B expression. The different response of these proteins could be due to their specific role in cellular protection or different sensibility to thermal-induced denaturation or ROS-induced oxidation (Loo et al., 2012; Pérez-Sánchez et al., 2011; Pörtner et al., 2007; Young et al., 2010). The 70kDa HSP is especially involved in cell survival and liver regeneration (Shi et al., 2007). Previous studies suggested that it protects the mitochondrial membranes from ROS-induced damages (Polla et al., 1996) and has antiapoptotic properties (Shi et al., 2007). At the opposite, HSP60 is proapoptotic (Shi et al., 2007). The respective up and downregulation of HSC70 and HSP60 in CON/32 fish could prevent hepatocytes from apoptosis and promote liver regeneration. The important decrease observed in RGN, another proapoptotic protein, comforted this hypothesis. In another hand, CON/32 fish also showed an increase in the zgc:56585 protein, which corresponds to the 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) described in *Salmo salar* (NCBI blast tool, E-value = 4E-112). The 15-PGDH inactivates the prostaglandin E₂ (PGE₂) (Backlund et al., 2005; Tai et al., 2006). PGE₂ can be synthesized upon cellular stress and inflammatory stimuli, inhibits apoptosis and stimulates the proliferation of cancer cells (Backlund et al., 2005; Castro-Sánchez et al., 2013). The upregulation of 15-PGDH therefore induces apoptosis, especially in hepatic cell (Castro-Sánchez et al., 2013). Other evidences of cell cycle and function perturbations were the upregulation of proteins involved in the methionine cycle (MAT1a and AHCY) and changes in folate cycle proteins (FDH and FTCD). The folate-mediated one-carbon metabolism is involved in several fundamental cellular functions, including the biosynthesis of DNA and RNA, amino acids and SAM (Chang et al., 2010; Watkins and Rosenblatt, 2012). Taken together, these results showed that temperature rising induces activation and deactivation of biochemical pathways involved in cell death and function. These changes may reflect the adaptive response of cell to the direct or indirect effects (i.e. ROS production) of

temperature on cellular components (Kassahn et al., 2009; Pörtner, 2002; Pörtner et al., 2007, 2004).

Pesticide exposure at 32°C also induced changes in proteins involved in oxidative stress response and cell death regulation. HSP60 was upregulated in both LD/32 and HD/32 groups compared to their own control (CON/32) while NKEF was downregulated. In addition, HD/32 exposed fish showed both increased GST and decreased PRDX6 concentrations. The glutathione-S-transferase intervenes in the detoxification of both ROS and lipophilic chemicals, as pesticides, by catalyzing their conjugation with glutathione. PRDX6 belongs to the peroxiredoxin family (Pérez-Sánchez et al., 2011). So and al. (2008) showed that the ROS H₂O₂ (hydrogen peroxide) induces cellular toxicity through the irreversible hyperoxidation of PRDX6. In another hand, LD/32 and HD/32 exposed fish showed a significant decrease in the zgc:56585/15-PGDH and an increase in the 14-3-3 protein. The 14-3-3ps are highly conserved proteins involved in the “14-3-3-mediated Signaling” pathway that regulates the cell cycle and inhibits apoptosis (Gardino and Yaffe, 2011; Masters and Fu, 2001; Nomura et al., 2003). Both 15-PGDH inactivation and 14-3-3p activation were found to be involved in the development and progression of cancer in mammals (Backlund et al., 2005; Castro-Sánchez et al., 2013; Freeman and Morrison, 2011; Lee et al., 2012; Woodcock et al., 2015). While it could be consider with cautions, these results suggest that combined pesticide mixtures and temperature rising led to an increase of ROS production compared to individual stresses, perturbation of cell cycle and potential liver damages and injuries.

Metabolic responses

Several metabolic pathways were affected by temperature rising, including perturbations of glycolytic and gluconeogenesis pathways (GAPDH, ALDOB, TPI1b, ENO3 and F1,6BP), activation of the pentose phosphate pathway (TKT) and amino acid catabolism (AST, HPDA, QDPRa), and suppression of protein breakdown (CPB1), lipid synthesis (GPDH), ketone body degradation (OXCT1b) and finally mitochondrial energy production (ATP5a). In the tolerance range, temperature rising entrains increased energy demand compensated by metabolic adjustments (Brodte et al., 2006; Sokolova et al., 2012; Strobel et al., 2013). The metabolic response observed in the CON/32 fish showed complex and multifaceted thermal effects, with for example

simultaneous up (GAPDH, ALDOB, TPI1b and TKT) and down (ENO3 and F1,6BP) regulation of proteins involved in the carbohydrate metabolism. However, the downregulation of OXCT1b observed in CON/32 exposed fish showed an increased requirement of energetic substrates by metabolic active tissues, as brain, and metabolic compensation by the liver. Unexpectedly, we also observed a significant decrease in the ATP synthase mitochondrial beta (ATP5b). The ATP5b participates to the respiratory mitochondrial chain which produces ATP. To respond to the increased energy demand induced by temperature rising, cells are supposed to increase the ATP production. Several hypotheses could explain the inverse response observed here. The first is a decrease in oxygen supply through ventilation and blood system, leading to a systemic anoxic state (Pörtner and Knust, 2007). However, the dissolved oxygen in water was maintained above 75% to limit the risks of anoxia. In addition, the goldfish possess a dramatic ability to modify gill structure in response to temperature and oxygen level changes in order to increase oxygen uptake capability (Sollid and Nilsson, 2006; Sollid et al., 2005). A second explanation is a decrease in the mitochondrial density in cell. Insofar as mitochondria are the principal site of cellular ROS production, this decrease could compensate the ROS overproduction induced by temperature rising (Keller et al., 2004; Pörtner et al., 2004). Third, the downregulation of OXCT1b was found to be associated in mammals with the downregulation of proteins and genes coding for proteins involved in the respiratory mitochondrial chain (Molette et al., 2012). In fact, starvation and increased energy demand upon stress exposure or temperature rising transform the liver in a gluconeogenic and/or ketogenic organ in order to maintain systemic energy homeostasis (Krebs, 1966; Mommsen et al., 1999; Moon and Johnston, 1980). In order to ensure this, the citric acid cycle is diverted to produce metabolic substrates for glucose and/or ketone body synthesis, which results in a decreased energy production (Krebs, 1966). Taken together, these results showed that temperature rising elicit a systemic increased energy demand and hepatic metabolic compensation.

Both LD and HD/32 exposure induces changes in proteins involved in carbohydrate, amino acid and ketone body metabolisms compared to CON/32 group. Among other changes, we observed a significant decrease in the

concentration of ALDOB, TPI1b and SORD upon the LD and/or HD exposure. In addition, the phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (PEPCK), a key enzyme in the gluconeogenesis pathway (Moon and Johnston, 1980), was downregulated in the LD/32 group. These results suggest a decrease in the formation of glucose by the liver of fish exposed to combined pesticide mixture and temperature rising. In another hand, while OXCT1b was significantly downregulated in both LD/22 and CON/32 groups, this response was absent in pesticide exposed fish at 32°C, which indicates a decrease in the production of ketone bodies by the liver. The decrease in these both pathways could reflect a shift from a metabolic compensation strategy to a conservation state (Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012). According to these authors, the conservation strategy is used when the energetic demand upon stress exposure exceeds the metabolic capacities of organisms. This strategy implies a decrease in basal and active metabolisms, which entrains the progressive extinction of metabolic responses to stress. This "Metabolic arrest" increases the survival time of stressed organisms by saving energetic resources. But this strategy is unsustainable over the long term insofar as it leads to performance and fitness suppression.

Cell structure and organization

Regarding the action of proteins involved in cellular structure and organization, the proteomic analysis showed that temperature rising inhibits the expression of tubulin proteins and IFP, while tropomyosin 3 and 4 (TPM3 and TPM4 respectively) were upregulated. In addition, actin was found to be specifically downregulated in HD/32 exposed fish compared to all other conditions. Oxidative stress induced by copper exposure was found to causes the same response in fish hepatic cells (Chen and Chan, 2009). These results suggest a challenged actin skeleton in response to oxidative stress (Karim et al., 2011) or changes in the osmotic cell volume under combined pesticide exposure and temperature rising (Hoffmann et al., 2009).

4.3. Contributions of the proteomic analysis to the evaluation of multiple stress effects on fish

A few studies have focused on herbicide mixture effects on fish. In our knowledge, this study was the first to investigate the mode-of-action of complex herbicide and fungicide mixture and the interaction with temperature

rising at the proteomic level. Collectively, our results clearly demonstrated that a mixture of herbicide and fungicides at environmental relevant concentrations induces oxidative stress in the goldfish hepatic cell, which targets primarily the mitochondria. The goldfish responded to the low dose pesticide exposure by increasing liver regeneration capacity, antioxidant defenses and metabolic compensations. At the opposite, the proteomic analysis showed that the HD exposure decreased the cellular defense induction and perturbs the cellular function and structure, which could result in liver injuries.

Our study also confirmed the major role plays by methionine cycle in response to complex herbicides mixture in fish (Evrard et al., 2010; Marchand et al., 2006). Consequently, the proteins and products (SAM, SAH and homocysteine) of methionine cycle may be suitable biomarkers for herbicides exposure. In addition, abnormal DNA methylation linked to methionine cycle perturbation was found to be involved in carcinogenesis induced by arsenic in rodent liver (Abernathy et al., 1999; Xie et al., 2007) and in human lung cells (Zhong and Mass, 2001). It was also suggested to play a role in the toxicity of arsenic and benzo[*a*]pyrene in fish (Kamstra et al., 2014). Insofar as several studies shown methionine cycle perturbation in liver of fish exposed to herbicide mixtures, further research on DNA and protein methylation are required.

Furthermore, the proteomic analysis showed differential regulation in several other proteins associated with cell death control and cancer development in mammals. Despite differences in some physiological processes, the use of fish species as biological models to study human carcinogenesis has grown rapidly (Cleten-Jansen, 2014; Feng and Martin, 2015; Konantz et al., 2012). While data on the carcinogenicity of the atrazine-desethyl (i.e. the major metabolite of atrazine) lack, atrazine is considered as a potential carcinogen in fish (Weber et al., 2013) and mammals (Gammon et al., 2005). Moreover, S-metolachlor, pendimethalin, tebuconazole and linuron are classified as possible human carcinogens using the carcinogen list established by the US Environmental Protection Agency (EPA). Longer exposure duration and histopathological analyses would be necessary to confirm the molecular changes observed in this study.

In another hand, our study showed that combined temperature rising and pesticide exposure induced an

increased oxidative stress in liver cell, deeply changed the cellular stress response, including antioxidant defenses, cell cycle regulation and cell death control, and decreased the metabolic response to individual chemical and thermal stresses. Our study also suggests that temperature rising could sensitive fish to pesticide exposure. Future works in this field should focus on the metabolic adaptive response to combined chemical and thermal stress.

References

- Abernathy, C.O., Liu, Y.P., Longfellow, D., Aposhian, H. V, Beck, B., Fowler, B., Goyer, R., Menzer, R., Rossman, T., Thompson, C., Waalkes, M., 1999. Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues. *Environ. Health Perspect.* 107, 593–597. doi:10.1289/ehp.99107593
- Alim'agri, 2012. Les chiffres de l'agriculture, de l'agroalimentaire, et de la forêt, Hors-Série. ed. Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (France).
- Backlund, M.G., Mann, J.R., Holla, V.R., Buchanan, F.G., Tai, H.-H., Musiek, E.S., Milne, G.L., Katkuri, S., DuBois, R.N., 2005. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer. *J. Biol. Chem.* 280, 3217–23. doi:10.1074/jbc.M411221200
- Basu, N., Todgham, A.E., Ackerman, P.A., Bibeau, M.R., Nakano, K., Schulte, P.M., Iwama, G.K., 2002. Heat shock protein genes and their functional significance in fish. *Gene* 295, 173–183. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00687-X
- Battaglin, W. a, Furlong, E.T., Burkhardt, M.R., Peter, C.J., 1998. Occurrence of Sulfonylurea , Sulfonamide , Imidazolinone , and other Herbicides in Midwestern Rivers , Reservoirs , and Ground Water , 1998. *Sci Total Env.* 1, 1–11.
- Benninghoff, A.D., 2007. Toxicoproteomics—The Next Step in the Evolution of Environmental Biomarkers? *Toxicol. Sci.* 95, 1–4. doi:10.1093/toxsci/kfl157
- Biales, A.D., Bencic, D.C., Flick, R.L., Blocksom, K. a., Lazorchak, J.M., Lattier, D.L., 2011. Proteomic analysis of a model fish species exposed to individual pesticides and a binary mixture. *Aquat. Toxicol.* 101, 196–206. doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.019
- Boithias, L., Sauvage, S., Taghavi, L., Merlina, G., Probst, J.L., Sánchez Pérez, J.M., 2011. Occurrence of metolachlor and trifluralin losses in the Save river agricultural catchment during floods. *J. Hazard. Mater.* 196, 210–219. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.09.012
- Bretau, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117–124. doi:10.1006/eesa.2000.1954
- Brodte, E., Knust, R., Pörtner, H.O., 2006. Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (Zoarcidae). *Polar Biol.* 30, 95–107. doi:10.1007/s00300-006-0165-y

- Butault, J.-P., Dedryver, C.-A., Gary, C., Guichard, L., Jacquet, F., Meynard, J.-M., Nicot, P., Pitra, M., Reau, R., Sauphanor, B., Savini, I., Volay, T., 2010. Ecophyto R&D : Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ? - Synthèse du rapport d'étude. France.
- Castro-Sánchez, L., Agra, N., Llorente Izquierdo, C., Motiño, O., Casado, M., Boscá, L., Martín-Sanz, P., 2013. Regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 2501–2511. doi:10.1016/j.biocel.2013.08.005
- Cavas, T., Konen, S., 2007. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 22, 263–268. doi:10.1093/mutage/gem012
- Chang, W.-N., Lin, H.-C., Fu, T.-F., 2010. Zebrafish 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase is similar to its mammalian isozymes for its structural and catalytic properties. *Protein Expr. Purif.* 72, 217–22. doi:10.1016/j.pep.2010.04.003
- Chen, H. Bin, Huang, H.Q., 2011. Proteomic analysis of methyl parathion-responsive proteins in *Sparus latus* liver. *Fish Shellfish Immunol.* 30, 800–806. doi:10.1016/j.fsi.2011.01.003
- Chen, D.-S., Chan, K.M., 2009. Changes in the protein expression profiles of the Hepa-T1 cell line when exposed to Cu²⁺. *Aquat. Toxicol.* 94, 163–76. doi:10.1016/j.aquatox.2009.06.014
- Chen, L., Zeng, Y., Yang, H., Lee, T.D., French, S.W., Corrales, F.J., García-Trevijano, E.R., Avila, M. a., Mato, J.M., Lu, S.C., 2004. Impaired liver regeneration in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A. *FASEB J.* 18, 914–916. doi:10.1096/fj.03-1204fje
- Cleten-Jansen, A.-M., 2014. Zebrafish models for studying bone cancers: mutants, transgenic fish and embryos, in: Heymann, D. (Ed.), *Bone Cancer: Primary Bone Cancers and Bone Metastases*. Elsevier, pp. 365–370.
- Coors, A., Frische, T., 2011. Predicting the aquatic toxicity of commercial pesticide mixtures. *Environ. Sci. Eur.* 23, 22. doi:10.1186/2190-4715-23-22
- Cui, Y., Liu, B., Xie, J., Xu, P., Habte-Tsion, H.M., Zhang, Y., 2014. Effect of heat stress and recovery on viability, oxidative damage, and heat shock protein expression in hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiol. Biochem.* 40, 721–729. doi:10.1007/s10695-013-9879-2
- De Zoysa, M., Ryu, J.-H.H., Chung, H.-C.C., Kim, C.-H.H., Nikapitiya, C., Oh, C., Kim, H., Saranya Revathy, K., Whang, I., Lee, J., 2012. Molecular characterization, immune responses and DNA protection activity of rock bream (*Oplegnathus fasciatus*), peroxiredoxin 6 (Prx6). *Fish Shellfish Immunol.* 33, 28–35. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.03.029
- Debenest, T., 2007. Characterization of the impact of agricultural pollution on benthic diatoms (in French). Université de Bordeaux, France.
- Debenest, T., Silvestre, J., Coste, M., Delmas, F., Pinelli, E., 2008. Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities. *Aquat. Toxicol.* 88, 88–94. doi:10.1016/j.aquatox.2008.03.011
- Denslow, N.D., Knoebl, I., Larkin, P., 2005. Chapter 3 Approaches in proteomics and genomics for ecotoxicology, in: Mommsen, T.P., Moon, T.W. (Eds.), *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. pp. 85–116. doi:10.1016/S1873-0140(05)80006-2
- Devault, D. a., Gérino, M., Laplanche, C., Julien, F., Winterton, P., Merlina, G., Delmas, F., Lim, P., Miguel Sánchez-Pérez, J., Pinelli, E., 2009. Herbicide accumulation and evolution in reservoir sediments. *Sci. Total Environ.* 407, 2659–2665. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.12.064
- Dorts, J., Kestemont, P., Dieu, M., Raes, M., Silvestre, F., 2011. Proteomic response to sublethal cadmium exposure in a sentinel fish species, *Cottus gobio*. *J. Proteome Res.* 10, 470–478. doi:10.1021/pr100650z
- Doux fils, J., Deprez, M., Mandiki, S.N.M., Milla, S., Henrotte, E., Mathieu, C., Silvestre, F., Vandecan, M., Rougeot, C., Mélard, C., Dieu, M., Raes, M., Kestemont, P., 2012. Physiological and proteomic responses to single and repeated hypoxia in juvenile Eurasian perch under domestication - Clues to physiological acclimation and humoral immune modulations. *Fish Shellfish Immunol.* 33, 1112–1122. doi:10.1016/j.fsi.2012.08.013
- Eau-Evolution, 2007. Pesticides in surface waters in 2007 - Water agencies data (in French) [WWW Document]. URL http://eau-evolution.fr/doc/articles.php?lien=eau_carte_qualite_france_riviere_pesticide_micropolluant
- Eggen, R.I.L., Behra, R., Burkhardt-Holm, P., Escher, B.I., Schweigert, N., 2004. Challenges in ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 38, 58A–64A. doi:10.1021/es040349c
- Evrard, E., Marchand, J., Theron, M., Pichavant-Rafini, K., Durand, G., Quiniou, L., Laroche, J., 2010. Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 152, 321–331. doi:10.1016/j.cbpc.2010.05.009
- Eyckmans, M., Benoot, D., Van Raemdonck, G. a a, Zegels, G., Van Ostade, X.W.M., Witters, E., Blust, R., De Boeck, G., 2012. Comparative proteomics of copper exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. *Comp. Biochem. Physiol. - Part D Genomics Proteomics* 7, 220–232. doi:10.1016/j.cbd.2012.03.001
- Fatima, M., Mandiki, S.N.M., Douxfils, J., Silvestre, F., Coppe, P., Kestemont, P., 2007. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish. Immune and antioxidant effects. *Aquat. Toxicol.* 81, 159–167. doi:10.1016/j.aquatox.2006.11.013
- Feng, Y., Martin, P., 2015. Imaging innate immune responses at tumour initiation: new insights from fish and flies. *Nat. Rev. Cancer* 15, 556–62. doi:10.1038/nrc3979
- Frau, M., Feo, F., Pascale, R.M., 2013. Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis. *J. Hepatol.* 59, 830–841. doi:10.1016/j.jhep.2013.04.031
- Freeman, A.K., Morrison, D.K., 2011. 14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression.

- Semin. Cell Dev. Biol. 22, 681–7. doi:10.1016/j.semcd.2011.08.009
- Fujisawa, K., Terai, S., Hirose, Y., Takami, T., Yamamoto, N., Sakaida, I., 2011. Senescence marker protein 30 (SMP30)/regucalcin (RGN) expression decreases with aging, acute liver injuries and tumors in zebrafish. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 414, 331–336. doi:10.1016/j.bbrc.2011.09.067
- Gammon, D.W., Aldous, C.N., Carr, W.C., Sanborn, J.R., Pfeifer, K.F., 2005. A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects. *Pest Manag. Sci.* 61, 331–55. doi:10.1002/ps.1000
- Gandar, A., Jean, S., Canal, J., Marty-Gasset, N., Gilbert, F., Laffaille, P., 2015. Multistress effects on behavior and physiology of *Carassius auratus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 3, 3323–3331. doi:10.1007/s12192-010-0223-9
- Gardino, A.K., Yaffe, M.B., 2011. 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 688–95. doi:10.1016/j.semcd.2011.09.008
- Garmouma, M., Teil, M.J., Blanchard, M., Chevreuil, M., 1998. Spatial and temporal variations of herbicide (triazines and phenylureas) concentrations in the catchment basin of the Marne river (France). *Sci. Total Environ.* 224, 93–107. doi:10.1016/S0048-9697(98)00326-X
- Graymore, M., Stagnitti, F., Allinson, G., 2001. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* 26, 483–495. doi:10.1016/S0160-4120(01)00031-9
- Hagenaars, a., Vergauwen, L., Benoot, D., Laukens, K., Knapen, D., 2013. Mechanistic toxicity study of perfluorooctanoic acid in zebrafish suggests mitochondrial dysfunction to play a key role in PFOA toxicity. *Chemosphere* 91, 844–856. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.056
- Hall, A., 1998. Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton. *Science* (80-). 279, 509–514. doi:10.1126/science.279.5350.509
- Hall, J.R., Short, C.E., Driedzic, W.R., 2006. Sequence of Atlantic cod (*Gadus morhua*) GLUT4, GLUT2 and GPDH: Developmental stage expression, tissue expression and relationship to starvation-induced changes in blood glucose. *J. Exp. Biol.* 209, 4490–502. doi:10.1242/jeb.02532
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ. Health Perspect.* 114, 40–50. doi:10.1289/ehp.8051
- Heugens, E.H.W., Hendriks, A.J., Dekker, T., Straalen, N.M. van, Admiraal, W., 2001. A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 31, 247–284. doi:doi:10.1080/20014091111695
- Hoffmann, E.K., Lambert, I.H., Pedersen, S.F., 2009. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol. Rev.* 89, 193–277. doi:10.1152/physrev.00037.2007
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78, 846–852. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.044
- Kamstra, J.H., Aleström, P., Kooter, J.M., Legler, J., 2014. Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* doi:10.1007/s11356-014-3466-7
- Karim, M., Puiseux-Dao, S., Edery, M., 2011. Toxins and stress in fish: Proteomic analyses and response network. *Toxicol.* 57, 959–969. doi:10.1016/j.toxicol.2011.03.018
- Karlsen, O.A., Bjørneklett, S., Berg, K., Brattås, M., Böhne-Kjersem, A., Grøsvik, B.E., Goksøyr, A., 2011. Integrative Environmental Genomics of Cod (*Gadus morhua*): The Proteomics Approach. *J. Toxicol. Environ. Heal. Part A* 74, 494–507. doi:10.1080/15287394.2011.550559
- Kassahn, K.S., Crozier, R.H., Pörtner, H.O., Caley, M.J., 2009. Animal performance and stress: Responses and tolerance limits at different levels of biological organisation. *Biol. Rev.* 84, 277–292. doi:10.1111/j.1469-185X.2008.00073.x
- Keith, P., Persat, H., Feunteun, E., Allardi, J., 2011. Les poissons d’eau douce de France. *Muséum National d’Histoire Naturelle, Paris.*
- Keller, M., Sommer, A.M., Pörtner, H.O., Abele, D., 2004. Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *J. Exp. Biol.* 207, 2529–38. doi:10.1242/jeb.01050
- Kling, P., Förlin, L., 2009. Proteomic studies in zebrafish liver cells exposed to the brominated flame retardants HBCD and TBBPA. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1985–1993. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.018
- Kling, P., Norman, a., Andersson, P.L., Norrgren, L., Förlin, L., 2008. Gender-specific proteomic responses in zebrafish liver following exposure to a selected mixture of brominated flame retardants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71, 319–327. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.12.010
- Konantz, M., Balci, T.B., Hartwig, U.F., Dellaire, G., André, M.C., Berman, J.N., Lengerke, C., 2012. Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1266, 124–37. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06575.x
- Krebs, H.A., 1966. The regulation of the release of ketone bodies by the liver. *Adv. Enzyme Regul.* 4, 339–353. doi:10.1016/0065-2571(66)90027-6
- Kreuger, J., 1998. Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996. *Sci. Total Environ.* 216, 227–251. doi:10.1016/S0048-9697(98)00155-7
- Kumar, V.B., Jiang, I.F., Yang, H.H., Weng, C.F., 2009. Effects of serum on phagocytic activity and proteomic analysis of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) serum after acute osmotic stress. *Fish Shellfish Immunol.* 26, 760–767. doi:10.1016/j.fsi.2009.03.005
- Laldinsangi, C., Vijayaprasadarao, K., Rajakumar, A., Muruganankumar, R., Prathibha, Y., Sudhakumari, C.C., Mamta, S.K., Dutta-Gupta, A., Senthilkumaran, B., 2014. Two-dimensional proteomic analysis of gonads of air-breathing catfish, *Clarias batrachus* after the exposure of endosulfan and malathion. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*

- 37, 1006–1014. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2014.03.007>
- Laskowski, R., Bednarska, A.J., Kramarz, P.E., Loureiro, S., Scheil, V., Kudřek, J., Holmstrup, M., 2010. Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors - A meta-analysis and case studies. *Sci. Total Environ.* 408, 3763–3774. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.01.043
- Lee, C.-H., Ou, W.-B., Mariño-Enriquez, A., Zhu, M., Mayeda, M., Wang, Y., Guo, X., Brunner, A.L., Amant, F., French, C.A., West, R.B., McAlpine, J.N., Gilks, C.B., Yaffe, M.B., Prentice, L.M., McPherson, A., Jones, S.J.M., Marra, M.A., Shah, S.P., van de Rijn, M., Huntsman, D.G., Dal Cin, P., Debiec-Rychter, M., Nucci, M.R., Fletcher, J.A., 2012. 14-3-3 fusion oncogenes in high-grade endometrial stromal sarcoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 929–34. doi:10.1073/pnas.1115528109
- Lewis, J.M., Ewart, K.V., Driedzic, W.R., 2010. Freeze resistance in rainbow smelt (*Osmerus mordax*): seasonal pattern of glycerol and antifreeze protein levels and liver enzyme activity associated with glycerol production. *Physiol. Biochem. Zool.* 77, 415–22. doi:10.1086/383509
- Li, M., Wang, J., Lu, Z., Wei, D., Yang, M., Kong, L., 2014. NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 146, 82–92. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.024
- Ling, X.P., Zhu, J.Y., Huang, L., Huang, H.Q., 2009. Proteomic changes in response to acute cadmium toxicity in gill tissue of *Paralichthys olivaceus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 27, 212–218. doi:10.1016/j.etap.2008.10.004
- Loo, G.H., Sutton, D.L., Schuller, K. a., 2012. Cloning and functional characterisation of a peroxiredoxin 1 (NKEF A) cDNA from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its expression in fish infected with *Neoparamoeba perurans*. *Fish Shellfish Immunol.* 32, 1074–1082. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2012.03.002>
- Lopez-Fanarraga, M., Avila, J., Guasch, a, Coll, M., Zabala, J.C., 2001. Review: postchaperonin tubulin folding cofactors and their role in microtubule dynamics. *J. Struct. Biol.* 135, 219–229. doi:10.1006/jsbi.2001.4386
- Lushchak, V.I., 2011a. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Lushchak, V.I., 2011b. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 153, 175–190. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2010.10.004>
- Lykidis, A., 2007. Comparative genomics and evolution of eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Prog. Lipid Res.* 46, 171–199. doi:10.1016/j.plipres.2007.03.003
- Maksymiv, I. V, Husak, V. V, Mosiichuk, N.M., Matviishyn, T.M., Sluchyk, I.Y., Storey, J.M., Storey, K.B., Lushchak, V.I., 2015. Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress. *Pestic. Biochem. Physiol.* doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.020>
- Marchand, J., Tanguy, A., Charrier, G., Quiniou, L., Laroche, J., 2006. Molecular Identification and Expression of Differentially Regulated Genes of the European Flounder , *Platichthys flesus* , Submitted to *Pesticide Exposure. Mar. Biotechnol.* 8, 275–294. doi:10.1007/s10126-005-0099-
- Martinov, M. V., Vitvitsky, V.M., Banerjee, R., Ataulakhanov, F.I., 2010. The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1804, 89–96. doi:10.1016/j.bbapap.2009.10.004
- Masters, S.C., Fu, H., 2001. 14-3-3 Proteins Mediate an Essential Anti-apoptotic Signal. *J. Biol. Chem.* 276, 45193–45200. doi:10.1074/jbc.M105971200
- Mela, M., Guiloski, I.C., Doria, H.B., Randi, M.A.F., de Oliveira Ribeiro, C.A., Pereira, L., Maraschi, A.C., Prodocimo, V., Freire, C.A., Silva de Assis, H.C., 2013. Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 93, 13–21. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.03.026>
- Mogensen, J., Klausen, I.C., Pedersen, A.K., Egeblad, H., Bross, P., Kruse, T.A., Gregersen, N., Hansen, P.S., Baandrup, U., Borglum, A.D., 1999. Alpha-cardiac actin is a novel disease gene in familial hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 103, R39–43. doi:10.1172/JCI6460
- Molette, C., Théron, L., Fernandez, X., Rémignon, H., 2012. Current advances in proteomic analysis of (fatty) liver. *J. Proteomics* 75, 4290–4295. doi:10.1016/j.jprot.2012.04.041
- Mommsen, T., Vijayan, M., Moon, T., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268. doi:10.1023/a:1008924418720
- Moon, T.W., Johnston, I. a., 1980. Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Comp. Physiol. ??? B* 136, 31–38. doi:10.1007/BF00688619
- Newman, J.C., Verdin, E., 2014. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol. Metab.* 25, 42–52. doi:10.1016/j.tem.2013.09.002
- Nomura, M., Shimizu, S., Sugiyama, T., Narita, M., Ito, T., Matsuda, H., Tsujimoto, Y., 2003. 14-3-3 Interacts directly with and negatively regulates pro-apoptotic Bax. *J. Biol. Chem.* 278, 2058–65. doi:10.1074/jbc.M207880200
- Pérez-Sánchez, J., Bermejo-Nogales, A., Calduch-Giner, J.A., Kaushik, S., Sitjà-Bobadilla, A., 2011. Molecular characterization and expression analysis of six peroxiredoxin paralogous genes in gilthead sea bream (*Sparus aurata*): insights from fish exposed to dietary, pathogen and confinement stressors. *Fish Shellfish Immunol.* 31, 294–302. doi:10.1016/j.fsi.2011.05.015
- Polard, T., 2011. Effets génotoxiques. Toulouse III.
- Polard, T., Jean, S., Gauthier, L., Laplanche, C., Merlina, G., Sánchez-Pérez, J.M., Pinelli, E., 2011. Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France. *Aquat. Toxicol.* 101, 126–134. doi:10.1016/j.aquatox.2010.09.014
- Polla, B.S., Kantengwa, S., François, D., Salvioli, S., Franceschi, C., Marsac, C., Cossarizza, A., 1996. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock

- against oxidative injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6458–6463. doi:10.1073/pnas.93.13.6458
- Pörtner, H., 2002. Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 132, 739–761. doi:10.1016/S1095-6433(02)00045-4
- Pörtner, H.O., Bennett, A.F., Bozinovic, F., Clarke, A., Lardies, M.A., Lucassen, M., Pelster, B., Schiemer, F., Stillman, J.H., 2006. Trade-offs in thermal adaptation: the need for a molecular to ecological integration. *Physiol. Biochem. Zool.* 79, 295–313. doi:10.1086/499986
- Pörtner, H.O., Knust, R., 2007. Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance. *Science* 315, 95–7. doi:10.1126/science.1135471
- Pörtner, H.O., Mark, F.C., Bock, C., 2004. Oxygen limited thermal tolerance in fish?—Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141, 243–260. doi:10.1016/j.resp.2004.03.011
- Pörtner, H.O., Peck, L., Somero, G., 2007. Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 362, 2233–58. doi:10.1098/rstb.2006.1947
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106–117. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006
- Roland, K., Kestemont, P., Loos, R., Tavazzi, S., Paracchini, B., Belpaire, C., Dieu, M., Raes, M., Silvestre, F., 2014. Looking for protein expression signatures in European eel peripheral blood mononuclear cells after in vivo exposure to perfluorooctane sulfonate and a real world field study. *Sci. Total Environ.* 468-469, 958–67. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.07.110
- Sakuragui, M.M., Paulino, M.G., Pereira, C.D.S., Carvalho, C.S., Sadauskas-Henrique, H., Fernandes, M.N., 2013. Integrated use of antioxidant enzymes and oxidative damage in two fish species to assess pollution in man-made hydroelectric reservoirs. *Environ. Pollut.* 178, 41–51. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.032
- Sanchez, B.C., Ralston-Hooper, K.J., Kowalski, K. a., Dorota Inerowicz, H., Adamec, J., Sepúlveda, M.S., 2009. Liver proteome response of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to several environmental contaminants: Potential insights into biomarker development. *Aquat. Toxicol.* 95, 52–59. doi:10.1016/j.aquatox.2009.08.002
- Schalinske, K.L., Smazal, A.L., 2012. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv. Nutr.* 3, 755–62. doi:10.3945/an.112.002758
- Sénat, 2012. Rapport d'information fait au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement. Paris, france, france.
- Sheader, D.L., Williams, T.D., Lyons, B.P., Chipman, J.K., 2006. Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray. *Mar. Environ. Res.* 62, 33–44. doi:10.1016/j.marenvres.2006.03.001
- Shi, Q., Dong, Z., Wei, H., 2007. The involvement of heat shock proteins in murine liver regeneration. *Cell. Mol. Immunol.* 4, 53–57.
- Shimazu, T., Hirschev, M.D., Newman, J., He, W., Shirakawa, K., Le Moan, N., Grueter, C.A., Lim, H., Saunders, L.R., Stevens, R.D., Newgard, C.B., Farese, R. V, de Cabo, R., Ulrich, S., Akassoglou, K., Verdin, E., 2013. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science* 339, 211–4. doi:10.1126/science.1227166
- Silvestre, F., Gillardin, V., Dorts, J., 2012. Proteomics to assess the role of phenotypic plasticity in aquatic organisms exposed to pollution and global warming. *Integr. Comp. Biol.* 52, 681–694. doi:10.1093/icb/ics087
- Slaninová, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodova, Z., 2009. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinol. Lett.* 30, 2–12. doi:NEL300709R01 [pii]
- So, Y.K., Jo, H.Y., Mi, H.K., Cha, Y.Y., Sung, W.C., Shim, J.H., Tae, J.K., Lee, K.Y., 2008. H2O2-dependent hyperoxidation of peroxiredoxin 6 (Prdx6) plays a role in cellular toxicity via up-regulation of iPLA2 activity. *J. Biol. Chem.* 283, 33563–33568. doi:10.1074/jbc.M806578200
- Soengas, J.L., Aldegunde, M., 2002. Energy metabolism of fish brain. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 131, 271–296. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S1096-4959(02)00022-2
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integr. Comp. Biol.* doi:10.1093/icb/ict028
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A. a., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. doi:10.1016/j.marenvres.2012.04.003
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181–201. doi:10.3354/cr00764
- Sollid, J., Nilsson, G.E., 2006. Plasticity of respiratory structures - Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 154, 241–251. doi:10.1016/j.resp.2006.02.006
- Sollid, J., Weber, R.E., Nilsson, G., 2005. Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*. *J. Exp. Biol.* 208, 1109–1116.
- Solomon, K.R., Dalhoff, K., Volz, D., Van Der Kraak, G., 2013. Effect of herbicides on fish, in: Tierney, K.B., Farrell, A., Brauner, C.J. (Eds.), *Organic Chemical Toxicology of Fishes. Fish Physiology: Volume 33.* pp. 369–409.
- Sørensen, J.G., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., 2003. The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6, 1025–1037. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00528.x
- Sparrow, J.C., Nowak, K.J., Durling, H.J., Beggs, A.H., Wallgren-Pettersson, C., Romero, N., Nonaka, I., Laing, N.G., 2003.

- Muscle disease caused by mutations in the skeletal muscle alpha-actin gene (ACTA1). *Neuromuscul. Disord.* 13, 519–531. doi:10.1016/S0960-8966(03)00101-9
- Stara, A., Machova, J., Velisek, J., 2012. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 334–43. doi:10.1016/j.etap.2011.12.019
- Strobel, A., Leo, E., Pörtner, H.O., Mark, F.C., 2013. Elevated temperature and pco2 shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *notothenia rossii*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 166, 48–57. doi:10.1016/j.cbpb.2013.06.006
- Sun, Q., Wang, Y., Zhang, Y., Liu, F., Cheng, X., Hou, N., Zhao, X., Yang, X., 2007. Expression profiling reveals dysregulation of cellular cytoskeletal genes in HBx-induced hepatocarcinogenesis. *Cancer Biol. Ther.* 6, 668–674. doi:10.4161/cbt.6.5.3955
- Taghavi, L., Merlina, G., Probst, J.-L., 2011. The role of storm flows in concentration of pesticides associated with particulate and dissolved fractions as a threat to aquatic ecosystems - Case study: the agricultural watershed of Save river (Southwest of France). *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.* 06. doi:10.1051/kmae/2011002
- Tai, H.-, Cho, H., Tong, M., Ding, Y., 2006. NAD⁺-Linked 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase: Structure and Biological Functions. *Curr. Pharm. Des.* 12, 955–962. doi:10.2174/138161206776055958
- Tischfield, M.A., Cederquist, G.Y., Gupta, M.L., Engle, E.C., 2011. Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 286–94. doi:10.1016/j.gde.2011.01.003
- Toivola, D.M., Ku, N.-O., Resurreccion, E.Z., Nelson, D.R., Wright, T.L., Omary, M.B., 2004. Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology* 40, 459–66. doi:10.1002/hep.20277
- Toni, C., Loro, V.L., Santi, A., de Menezes, C.C., Cattaneo, R., Clasen, B.E., Zanella, R., 2011. Exposure to tebuconazol in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 153, 128–132. doi:10.1016/j.cbpc.2010.09.008
- Van Der Kraak, G.J., Hosmer, A.J., Hanson, M.L., Kloas, W., Solomon, K.R., 2014. Effects of Atrazine in Fish, Amphibians, and Reptiles: An Analysis Based on Quantitative Weight of Evidence, Critical Reviews in Toxicology. doi:10.3109/10408444.2014.967836
- Vance, D.E., 2013. Physiological roles of phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* 1831, 626–632. doi:10.1016/j.bbalip.2012.07.017
- Vanya Ewart, K., Richards, R.C., Driedzic, W.R., 2001. Cloning of glycerol-3-phosphate dehydrogenase cDNAs from two fish species and effect of temperature on enzyme expression in rainbow smelt (*Osmerus mordax*). *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* 128, 401–412. doi:10.1016/S1096-4959(00)00333-X
- Veeranki, S., Tyagi, S.C., 2013. Defective homocysteine metabolism: Potential implications for skeletal muscle malfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 15074–15091. doi:10.3390/ijms140715074
- Viant, M.R., Werner, I., Rosenblum, E.S., Gantner, a. S., Tjeerdema, R.S., Johnson, M.L., 2003. Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 159–171. doi:10.1023/B:FISH.0000035938.92027.81
- Walton, M.J., Cowey, C.B., 1982. Aspects of intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* 73, 59–79. doi:10.1016/0305-0491(82)90201-2
- Wang, J., Wei, Y., Wang, D., Chan, L.L., Dai, J., 2008. Proteomic study of the effects of complex environmental stresses in the livers of goldfish (*Carassius auratus*) that inhabit Gaobeidian Lake in Beijing, China. *Ecotoxicology* 17, 213–220. doi:10.1007/s10646-007-0187-4
- Wang, M., Wang, Y., Zhang, L., Wang, J., Hong, H., Wang, D., 2013. Quantitative proteomic analysis reveals the mode-of-action for chronic mercury hepatotoxicity to marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquat. Toxicol.* 130-131, 123–131. doi:10.1016/j.aquatox.2013.01.012
- Watkins, D., Rosenblatt, D.S., 2012. Update and new concepts in vitamin responsive disorders of folate transport and metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* 35, 665–670. doi:10.1007/s10545-011-9418-1
- Weber, G.J., Sepúlveda, M.S., Peterson, S.M., Lewis, S.S., Freeman, J.L., 2013. Transcriptome alterations following developmental atrazine exposure in zebrafish are associated with disruption of neuroendocrine and reproductive system function, cell cycle, and carcinogenesis. *Toxicol. Sci.* 132, 458–66. doi:10.1093/toxsci/kft017
- Wetmore, B. a, Merrick, B.A., 2004. Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology. *Toxicol. Pathol.* 32, 619–642. doi:10.1080/01926230490518244
- Woodcock, J., Coolen, C., Goodwin, K., Baek, D., Bittman, R., Samuel, M., Pitson, S., Lopez, A., 2015. Destabilisation of dimeric 14-3-3 proteins as a novel approach to anti-cancer therapeutics. *Oncotarget*.
- Xie, Y., Liu, J., Benbrahim-Tallaa, L., Ward, J.M., Logsdon, D., Diwan, B. a, Waalkes, M.P., 2007. Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic. *Toxicology* 236, 7–15. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2007.03.021
- Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pestic. Biochem. Physiol.* 103, 74–80. doi:10.1016/j.pestbp.2012.03.007
- Xing, H., Wang, Z., Wu, H., Zhao, X., Liu, T., Li, S., Xu, S., 2015. Assessment of pesticide residues and gene expression in common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos: Health risk assessments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 113, 491–8. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.12.040

- Xu, H.-D., Wang, J.-S., Li, M.-H., Liu, Y., Chen, T., Jia, A.-Q., 2015. ¹H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 159, 69–80. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.020
- Yamaguchi, M., 2000. The role of regucalcin in nuclear regulation of regenerating liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276, 1–6. doi:10.1006/bbrc.2000.3359
- Young, R., Hayes, J.D., Brown, K., Wolf, C.R., Whitelaw, C.B. a, 2010. Peroxiredoxin gene expression signatures in liver reflect toxic insult. *Assay Drug Dev. Technol.* 8, 512–517. doi:10.1089/adt.2009.0246
- Zatloukal, K., Stumptner, C., Lehner, M., Denk, H., Baribault, H., Eshkind, L.G., Franke, W.W., 2000. Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. *Am. J. Pathol.* 156, 1263–1274. doi:10.1016/S0002-9440(10)64997-8
- Zheng, Q., Feng, M., Dai, Y., 2013. Comparative antioxidant responses in liver of *Carassius auratus* exposed to phthalates: An integrated biomarker approach. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 741–749. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.07.008
- Zheng, W.J., Hu, Y.H., Zhang, M., Sun, L., 2010. Analysis of the expression and antioxidative property of a peroxiredoxin 6 from *Scophthalmus maximus*. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 305–311. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2010.04.008
- Zhong, C.X., Mass, M.J., 2001. Both hypomethylation and hypermethylation of DNA associated with arsenite exposure in cultures of human cells identified by methylation-sensitive arbitrarily-primed PCR. *Toxicol. Lett.* 122, 223–234. doi:10.1016/S0378-4274(01)00365-4

Additional Files : Table 1

Fish proteins				Mouse homologous proteins			
ID	Protein name	Query cover	E value	Identities	Protein names	Gene ID	Gene ID no.
14-3-3p	14-3-3 protein beta/alpha-A	100%	2E-163	91%	14-3-3 protein beta/alpha	Ywhab	54401
ACT1	actin, cytoplasmic 1	100%	0E+00	99%	actin, cytoplasmic 2	Actg1	11465
AHCY	adenosylhomocysteinase	100%	0E+00	86%	adenosylhomocysteinase	Ahcy	269378
ALDOB	fructose-bisphosphate aldolase B	100%	0E+00	77%	fructose-bisphosphate aldolase B	Aldob	230163
AST	aspartate transaminase, cytoplasmic	99%	0E+00	80%	aspartate aminotransferase	Got1	14718
ATP5b	ATP synthase beta-subunit	99%	0E+00	88%	Atp5b protein	Atp5b	11947
CPB1	Carboxypeptidase B1	100%	5E-138	70%	pancreatic carboxypeptidase B1 precursor	Cpb1	76703
ENO3	beta-enolase	99%	0E+00	86%	beta-enolase	Eno3	13808
FBP1	fructose-1,6-bisphosphatase	99%	0E+00	77%	fructose-1,6-bisphosphatase 1	Fbp1	14121
FDH	10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	100%	0E+00	78%	cytosolic 10-formyltetrahydrofolate dehydrogenase	Aldh1l1	107747
FTCD	formimidoyltransferase-cyclodeaminase	100%	0E+00	67%	formimidoyltransferase-cyclodeaminase	Ftcd	14317
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	100%	2E-153	89%	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform 2	Gapdh	14433
GPDH	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1b	100%	0E+00	77%	glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)], cytoplasmic	Gpd1	14555
HPDA	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	99%	0E+00	71%	4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase	Hpd1	15445
HSC70	heat shock cognate 71 kDa protein	94%	0E+00	96%	heat shock protein 70 cognate	Hspa8	15481
HSP60	HSP60	96%	0E+00	88%	60 kDa heat shock protein, mitochondrial	Hspd1	15510
IFP	Intermediate filament protein ON3	84%	0E+00	66%	Keratin 8	Krt8	16691
MAT1a	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	99%	0E+00	84%	S-adenosylmethionine synthase isoform type-1	Mat1a	11720
NKEF	natural killer cell enhancing factor, partial	100%	5E-86	82%	peroxiredoxin-1	Prdx1	18477
NKEF-B	NKEF-B	100%	3E-115	76%	peroxiredoxin-1	Prdx1	21672
OXCT1b	3-oxoacetyl CoA transferase 1b	92%	0E+00	78%	succinyl-CoA:3-ketoacid coenzyme A transferase 1, mitochondrial precursor	Oxct1	67041
PAH	phenylalanine hydroxylase	99%	0E+00	75%	phenylalanine-4-hydroxylase	Pah	18478
PEPCK	phosphoenolpyruvate carboxykinase, partial	100%	0E+00	76%	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)	Pck2	74551
PMT	phosphoethanolamine methyltransferase				Non homologous proteins found		
QDPRa	quinoid dihydropteridine reductase a	97%	5E-127	74%	dihydropteridine reductase	Qdpr	110391
PRDX6	Peroxiredoxin 6 (Novel protein) (Zgc:73360)	99%	8E-114	72%	peroxiredoxin-6 isoform 1	Prdx6	11758
PYGL	glycogen phosphorylase, liver form	99%	0E+00	86%	glycogen phosphorylase, liver form	Pygl	110095
RGN	regucalcin	100%	2E-139	62%	regucalcin	Rgn	19733
SORD	sorbitol dehydrogenase	99%	0E+00	73%	sorbitol dehydrogenase	Sord	20322
TPI1b	triosephosphate isomerase 1b	98%	6E-144	81%	triosephosphate isomerase	Tpi1	21991
TKT	Tkt protein	98%	0E+00	72%	transketolase	Tkt	21881
TPM3	tropomyosin 3	100%	2E-84	84%	tropomyosin alpha-3 chain isoform Tpm3.1cy	Tpm3	59069
TPM4	tropomyosin alpha-4 chain isoform 1	100%	4E-103	85%	tropomyosin alpha-4 chain isoform Tpm4.1cy [Homo sapiens]	Tpm4	59069
TUBa6	tubulin alpha 6	96%	0E+00	98%	tubulin alpha-1A chain	Tuba1a	22142
TUBa8l2	tubulin, alpha 8 like 2	97%	0E+00	95%	tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	22143
TUBa8l4	tubulin, alpha 8 like 4	96%	0E+00	97%	tubulin alpha-1B chain	Tuba1b	22143
TUBb2c	Tubulin, beta 2c	95%	0E+00	99%	tubulin beta-4B chain	Tubb4b	227613
UGP2a	UDP-glucose pyrophosphorylase 2a	99%	0E+00	83%	UDP-glucose pyrophosphorylase 2, isoform CRA_a	Ugp2	216558

CHAPITRE 5.

Réponses adaptatives aux stress multiples

RESUME DU CHAPITRE

L'objectif de ce chapitre est d'évaluer la capacité du carassin doré à mettre en place une réponse générale de stress adaptée sous l'effet de stress chimique et thermique combinés, de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle. Cette étude est présentée dans l'Article 3.

Pour les organismes soumis à des facteurs de stress chimiques ou physiques, la capacité à mettre en place une réponse adaptative efficace est une condition fondamentale pour leur survie et leur performance à long terme [18]. Les réponses adaptatives au stress impliquent des réactions physiologiques différentes, parmi lesquelles l'équilibre métabolique est un déterminant majeur de la gestion des stress multiples [150]. Dans les chapitres précédents, nous avons montré que l'exposition à un cocktail de pesticides représentatif des contaminations observées dans le Sud-Ouest de la France et à une augmentation de la température entraînent des effets croisés significatifs sur le comportement et le métabolisme énergétique du carassin doré. Lorsque les deux stress sont combinés, la réponse comportementale est généralement plus importante mais les réponses métaboliques et physiologiques aux deux stress individuels disparaissent. La principale hypothèse retenue pour expliquer ces effets est le passage d'une stratégie métabolique de compensation à une stratégie de conservation [150,151]. Dans cette dernière, le coût bioénergétique de l'adaptation dépasse les capacités métaboliques des poissons qui entrent alors en arrêt métabolique (i.e. disparition de la capacité métabolique aérobie). Cette stratégie permet à l'organisme de survivre sans épuiser ses ressources énergétiques jusqu'à ce que la source de stress disparaisse. Toutefois, cette stratégie ne peut fonctionner que pendant un temps limité et entraîne à moyen terme en cas de stress chronique des effets importants sur la survie des individus.

Pour tester cette hypothèse, nous avons cherché à évaluer la capacité de réponse adaptative du carassin doré soumis à des contraintes chimiques et thermiques individuelles et combinées en suivant en cinétique trois grands traits de la réponse générale de stress (Chapitre 1-partie 1) [17,18]:

- réponse primaire neuroendocrinienne : concentration plasmatique en cortisol ;
- réponses secondaires : induction des systèmes de défense et réponse métabolique ;
- réponse tertiaire : effets sur la condition générale des poissons.

Pour cela, les poissons ont été séparés en deux lots puis graduellement acclimatés pendant une semaine à deux températures différentes : 22 et 32°C. Ils ont ensuite été exposés en cinétique de 16 jours au mélange de pesticides (concentration totale de 42,8 µg.L⁻¹) selon quatre conditions : CONTROL (poissons non exposés à 22°C), PEST (poissons exposés aux pesticides à 22°C), TEMP (poissons non exposés à 32°C)

et PEST*TEMP (poissons exposés aux pesticides à 32°C). Afin de suivre l'évolution de ces réponses dans le temps, 12 poissons par condition ont été prélevés à T0, T6h, T24h, T96h et T16 jours. Le design expérimental est présenté en détail dans le Chapitre 2- Expérience 3 (p136).

Pour chaque temps de prélèvement, la concentration en cortisol a été dosée dans le plasma. La réponse métabolique a été mesurée de l'échelle moléculaire à l'échelle tissulaire en couplant une analyse en métabolomique par ^1H -RMN sur des extraits de foie des poissons, le dosage des réserves énergétiques (concentrations totales en carbohydrates, protéines et lipides) dans le foie et les muscles, la mesure de l'activité du système de transport d'électron (ETS) dans le foie et les muscles et le calcul des indices hépatosomatiques et musculaires. L'induction des systèmes de défense a été mesurée dans le foie des poissons, celui-ci étant l'organe principal de détoxification des polluants et de régulation du métabolisme énergétique. Pour cela, l'activité des enzymes catalase (CAT), superoxydes dismutases (SODs) et glutathion-S-transférase (GST), qui interviennent dans la réponse antioxydante et/ou la détoxification des polluants, ont été mesurées par spectrophotométrie. Des informations complémentaires sur l'induction des systèmes de défense antioxydants ont été apportées par l'analyse en RMN. A l'échelle individuelle, la condition globale des poissons a été évaluée par l'indice de condition de Fulton.

Les résultats montrent que la réponse des poissons au stress dépend de la nature de celui-ci et varie dans le temps. Les réponses observées à T0 et T24h sont similaires aux réponses observées à T6h pour l'effet température et/ou chimique. Dans la mesure où ces temps n'apportent pas d'informations complémentaires et par souci de clarté, les résultats présentés dans l'article 3 concernent uniquement les réponses observées à T6h, T96h et T16 jours. A partir de ces résultats, deux patterns généraux de réponses ont été observés :

(1) Réponses aux stress individuels (groupes PEST et TEMP) : une réponse précoce adaptée et coordonnée de l'échelle moléculaire à l'échelle tissulaire. A T6h, une augmentation de la sécrétion de cortisol dans ces deux groupes indique que les poissons subissent un stress physiologique et ont enclenché une réponse générale de stress [17,18,37]. Elle est associée à l'induction d'un certain nombre de systèmes de défense antioxydants dont la combinaison dépend de la nature du stress. Ces réponses incluent une augmentation de la CAT, de la GST, du glutathion, du glutamate et de la glutamine - dont dépend la synthèse du glutathion - et de la taurine. Une augmentation dans les deux groupes de la concentration en précurseurs de phospholipides membranaires (phosphocholine et glycérophosphocholine) peut également être une réponse à la peroxydation lipidique engendrée par le stress oxydant et nécessitant la synthèse de nouveaux phospholipides [398,478]. Le malonate, un inhibiteur du fonctionnement des mitochondries susceptible d'augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de déclencher le processus d'apoptose [479], diminue également chez les poissons soumis à un stress thermique. L'ensemble de ces réponses indiquent que les stress

chimique et thermique individuels entraînent la surproduction de ROS dans les cellules hépatiques. Dans le même temps, une augmentation de la consommation d'énergie est observée dans le foie et, pour le groupe TEMP, dans le muscle. L'augmentation du métabolisme basal est classique chez les poissons soumis à un stress et correspond au coût bioénergétique de l'induction des systèmes de protection, de détoxification et de réparation des dommages [124,150,480]. Dans le cas de la température, l'augmentation du métabolisme est également liée directement à l'effet de la température sur l'activité enzymatique et les cinétiques de réactions biochimiques [22–24]. Ce coût énergétique est supporté par une augmentation de la production d'ATP par l'ETS ainsi que de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la néoglucogenèse à partir des protéines ou lipides du foie et/ou des muscles. Pour finir, l'absence d'effet sur la condition générale des poissons et la disparition de la grande majorité de ces réponses à la fin de l'expérience semblent indiquer que les poissons ont mis en place une réponse efficace leur permettant d'atteindre un état physiologique plus adapté. Toutefois, quelques effets persistent à T16 jours dans le foie des poissons du groupe PEST, notamment au niveau de l'indice hépatosomatique. Des analyses histopathologiques permettraient de déterminer si cet effet est le signe de dommages histologiques causés par les pesticides [481,482], d'une augmentation des capacités de détoxification du foie [481,483] ou du piégeage des pesticides dans des vacuoles lipidiques [484].

(2) Réponses aux stress combinés (groupe PEST*TEMP) : une réponse précoce inhibée et des effets importants de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle à T16 jours. Chez les poissons soumis à une augmentation de la température, l'exposition au cocktail de pesticides n'entraîne pas d'augmentation supplémentaire de la sécrétion de cortisol. De plus, l'ensemble des systèmes de défense et des réponses métaboliques observés en réponse aux stress individuels sont inhibés, indiquant un effet antagoniste des stress thermique et chimique sur la réponse générale de stress. A T96h, l'activité des SODs et de la CAT diminuent significativement par rapport aux contrôles, ce qui peut suggérer une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène par rapport aux stress considérés individuellement [58]. Elles augmentent ensuite à T16 jours mais sont accompagnées d'effets importants visibles aux différents niveaux d'organisation biologique. Au niveau moléculaire, une diminution de la concentration d'un grand nombre de métabolites indique une perturbation importante du métabolisme des acides aminés, de la production d'énergie et de la défense contre le stress oxydant. Au niveau tissulaire, l'augmentation de l'indice hépatosomatique et du dépôt de lipides dans les muscles indiquent également des perturbations du métabolisme énergétique, la séquestration des pesticides dans des vacuoles lipidiques et/ou des dommages tissulaires. Pour finir, une diminution significative de la condition globale des poissons est visible à T16 jours. L'ensemble de ces résultats indiquent que lorsque les poissons sont soumis aux deux stress combinés, la réponse générale de stress est inhibée, au moins dans un premier temps, avec des conséquences importantes à l'échelle individuelle sur la santé générale des poissons. Dans la mesure où la réponse de stress est fondamentale pour permettre aux

organismes de s'acclimater aux variations de leur environnement et de répondre aux différentes sources de stress physiques, chimiques ou biologiques, l'inhibition de la réponse générale d'adaptation peut entraîner des conséquences importantes sur la fitness et la performance des poissons [17,29]. Tout aussi préoccupant, la concentration en cortisol tend à diminuer à T16 jours par rapport aux témoins ($p=0,053$, ANOVA LSD post-hoc), ce qui peut indiquer une perturbation du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysaire-interrénal [222,224,225]. La perturbation endocrinienne de la synthèse des hormones stéroïdes, à savoir du cortisol et/ou des hormones sexuelles peut avoir des conséquences importantes sur l'aptitude et la survie des poissons, affectant les traits physiologiques et les réponses comportementales liés à l'adaptation au stress et à la reproduction [235].

En conclusion, les résultats indiquent que (1) les stress thermiques et chimiques individuels entraînent une réponse générale de stress incluant une stratégie de compensation métabolique, (2) que les patterns de réponse métabolique et de systèmes de défenses dépendent de la nature du stress (thermique vs. chimique); et (3) que les poissons sont incapables de mettre en place une réponse adaptative efficace lorsque les contraintes chimiques et thermiques sont combinées, avec des résultats délétères au niveau individuel. Ces résultats confortent ceux présentés dans les chapitres précédents. La diminution du métabolisme énergétique cellulaire lorsque les deux stress sont combinés est cohérente avec le passage d'une stratégie de compensation à une stratégie de conservation.

A notre connaissance, cette étude est la première à évaluer les effets croisés sur la réponse de stress des poissons du réchauffement de la température et d'une contamination de l'eau par des mélanges de pesticides avec une approche intégrée de la molécule à l'échelle individuelle. L'analyse combinée d'approches omiques, ici la métabolomique, et d'approches biochimiques plus classiques montrent un véritable intérêt pour évaluer la réponse d'organismes soumis à des stress complexes. Notre étude montre que les poissons exposés soit au cocktail de pesticide soit à l'augmentation de la température déclenchent une réponse générale de stress avec l'augmentation de la sécrétion de cortisol (i.e. réponse primaire neuroendocrinienne) et l'induction de systèmes de défense, de détoxification et/ou de réparation et d'une compensation métabolique (i.e. réponses secondaires). L'absence d'effet sur la condition générale des poissons (i.e. réponse tertiaire) suggère que la réponse de stress mise en place est adaptée et efficace. Par contre, l'exposition combinée aux stress chimiques et thermiques combinés perturbe la réponse de stress et entraîne une diminution de la condition générale des poissons, indiquant un effet synergique de la température et du cocktail de pesticides sur le carassin doré.

ARTICLE 3

Article en préparation

Adaptive response of fish under multi-stress exposure: from the molecular to the individual level

Allison Gandar ^{a,b}, Pascal Laffaille ^{a,b}, Cécile Canlet ^{c,d}, Marie Tremblay-Franco ^{c,d}, Annie Perrault ^{a,b}, Laure Gress ^e, Pierre Mormède ^e, Hélène Budzinski ^f, Nathalie Tapie ^f, Séverine Jean ^{a,b}.

^a Université de Toulouse ; INPT, UPS ; EcoLab, ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France. ^b CNRS ; UMR 5245 EcoLab, 31062 Toulouse, France. ^c INRA ; UMR1331, TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Toulouse, France. ^d Université de Toulouse, UMR1331, Toulouse, France. ^e INRA ; UMR 1388 GenPhySE, F-31326 Castanet-Tolosan, France. ^f Université Bordeaux ; UMR 5805 EPOC-LPTC, 351 Cours de la Libération, Talence Cedex 33405, France.

Article en préparation

Adaptive response of fish under multi-stress exposure: from the molecular to the individual level

Allison Gandar ^{a,b}, Pascal Laffaille ^{a,b}, Cécile Canlet ^{c,d}, Marie Tremblay-Franco ^{c,d}, Annie Perrault ^{a,b}, Laure Gress ^e, Pierre Mormède ^e, Hélène Budzinski ^f, Nathalie Tapie ^f, Séverine Jean ^{a,b}.

^a Université de Toulouse ; INPT, UPS ; EcoLab, ENSAT, Avenue de l'Agrobiopole, 31326 Castanet-Tolosan, France. ^b CNRS ; UMR 5245 EcoLab, 31062 Toulouse, France. ^c INRA ; UMR1331, TOXALIM (Research Centre in Food Toxicology), Toulouse, France. ^d Université de Toulouse, UMR1331, Toulouse, France. ^e INRA ; UMR 1388 GenPhySE, F-31326 Castanet-Tolosan, France. ^f Université Bordeaux ; UMR 5805 EPOC-LPTC, 351 Cours de la Libération, Talence Cedex 33405, France.

ABSTRACT

Aquatic systems are subject to various sources of stress, as global changes or pollutions. A major challenge for the next decade will be to evaluate the combined effects of these multiple stressors on organisms and ecosystems. For organisms submitted to chemical or physical stressors, the capacity to set up an efficient adaptive response is a fundamental prerequisite for their long-term survival and performance. Adaptive responses to stress involve different physiological responses, among which metabolic balance is a major determinant in multi-stress management. In this study, we aimed to evaluate the adaptive capacity of an aquatic fish species, *Carassius auratus*, under individual and combined chemical and thermal stresses. For that, fish were exposed for 16 days to a mixture of pesticides at environmental relevant concentrations and at two temperatures (22°C and 32°C). We focused on three major physiological traits of the stress response: the hormonal response (i.e. plasma cortisol), the metabolic balance from molecular to individual levels (metabolomics' approach, cellular energy allocation, energy reserves and global condition indexes), and the cellular defense system induction (SOD, CAT and GST). Our findings indicate that (1) low environmental relevant concentrations of pesticides lead to significant responses in fish from the molecular to the individual level; (2) the metabolic response depends on the kind of stress (thermal vs. chemical); and (3) fish may be unable to set up an efficient adaptive response when chemical and thermal stresses were combined, with adverse outcomes at the individual level. In our knowledge, this study is the first to assess the crossed-effects on fish of temperature warming and water contaminations by pesticide mixtures with an integrated approach from the molecular to the individual level. Our results confirm that metabolic balance is a central trait involved in the response to multi-stress exposure. This study also suggest that temperature rising could make fish more sensitive to water contamination by pesticides, raising concerns about conservation of wild fish submitted to global changes.

Keywords: Pesticides mixtures, Climate Change, Temperature, Metabolomic, Oxidative stress

1. Introduction

Aquatic systems undergo multiple stresses. Organism submitted to stress have two choices : « fight or flight » (Cannon, 1916 in McCarty, 2010 and Romero, 2010). The stress response is an adaptive strategy for organisms submitted to a stimulus perceived as dangerous (as the

danger is real or not) to run away or defend themselves (Barton, 2002; Selye, 1950). For this purpose, the activation of the sympathetic nervous system and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) axis initiates a cascade of physiological and behavioral changes triggered by catecholamines (i.e. adrenaline) and corticosteroid (i.e. cortisol) stress hormones. When

stress persists, organisms enter in a resistance phase characterized by the induction of cellular defense systems (Selye, 1950). The bioenergetics cost of the defense is supported by metabolic tradeoffs between maintenance, activity, growth, reproduction and energy storage (Calow, 1991; Handy et al., 1999; Marchand et al., 2004). When stress is chronic or exceeds the defense and compensation capacities, adverse effects on survival and fitness of organisms may occur (Barton, 2002; Selye, 1950).

In France, herbicides are the most frequently pesticides detected in rivers (CGDD 2011). While the adverse effects of insecticides on non-target species are subject to a broad consensus within the scientific community, the toxicity of herbicides at environmental relevant concentrations for aquatic vertebrates remains largely controversial (Solomon et al., 2013, 2008; Van Der Kraak et al., 2014). However, these studies focused almost exclusively on the effects of a single molecule. Studies on the effects of complex and realistic mixtures of pesticides on aquatic vertebrates are extremely rare, which can lead to a dramatic underestimation of the risks for wildlife (Hayes et al., 2006). At the same time, aquatic systems are submitted to environmental changes, as increased temperature. Interactions between contaminants and water temperature are particularly problematic for ectothermic species (e.g. fish) as the temperature directly affects many biochemical and physiological processes (Cech et al., 1985; López-Olmeda and Sánchez-Vázquez, 2011; Manciooco et al., 2014). Temperature increase lead to growing energy demand. By affecting the metabolic scope of individuals, the temperature can change the ability of aquatic organisms to effectively respond to chemical contamination, and *vice versa* (Kennedy and Ross, 2012; Lemly, 1996; Sokolova, 2013). The vast majority of studies thus show a synergistic effect of temperature on the toxicity of pollutants, especially in aquatic species (Holmstrup et al., 2010; Noyes et al., 2009; Schiedek et al., 2007). Inversely, the exposure to pollutants may affect the temperature tolerance in fish species (Manciooco et al., 2014). However, knowledge lacks about crossed-effect between temperature and pesticides mixtures on aquatic vertebrates. In a previous study (Gandar et al., 2015), we exposed Goldfish (*Carassius auratus*) to temperature increase and a mixture of herbicides and fungicides at realistic concentrations for 96 hours. Results showed

significant crossed-effect between temperature and pesticides on behavioral responses and energy reserves, suggesting that combined thermal and chemical stresses impaired the stress response of the goldfish to individual stressors, with potential adverse effect on global performance of fish at longer term.

The aim of this study was so to assess the adaptive response to stress of the goldfish submitted to individual and combined chemical and thermal stresses, integrating responses from the molecular to the whole organism level. For that, goldfish were exposed during 16 days to a mixture of six herbicides (S-Metolachlor, Isoproturon, Linuron, Aclonifen, Atrazine-desethyl and Pendimethalin) and one fungicide (Tebuconazol) for total concentrations $42 \mu\text{g.L}^{-1}$ at two temperature (22°C and 32°C). The stress response was investigated at 6h, 96h and 16 days of exposure, regarding plasmatic cortisol concentration, hepatic induction of antioxidant enzymatic defenses (SOD, and CAT) and enzymatic system of detoxification (GST), hepatic metabolome response by $^1\text{H-NMR}$ metabolomic analysis, energy reserves and cellular energy allocation in liver and white muscle, somatic indexes (muscle and hepatic indexes) and global condition of fish (Fulton's condition factor).

2. Materials and methods

2.1. Pesticide mixture and chemicals

The mixtures were developed on the basis of the pesticide contamination of the Save River (France), assessed from March 2008 to November 2009 (Polard 2011). The Save River watershed, located in the Gascogne area, is mainly used for intensive agriculture (corn, wheat and sunflower). High contamination levels of surface waters and sediment by triazines, (atrazine, DEA, cyanizine), ureas (isoproturon, linuron, chlorotoluron) and anilides (metolachlor, metazachlor) have been reported in the Gascogne area during spring flood (Devault et al. 2009; Polard et al. 2011). According to the analysis conducted by Pollard (2011), we selected six herbicides and one fungicide using three criteria: the frequency of detection, the concentration and the representation of the different families of molecules detected. Selected molecules are S-metolachlor, Isoproturon, Linuron, Tebuconazol, Aclonifen, Atrazine-desethyl and Pendimethalin (Table 1). Pesticide standards were diluted in acetone (0.3 mL.L^{-1} of water)

Table 1. Pesticide mixture: composition and concentrations.

Chemicals	Family	Use	measured concentrations ($\mu\text{g.L}^{-1}$)			
			CONTROL	TEMP	PEST	PEST*TEMP
S-Metolachlor	chloroacetanilide	herbicide	<LD	0.005 ± 0.007	14.6 ± 0.4	12.8 ± 0.2
Linuron	urea	herbicide	<LD	<LD	6.4 ± 0.2	7.2 ± 0.1
Isoproturon	substituted urea	herbicide	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.000	6.5 ± 0.1	7.5 ± 0.2
Tebuconazole	triazole	fungicide	0.002 ± 0.003	<LD	5.1 ± 0.1	4.9 ± 0.1
Aclonifen	diphenyl ether	herbicide	<LD	<LD	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.2
Atrazine-desethyl	triazine	herbicide	<LD	<LD	2.8 ± 0.1	3.1 ± 0.1
Pendimethalin	dinitroaniline	herbicide	<LD	<LD	0.7 ± 0.0	0.5 ± 0.0
Total			0.003 ± 0.003	0.007 ± 0.008	38.7 ± 1.1	38.6 ± 1.0

Goldfish were exposed to pesticide mixture (PEST), temperature rising (TEMP) or a combination of both stresses (PEST*TEMP). Pesticides concentrations were measured at T16days in triplicats for each condition. Mean \pm SD. LD: limit of detection.

Table 2. Physico-chemical parameters of the exposure conditions.

Parameters	Time	conditions			
		CONTROL	PEST	PEST*TEMP	TEMP
Temperature ($^{\circ}\text{C}$)	T6h	21.7 ± 0.7	21.9 ± 0.6	29.4 ± 2.8	30.0 ± 2.9
	T96h	20.9 ± 0.1	20.6 ± 0.1	28.6 ± 2.4	29.9 ± 0.5
	T16d	20.9 ± 0.6	21.0 ± 0.6	29.2 ± 2.3	30.2 ± 1.4
Dissolved oxygen (%)	T6h	86.6 ± 11.6	87.0 ± 0.5	84.4 ± 3.9	87.0 ± 7.4
	T96h	87.0 ± 2.9	88.6 ± 1.6	$75.9 \pm 10.$	79.4 ± 4.9
	T16d	87.9 ± 1.7	87.9 ± 1.8	87.9 ± 1.8	87.9 ± 1.1
pH	T6h	7.7 ± 0.1	7.8 ± 0.0	7.8 ± 0.0	7.7 ± 0.0
	T96h	7.8 ± 0.0	7.7 ± 0.0	7.6 ± 0.0	7.7 ± 0.1
	T16d	7.7 ± 0.1	7.7 ± 0.0	7.8 ± 0.2	7.7 ± 0.2
Conductivity	T6h	379.0 ± 15.9	377.9 ± 13.2	389.9 ± 20.4	392.8 ± 22.8
	T96h	337.8 ± 8.5	360.0 ± 6.5	337.8 ± 8.5	372.3 ± 15.8
	T16d	357.4 ± 20.6	375.4 ± 20.1	351.8 ± 28.0	378.4 ± 24.2
Ammonium NH_4 (mg.L^{-1})	T6h	0.18 ± 0.00	0.21 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.18 ± 0.00
	T96h	1.65 ± 0.06	1.23 ± 0.01	1.83 ± 0.01	2.38 ± 0.10
	T16d	2.40 ± 0.05	0.77 ± 0.05	0.92 ± 0.16	3.58 ± 0.05
Nitrite NO_2^- (mg.L^{-1})	T6h	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	T96h	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.01 ± 0.00
	T16d	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.07 ± 0.00	0.11 ± 0.00
Nitrate NO_3^- (mg.L^{-1})	T6h	1.61 ± 0.39	2.30 ± 0.19	2.42 ± 0.43	1.64 ± 0.38
	T96h	1.55 ± 0.07	1.12 ± 0.02	1.65 ± 0.09	1.39 ± 0.07
	T16d	1.67 ± 0.10	1.06 ± 0.05	1.45 ± 0.35	1.61 ± 0.05

Goldfish were exposed to pesticide mixture (PEST), temperature rising (TEMP) or a combination of both stresses (PEST*TEMP). Physico-chemical parameters were measured at T6h, T96h and T16days of exposure in triplicats for each condition. Mean \pm SD.

and demineralized water to obtain a total concentration of $42 \mu\text{g.L}^{-1}$ to reflect situations of high levels of contamination measured in Europe and United States (Kreuger 1998; Battaglin et al. 2000; Graymore et al. 2001) Pesticide concentrations in water were measured after 16 days of exposure, showing a slight decrease compared to expected values (total concentration of $38.7 \mu\text{g.L}^{-1}$, Table 1).

Pesticide standards were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA): S-metolachlor (CAS-No: 87392-12-9, PESTANAL[®], analytical standard), Isoproturon (CAS-No: 34123-59-6, PESTANAL[®], analytical standard), Linuron (CAS-No: 330-55-2, PESTANAL[®], analytical standard),

Atrazine-desethyl (CAS-No: 6190-65-4, PESTANAL[®], analytical standard), Aclonifen (CAS-No: 74070-46-5, PESTANAL[®], analytical standard), Pendimethalin (CAS-No: 40487-42-1, PROWL[®], analytical standard), Tebuconazol (CAS-No:107534-96-3, PESTANAL[®], analytical standard). Acetone (CAS: 67-64-1, Fisher Chemical, HPLC solvent) was purchased from Fisher Scientific (Illkirch, France). Scintillation liquid (Flo-Scint II[™]) was purchased in Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, USA).Fish

Fish were purchased from the fish farming Carpio (Consac, France) in the size range 10-12cm. They were first acclimatized for two weeks in opaque tanks under

controlled conditions (18°C with a 12:12h light regime). Water was aerated and dechlorinated prior to fish introduction. Half of the water was renewed every day and fish were fed daily with commercial pellets. No mortality occurred during the acclimation period.

2.2. Experimental design

Fish were exposed to a pesticide mixture and/or temperature warming to obtain four conditions: CONTROL group (fish at 22°C non-exposed to pesticides), TEMP group (fish at 32°C non-exposed to pesticides), PEST group (fish exposed to pesticides at 22°C) and PEST*TEMP group (fish exposed to pesticides at 32°C). For that, they were placed in 60 L opaque aquaria in a temperature controlled room (22°C, 12 fish per aquarium and 2 aquaria per condition*exposure time). Prior to pesticide exposure, the water of TEMP and PEST*TEMP groups is gradually heated with resistors for a week to reach 32°C. Fish were then exposed 6h, 96h or 16 days to the mixture of pesticides. Water was renewed in half every day. Temperature, pH, oxygenation and conductivity were assessed 1 hour after the water renewal (Table 2). Ammonium, nitrites and nitrates concentrations were measured by colorimetry at each time of exposure (Table 2). Fish were fed daily and no mortality occurred during exposures.

12 fish per condition were randomly sampled 6 hours, 96 hours and 16 days after the beginning of exposure. Fish were rapidly stunning by concussion. Blood was drawn into a heparinized syringe by caudal puncture and centrifuged. Plasma samples were conserved at -80°C. Fish were weighted (to the nearest 10 mg) and measured (fork length to the nearest mm). Livers and fillets (white muscles) were collected, weighted (to the nearest 0.1 mg), frozen in liquid nitrogen and conserved at -80°C.

2.3. Plasmatic cortisol concentration

The cortisol is one of the major stress hormone in fish and is especially involved in the metabolic response to stress (Barton, 2002; Mommsen et al., 1999). The plasmatic cortisol concentration was assessed by radioimmunoassay (RIA). Briefly, 10 µL of plasma were mixed with 240 µL of absolute ethanol, vortexed for 10 min and then centrifuged for 10 min at 10000 rpm. 50 µL of supernatant were collected, deposited in glass tubes in duplicate and then evaporated using the SpeedVac for 15

min at 40°C. Dry residues were solubilized in 100 µL of PBS-G buffer (0.05M Phosphate buffer pH7.4, 9 g.L⁻¹ NaCl, 1 g.L⁻¹ NaN₃ and 1 g.L⁻¹ gelatin) and vortexed. Calibration standards were prepared in triplicates using cortisol standard diluted in PBS-G buffer. 100 µL of anti-cortisol antibodies solution (1/15K) were added in plasma and calibration standard tubes. The tubes were then vortexed and 100 µL of H³ radiolabelled cortisol solution (10K cpm) were added. The glass tubes were gently mixed, incubated at 40°C in bath water for 20 min and then at 4°C for 2 hours. The free radioactivity was adsorbed by adding 250 µL of dextran-coated charcoal solution (PBS-G buffer with 0.5 g.L⁻¹ dextran and 5 g.L⁻¹ charcoal). Glass tubes were incubated for 15 min and then centrifuged at 3400 rpm for 15 min at 4°C. Supernatants were mixed with 2.5 mL of scintillation liquid in scintillation vials. Radioactivity (cpm) was read for 2 min using liquid scintillation counter. The plasmatic cortisol concentration was expressed in ng.mL⁻¹.

2.4. Metabolomic analysis

Metabolite extraction

Metabolite extraction was realized using the Twostep protocol (2.0:2.0:1.8 methanol/chloroform/water) with 50 mg of tissue adapted from Lin et al. (2007) and Wu et al. (2008) with slight modifications. Briefly, liver of fish were ground and weight. 50 mg of powder were homogenized in Fastprep with 4 mL.g⁻¹ of methanol, 0.85 mL.g⁻¹ of Milli-Q water and then vortexed for 5s. Samples were mixed with 4 mL.g⁻¹ of chloroform and 2 mL.g⁻¹ of Milli-Q water. Samples were then vortexed during 5s, incubated 15 min at 4°C and then centrifuged at 2800g for 15 min. The entire upper layers were collected and keep at -20°C.

1D-¹H NMR spectroscopy and spectral preprocessing

Samples were evaporated using a SpeedVac and resuspended with 800 µL of sodium phosphate buffer with 10% D₂O containing 3-trimethylsilyl-2,2,3,3-d₄-propionate (TMSP, internal chemical shift standard). 600 µL are collected in 5mm NMR Tubes. NMR Spectra were acquired at 600 MHz with an Avance TM 600 spectrometer (Bruker, Coventry, UK) with a SampleJet autosampler using a NOESY sequence to remove the water signal. For 1D spectra, 256 scans were collected into 64,000 data points with a delay of 7.95 µs. The free induction decay (FID) was Fourier transformed and

spectra were phased, baseline corrected and calibrated with TMSF signal using TOPSPIN v2.1 software (Bruker, Coventry, UK). Spectra were then binned into an average of 0.01 ppm buckets between 0.5 and 9.4 ppm using a dynamic adaptive binning approach (Anderson et al., 2010) with the AMIX software v3.9 (Bruker, Coventry, UK). Data were normalized with respect to the total spectrum intensity using mean-centering and Pareto scaling to allow comparison between samples.

Statistical analysis

Separation between groups was assessed with multivariate data analyses including A-SCA analysis (ANOVA-simultaneous component analysis) and supervised orthogonal signal correction partial least square discriminant analysis (OSC-PLS-DA) using respectively MATLAB and SIMCA-P v13.0 (Umetrics, Sweden) software. A-SCA analysis was used to assess the effect of temperature, pesticide exposure and stress duration on the metabolome response using a significance threshold (p -value) of 0.05 (Smilde et al., 2005). Supervised PLS-DA was used to improve the discrimination between groups. OSC filter was applied prior to the analysis to decrease the analytical and biological variations that were not related to group discrimination (Beckwith-Hall et al., 2002). Permutation tests were realized with 200 iterations and the obtained Q^2 (predictability of the model, threshold of 0.4) and R^2 (total explained variations) were used to confirm the validity of the models. The Variable Importance in Projection (VIP, weight of variables for each component) was used to determine discriminant buckets. Comparisons between conditions were performed using Kruskal-Wallis tests and post-hoc tests.

Peak assignments

The discriminant metabolites were identified using databases such as the Biological Magnetic Resonance Data Bank (www.hmdb.ca/) (Ulrich et al., 2008) and the Human Metabolome Database (www.bmrb.wisc.edu/) (Wishart et al., 2007).

2.5. Energy reserves and cellular energy allocation

Total carbohydrate, lipid and protein contents and oxygen consumption rate in the electron transport system (ETS) were measured in liver and white muscle of fish with protocols adapted from De Coen and Janssen

(1997). Briefly, 25 mg of tissue were homogenate in 1 mL of demineralized water at 4°C using a Fastprep® homogenizer and divided in three volumes (300 μ L). The first volume was used to measure the total carbohydrate and protein concentrations. For that, 100 μ L of 15% trichloroacetic acid (TCA) was added. The sample was vortexed during 10s, incubated for 10min à -20°C and then centrifuged at 1000g, 4°C for 10 min. 50 μ L of the supernatant was deposited on microplate in triplicates. 50 μ L of 5% phenol and 200 μ L of H₂SO₄ were added and the microplate was incubated in the dark for 10min. Carbohydrate concentration (μ g.mg⁻¹ of tissue) was quantified using a microplate spectrophotometer at 492nm against glucose in TCA. The pellets was resuspended in 1250 μ L 1M NaOH, vortexed and incubated for 30min at 60°C. 250 μ L was deposited on a microplate in triplicates. Protein concentration (μ g.mg⁻¹ tissue) was quantified by adding 5 μ L of Bradford in each well and reading to spectrophotometer at 595nm against bovine serum albumin in 0.2N NaOH. The second volume of homogenate is mixed with 500 μ L chloroform, 500 μ L methanol and 200 μ L H₂O, and then centrifuged at 1000g, 4°C for 5min. The lower phase was incubated at 95°C in a water bath for 15 min with 200 μ L H₂SO₄ in glass tubes. After cooling in ice, 5 mL of vanillin phosphoric reagent was added. 200 μ L of sample were deposited on a microplate in triplicates. Lipid total concentration (μ g.mg⁻¹ tissue) was reading at 525nm against tripalmitin in chloroform. The third homogenate volume was mixed with 150 μ L of buffer (0.3M Tris-HCl pH 8.5, 45% (w/v) Poly Vinyl Pyrrolidone, 495 μ M MgSO₄ and 0.6% (w/v) Triton X-100) and centrifuged at 1300g, 4°C for 10 min. 50 μ L of sample were deposited in triplicates on a microplate. 150 μ L of BSS buffer (0.13M Tris-HCl pH 8.5, 0.3% (w/v) Triton X-100, 1.7mM NADH and 250 μ M NADPH) and 100 μ L of 8mM Iodonitrotetrazolium (INT) were added. Reading started when INT was added and was done for 3 min at 490 nm to measure the ETS activity (mJ.mg⁻¹ tissue.h⁻¹), using a molar extinction coefficient of 15900M⁻¹cm⁻¹.

Carbohydrate, protein and lipid concentrations were transformed in their energetic values (mJ. mg⁻¹ of tissue) using their enthalpy of combustion (17, 24 and 39.5 kJ.g⁻¹ respectively). Available energy (AE), energy consumption (EC) and cellular energy allocation (CEA) in liver and white muscle were then calculated according to Verslycke et al. (2004):

$$AE = \text{carbohydrates} + \text{proteins} + \text{lipids} \text{ (mJ.mg}^{-1} \text{ tissue)} \quad (1)$$

$$EC = \text{ETS activity (mJ.mg tissue}^{-1} \text{.h}^{-1}) \quad (2)$$

$$CEA = AE / EC \text{ (.h}^{-1}) \quad (3)$$

2.6. Somatic and condition indexes

Hepatosomatic index (HSI) and white Muscle index (MI) reflect the metabolic status of the liver (Chellappa et al., 1995; Zheng et al., 2013) and white muscles (Moon and Johnston, 1980) respectively. They were calculated as follow:

$$HSI = \frac{\text{liver weight (g)}}{\text{total weight(g)} - \text{liver weight (g)}} \times 100 \quad (4)$$

$$MI = \frac{\text{muscle weight (g)}}{\text{total weight(g)}} \times 100 \quad (5)$$

The Fulton's condition factor (FCF) is an index of the "well-being" of fish and reflects their global metabolic status (Smolders et al., 2005). It was calculated from weight and length of fish as follow:

$$FCF = \frac{\text{weight (g)}}{\text{length(cm)}^3} \quad (6)$$

2.7. Antioxidant and detoxification enzymes

The activity of the superoxide dismutases (SOD) and catalase (CAT), which are antioxidant enzymatic defenses, and of the Glutathion-S-Transferase (GST) involved in the detoxification of pollutants were measured by spectrophotometry in the liver of fish. Protocols were adapted from Feirrer et al. (2015). Briefly, 50 mg of tissue were homogenized at 4°C using FastPrep® in 1 mL of 0.1 M pH 7.8 K-phosphate buffer (100mM K-phosphate, 20 % (v/v) glycerol and 0.2mM fluoride phenylmethylsulphonyl). Homogenates were centrifuged at 10,000g for 15 minutes at 4°C. Supernatants (post-mitochondrial fraction, PMS) were aliquoted in 4 volumes of 100 mL and stored at -80°C for two weeks.

Protein concentrations were determined using a spectrophotometer at 595nm against bovine albumin serum (Bradford, 1976). CAT activity was determined at 240 nm by measuring the breakdown of H₂O₂ (Babo and Vasseur, 1992). The catalase enzymatic activity is expressed in units per mg of proteins (U.mg⁻¹), with one U corresponding to one μmol of H₂O₂ hydrolyzed per minute per gram of protein. SOD activity was measured at 340 nm for 5 minutes against standard SOD (Paoletti et al., 1986). The SOD activity (U.g⁻¹ proteins) was calculated from the calibration curve, with one Unit of

enzyme corresponding to 50% inhibition of NADH oxidation. GST activity was assessed at 340nm for 5 minutes by measuring the conjugation between 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and reduced glutathione (Habig et al., 1974). Enzyme activity was expressed as units per gram of protein (U.mg⁻¹), with one Unit corresponding to one nmol of the formed product per minute and per mg of protein.

2.8. Statistical analyses

Except for the metabolomics data, the difference between groups was analyzed with ANOVA and LSD post-hoc tests after validation of the assumption of homogenous variances with Levene test. Canonical analyses were used to integrate data from plasmatic cortisol concentration, accessible energy (AE) and consumed energy (CE) in liver and muscle, somatic indexes (HSI and MI) and condition factor (FCF) of fish. The distance between groups was calculated for each exposure time with the Mahalanobis distance, and the obtained p-value was used to determine significant separation with a threshold of 0.05.

3. Results

3.1. ¹H-NMR metabolomic analysis

The individual and interactive effects of pesticides, temperature and exposure duration on the global metabolome response were evaluated using A-SCA analysis. Results showed stress-specific (pesticides x temperature effect; p<0.05) and time-dependent (duration effect: p<0.05) response. Kruskal-Wallis tests were used to compare the discriminant metabolites between groups (threshold: p<0.05). The information on the discriminant peaks, metabolite identities, fold-changes (stressed groups vs. CONTROL, FC) and associated p-values were listed in the Table 3. Exposed groups showed a stress-specific and time-dependent profile of response. The number of differential metabolites compared to control group is also time-dependent, with a decrease in PEST and TEMP group over time and an opposite trend in PEST*TEMP group.

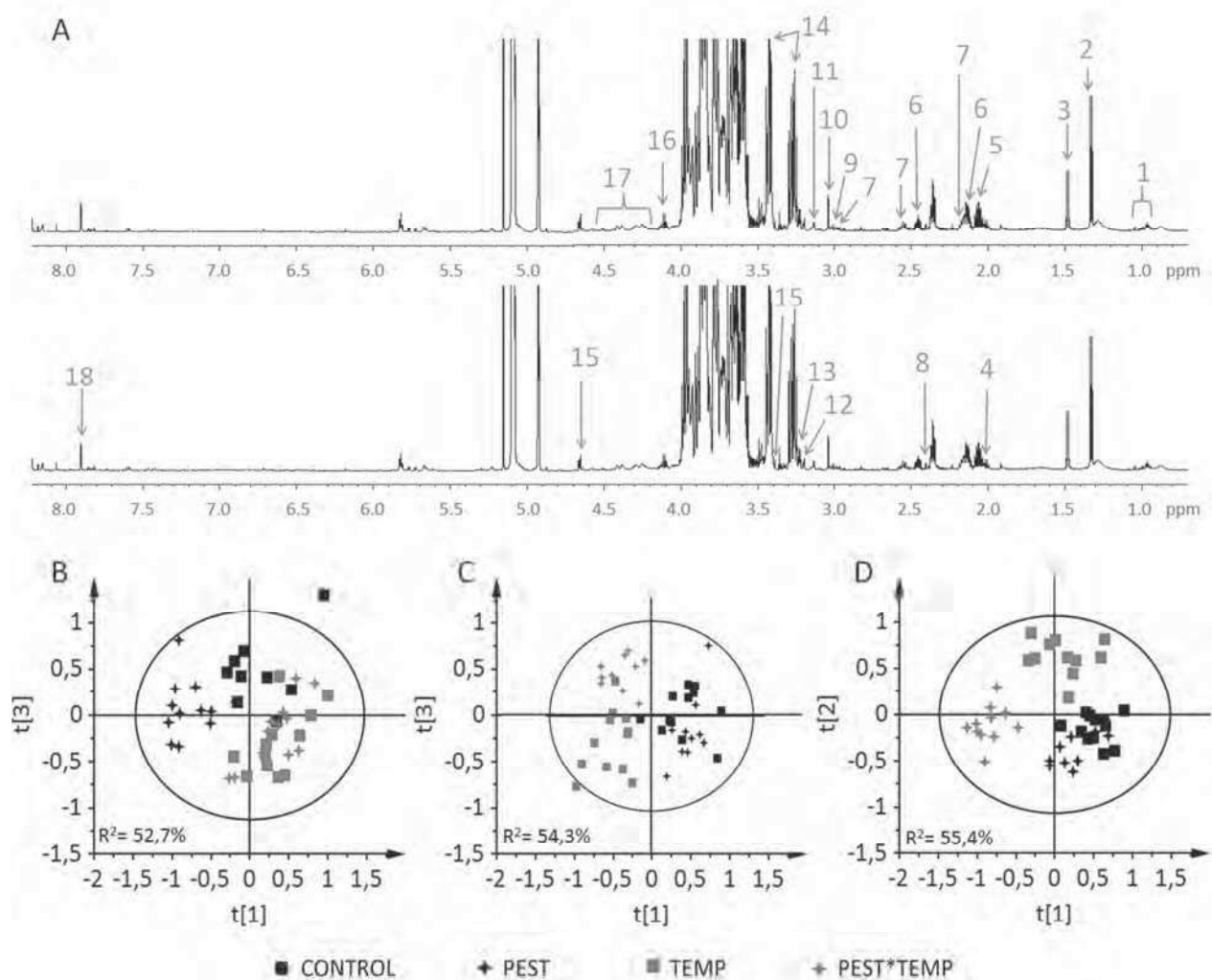


Figure 1. Example of 600 MHz ^1H NMR spectra of liver extract (A) and score plots for OSC-PLS-DA of NMR data (B, C, D).

Goldfish were exposed to pesticide mixture (PEST), temperature rising (TEMP) or a combination of both stresses (PEST*TEMP). ^1H NMR metabolomics analyses were realized on liver extracts at 6 hours, 96 hours or 16 days of exposure. Typical spectra and peaks assigned are presented in (A). Number: discriminant metabolites with 1 BCAA (branched-chained amino acids i.e. Isoleucine, Leucine and Valine); 2 Lactate; 3 Alanine; 4 Proline; 5 Glutamate; 6 Glutamine; 7 Glutathione; 8 Succinate; 9 Lysine; 10 Creatine; 11 Malonate; 12 Phosphocholine; 13 Glycerophosphocholine; 14 Taurine; 15 Glucose; 16 AXP; 17 UXP. Supervised PLS-Discriminant analyses (OSC-PLS-

An example of spectra with assigned peaks was presented in Figure 1A and OSC-PLS-DA models obtained for each exposure duration were shown in Figure 1(B-D). After 6 hours, OSC-PLS-DA analysis score plot based on total spectra showed a good separation between CONTROL and stressed groups (Figure 1B). PEST fish were clearly separated from the other group. Kruskal-Wallis tests showed a significant increase of glutamate, glutamine, glutathione, succinate, phosphocholine and AXP pool and a non-significant increase in glycerophosphocholine (Fold-change = 1.30) compared to CONTROL group. PEST exposure also tended to decrease the glucose (Fold-change = -1.35). Temperature rising (TEMP) increased significantly glutamine, glutathione, glycerophosphocholine and

taurine. PEST*TEMP and TEMP were not separated on the OSC-PLS-DA model (Figure 1B). However, PEST*TEMP exposure significantly decreased proline, lysine and UXP pool levels compared to CONTROL (Table 3).

At T96h, the individual chemical stress had no effects on the global metabolome, with superposed PEST and CONTROL groups (Figure 1C). However, PEST exposure significantly increased glucose compared to CONTROL and tended to decrease glycerophosphocholine (Fold-change = -1.21). In TEMP group, significant increase was observed for glycerophosphocholine and glucose, while proline, malonate and UXP decreased. A non-significant increase was also observed in glutamine (Fold-change = 1.21). PEST*TEMP exposure significantly decreased

Table 4. Endocrine, metabolic and physiological responses in goldfish exposed to individual and combined chemical and thermal stresses.

Variables	T6h			T96h			T16d		
	P	T	P*T	P	T	P*T	P	T	P*T
Cortisol	↑*	↑*	↑*	-	-	-	-	-	↓°
Liver									
carbohydrates	↑*	-	↑°	-	-	-	↑*	-	-
proteins	↑*	↑**	-	-	-	-	-	-	-
lipids	↓*	-	-	-	-	-	-	-	-
AE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EC	↑*	↑**	-	-	-	-	-	-	-
CEA	↓°	-	-	-	-	-	-	-	-
White Muscle									
carbohydrates	-	-	-	-	-	-	-	-	-
proteins	-	-	-	-	-	-	-	-	-
lipids	-	↓°	-	↑*	-	-	-	-	↑*
AE	-	↓*	-	↑*	-	-	-	-	↑*
EC	-	↑*	-	-	-	-	-	-	-
EA	-	↓***	-	-	-	-	-	-	↑*
HSI	↑**	-	-	-	-	-	↑*	-	↑**
MI	-	-	-	-	-	-	↑*	-	↑**
FCF	-	-	-	-	-	-	-	-	↓**

Fish were exposed for 6 hours, 96 hours or 16 days to a mixture of pesticides (P), temperature rising (T) or a combination of both (P*T). At each time, ANOVA analyses followed by LSD post-hoc tests were performed. Red arrows indicate increased values compared to CONTROL group while green arrows correspond to decreased values. Asterisks: significance of the differences compared to CONTROL group with: °: $p < 0.1$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$. Abbreviations: AE: available energy; EC: energy consumed; CEA: cellular energy allocation; HSI: hepatosomatic index; MI: muscle index; FCF: Fulton's condition factor.

alanine, proline, succinate, malonate, UXP and ATP, and non-significantly glutamate (Fold-change = -1.2).

At T16d, OSC-PLS-DA score plot showed a clear separation between PEST*TEMP group and other groups (Figure 1D). Significant decreases compared to CONTROL were found in isoleucine, leucine, valine, alanine, proline lysine, glutamate, glutamine, creatine, taurine, ATP and AXP, while non-significant decreases were observed for UXP and succinate (Fold-changes = -1.33 and -1.22 respectively). Significant differences between PEST*TEMP and both PEST and TEMP groups were also observed for the vast majority of these metabolites. TEMP condition increased significantly glutathione and glycerophosphocholine, and non-significantly glutamine, phosphocholine, succinate and lysine compared to CONTROL. It also decreased significantly proline and non-significantly isoleucine and creatine (Fold-changes = -1.23 and -1.31 respectively). None discriminant metabolites were found for PEST exposure, although phosphocholine

and glucose tended to increase and decrease respectively compared to CONTROL.

3.2. Endocrine, metabolic and physiological responses

The direction and significance of the endocrine, metabolic and physiological responses of fish to individual and combined chemical and thermal stresses were presented in the Table 4. The means values for all parameters were listed in the Additional File Table S1. Significant differences were assessed using ANOVA tests followed by LSD post-hoc tests. Compared to CONTROL group, PEST exposure significantly increased plasmatic cortisol at T6h, hepatic carbohydrates at T6h and T16d, hepatic proteins at T6h, liver energy consumption (EC) at T6h, lipids and available energy (AE) in muscle at T96h and hepatosomatic index (HSI) at T6h and T16d. A significant decrease was found in liver lipids, while a non-significant decrease was observed for liver cellular energy allocation (CEA, $p = 0.10$, LSD post-hoc test). At T6h, TEMP group showed a significant increase in cortisol, hepatic protein concentration and EC in liver and white muscle. A significant decrease was observed in muscle AE and CEA, associated to a non-significant decrease in lipid concentration in muscle ($p = 0.07$, LSD post-hoc test). No effects were found at T96h and T16d.

PEST*TEMP group showed a significant increase of plasmatic cortisol at T6h compared to CONTROL, but this concentration was similar to those observed in both individual stresses (Additional File: Table 1). There were no other effects compared to CONTROL at T6h. At the opposite, PEST*TEMP significantly increased muscle lipids, AE and CEA, HSI and muscle index (MI) at T16d. A significant decrease in the Fulton's condition factor (FCF) was observed at T16d. PEST*TEMP also tended to decrease the plasmatic cortisol concentration compared to CONTROL group at T16d ($p = 0.053$, LSD post-hoc test).

Plasmatic cortisol concentration, liver and muscle AE and CE, somatic indexes (HSI and MI) and condition factor (FCF) of fish were integrated in Canonical analyses associated to Mahalanobis distance calculs to observed separation between groups. Canonical representations for each exposure time and Mahalanobis distances between CONTROL and stressed groups were shown in the Figure . Blue diamond represented the variable positions on the first canonical plan, while red squares showed the mean position of each group. Results showed a stress-specific and time-dependent response

of fish with an opposite trend between individual and combined stress effects. The canonical analysis and Mahalanobis distances showed a significant separation between CONTROL and both TEMP and PEST groups at T6h (Figure 2A), but not at T96h and T16d (Figure 2B and C respectively). At the opposite, the distance between PEST*TEMP and CONTROL groups is non-significant after 6 hours but increased over time to become significant after 16 days.

3.3. Defense system induction

The activity of the superoxide dismutases (SOD), catalase (CAT) and glutathione-S-transferase (GST) were measured in the liver of fish (Figure 2). A significant increase of CAT activity was observed in PEST group at T6h. CAT and SOD activity decreased in PEST*TEMP group at T96h and then increased at T16d. GST activity tended to increase in PEST group at T6h compared to CONTROL and was significantly higher than in PEST*TEMP group. No effects were observed at T96h and T16d. TEMP group showed no response of these enzyme activities.

4. Discussion

The aim of this study was to assess the adaptive response to stress of the goldfish submitted to individual and combined chemical and thermal stresses, regarding primary endocrine stress response (plasma cortisol), secondary responses (hepatic induction of enzymatic defense systems and metabolic responses in liver and white muscles) and tertiary responses (global condition of fish). We found stress-specific and time-dependent responses of goldfish at all biological levels observed. Multivariate analyses showed two patterns of response: (1) a significant response at T6h followed by recuperation at T96h and T16d in fish exposed to individual stressors; and (2) the absence of response at T6h in fish exposed to combined chemical and thermal stresses, followed by important changes at T16d from the molecular to the individual levels.

4.1. Endocrine stress response induction

We found an increase of the plasma cortisol concentration at T6h in all stressed groups compared to CONTROL. Several studies have shown an increase in plasma cortisol in fish exposed to herbicides

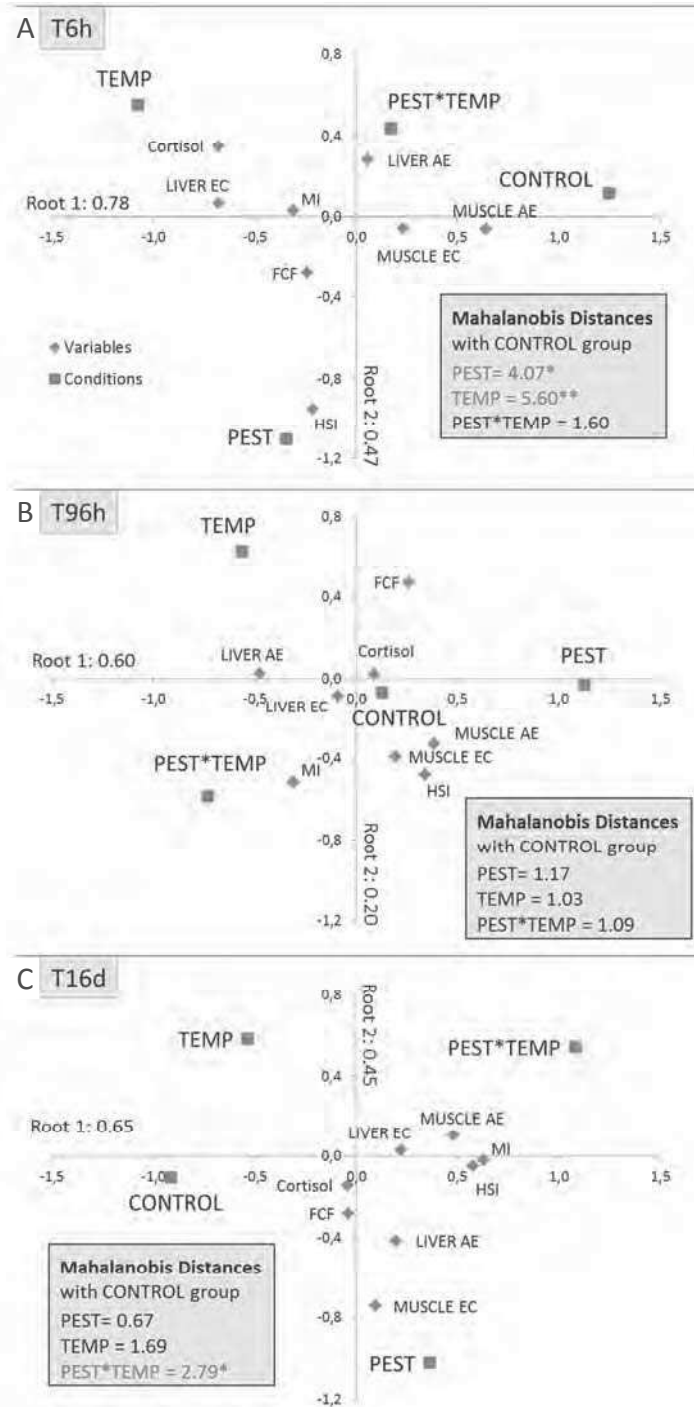


Figure 2 Canonical representations of endocrine, physiological and metabolic responses of goldfish to individual and combined chemical and thermal stresses.

Fish were exposed for 6 hours, 96 hours or 16 days to a mixture of pesticides (PEST), temperature rising (TEMP) or a combination of pesticide mixture and temperature rising (PEST*TEMP). Integration of endocrine, metabolic and physiological responses was realized using canonical analysis and Mahalanobis distance calculus. Blue diamonds: position of variables on the first canonical plan. Red squares: mean positions of groups. Blue boxes: Mahalanobis distances between exposed groups and control group. Asterisks: significant Mahalanobis distances with *: p -value < 0.05, **: p -value < 0.01. Abbreviations: AE: available energy; EC: energy consumed; HSI: hepatosomatic index; MI: muscle index; FCF: Fulton's condition factor.

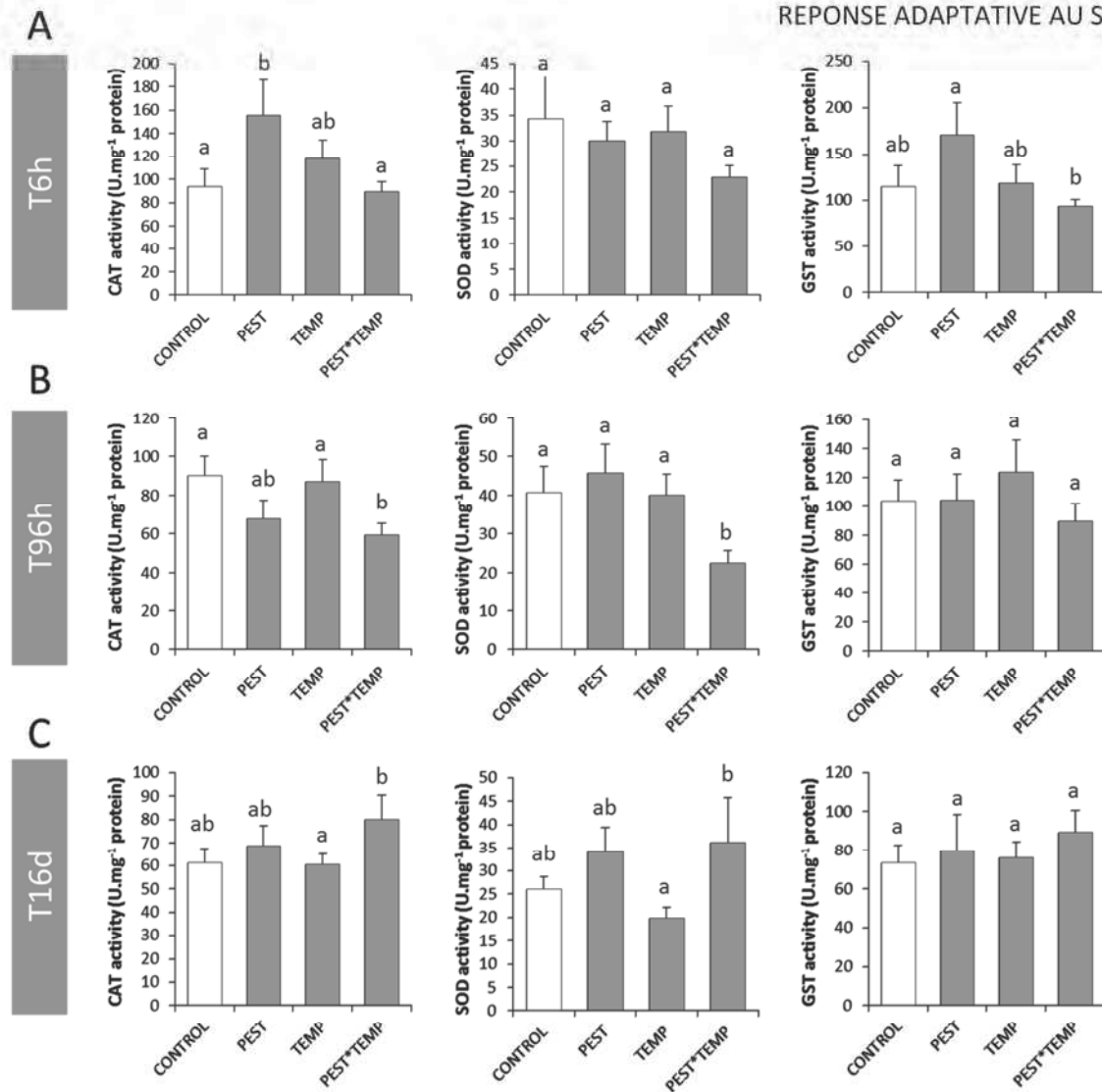


Figure 3. Defense system induction in goldfish exposed to individual and combined chemical and thermal stresses.

The activity of catalase (CAT), superoxide dismutases (SOD) and glutathione-S-transferase (GST) were measured in the liver of goldfish exposed to pesticide mixture (PEST), temperature rising (TEMP) or a combination of both stresses (PEST*TEMP). Measured were realized at 6 hours (A), 96 hours (B) and 16 days (C) of pesticide exposure. Mean \pm SE. N=12.

Moore, 2004), fungicides (Hashim and Zaki, 2005; Tierney et al., 2006) or temperature rising (Fernandino et al., 2013; Lyytikäinen et al., 2002). Cortisol is a fundamental component of the adaptive response to stress (Cannon, 1932; Selye, 1950). Under the effect of environmental stress, the central nervous system activates the hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis in fish. The HPI leads to the secretion of glucocorticoid "stress hormones", whose main in fish is cortisol (Barton, 2002; Hontela, 1997; Mommsen et al., 1999; Norris, 1997). Cortisol then triggers a number of coordinate secondary and tertiary responses from the molecular to the individual levels, enable organisms to flee or resist to the stress factor (Cannon, 1932; McCarty, 2010). Our results showed that both pesticide mixture and temperature rising triggered an endocrine stress

response, suggesting that fish undergone a physiological stress.

At T96h and T16d, cortisol levels were not significant higher in exposed fish than in controls. We have to note that plasma cortisol increased in CONTROL group between T6h and T96h (see Additional File: Table 1). This rise in cortisol in control fish could be due to co-occurring stress factors, such as the establishment of dominance relationships between fish. In fact, social interactions modulate the cortisol response and can act as confounding stress factors (Jeffrey et al., 2014; Sloman et al., 2002). Inversely, plasma cortisol decreased at T16d in all conditions compared to previous exposure times. These decreases could be due to the negative feedback which regulates the cortisol secretion. The stress response is a cost-effective process which may entrain

detrimental effects on growth, development, reproduction and performance of fish if it persists over time (Gregory and Wood, 2010; Pankhurst and Van Der Kraak, 2011; Selye, 1946). To protect the organism from these adverse effects, increased plasma cortisol inhibits the normal function of the HPI axis, leading to a decrease in cortisol secretion (Romero, 2004). In case of temperature rising, the transient induction of the cortisol response may also suggest that fish reached a physiological condition adapted to the ambient water temperature at T16d, with consequent reduction in the physiological stress (Fry, 1947). These results showed that the time-dependent cortisol response can lead to misinterpretations in the assessment of the physiological stress induced by environmental factor, including chemical exposures.

In PEST*TEMP group, cortisol concentration was found to be very closed to the level observed in TEMP group. This result showed that fish under thermal stress did not respond to pesticide exposure by an increase in cortisol secretion. Knowledge on the crossed-effect of temperature and pesticides on the cortisol response of aquatic organism are very scarce. But we can make several assumptions to explain this absence of endocrine response. First, a possible explanation is the decrease of the pesticide mixture toxicity with temperature rising. However, the vast majority of studies on aquatic vertebrates showed an opposite effect (Ferrando et al., 1987; Gluth and Hanke, 1984; Osterauer and Köhler, 2008; Rohr and Palmer, 2013). Secondly, the exposure to a first stressor may affect the normal function of the HPI axis and prevent the induction of a stress response to a subsequent stressor (Auperin and Geslin, 2008; Romero, 2004). In this last case, the hyporesponsive HPI axis to consecutive stressor could shut down the fish ability to perform an appropriate stress response (Romero, 2004).

It is also interesting to note that cortisol concentration tended to decrease in PEST*TEMP group compared to controls after 16 days of pesticide exposure ($p=0.053$, LSD post-hoc test). If lower level of cortisol was observed in organism submitted to an extreme stress (Romero, 2004), this decrease could also be due to pesticide endocrine perturbation of the HPI axis function. Several studies have shown that herbicide exposure inhibits the cortisol response to an acute stress in fish (Cericato et al., 2008; Koakoski et al., 2014; Nascimento et al., 2012). This inhibition could be linked to a toxic effect of

herbicides on interrenal cells or a regulation of the activity of the HPI axis at the level of the hypothalamus or pituitary (Bisson and Hontela, 2002; Cericato et al., 2009, 2008). Endocrine disrupting properties of some fungicides, including tebuconazole, have also been shown in several studies on fish (Ankley et al., 2002; Baudiffier, 2012; Hinfray et al., 2011; Kinnberg et al., 2007; Koakoski et al., 2014). These fungicides inhibit sterol synthesis through inactivation of demethylases enzymes belonging to the family of cytochrome P450. These enzymes are highly conserved in fungi, plants or animals and intervene in cortisol and other steroid hormone synthesis (Ankley et al., 2002; Maltby et al., 2009; Ohlsson et al., 2009). Endocrine disruption of the synthesis of steroid hormones, i.e. cortisol and/or sex hormones can have important consequences on the fitness and survival of fish, affecting physiological traits and behaviors associated with stress adaptation and reproduction (Ankley et al., 2002).

4.2. Induction of cellular defense systems

We assessed the induction of cellular defense systems in fish submitted to chemical and thermal stresses. We found that the pesticide mixture induced CAT, SOD and GST activity modifications in the liver of goldfish, but with temperature and time-dependent patterns of response. NMR analysis also revealed stress and time-specific changes in molecules involved in the defense against oxidative stress including glutathione, taurine, glutamate, glutamine, phosphocholine and glycerophosphocholine.

Catalase (CAT) and superoxide dismutases (SOD) are antioxidant enzymatic defenses induced in cells which experiment an abnormal increase in reactive oxygen species (ROS). Under normal conditions, ROS play an important role in the regulation of cellular processes including the maintenance of the redox potential and cell signaling (Halliwell et al., 1999). ROS are however likely to cause damage to membrane lipids, proteins or DNA and thus cause cell and tissue damages (Valavanidis et al., 2006). Many stressors can lead to excessive ROS formation in aquatic organisms, including chemical stress (Islas-Flores et al., 2013; Lushchak, 2011; Slaninová et al., 2009) and temperature (Cui et al., 2014; Lushchak, 2011; Malek et al., 2004). CAT and SOD catalyzed the reduction of ROS, participating to their detoxification (Lushchak et al., 2001; Regoli and Giuliani, 2014; Regoli et al., 2011). In another hand, glutathione-S-transferase (GST) intervenes

in the detoxification of both ROS and lipophilic chemicals, as pesticides, by catalyzing their conjugation with glutathione. Induction of CAT, SOD and/or GST was observed in fish exposed to herbicides (Blahová et al., 2013; Guilherme et al., 2012; Jin et al., 2010; Nwani et al., 2013; Sinhorin et al., 2014; Stara et al., 2012; Xing et al., 2012) and temperature rising (Gorbi et al., 2005; Madeira et al., 2013; Yin et al., 2013). We observed a transient increase activity of CAT and GST in PEST group at T6h, suggesting an increase in ROS production under the pesticide exposure, although SOD activity remained at the control level. GST activity increase also suggested an induction of the hepatic detoxification process. At the opposite, no responses of CAT, SOD and GST activity were observed in the TEMP group, despite the fact that temperature increase is a well-known pro-oxidant factor in ectothermic species.

However, antioxidant defenses include many other enzymatic or non-enzymatic molecules. NMR metabolomic analysis showed an increase in glutathione in PEST at T6h and in TEMP group at T6h and T16d. Glutathione is a well-known ROS scavenger and was used as a biomarker of oxidative stress in many studies (Regoli et al., 2011). Glutathione synthesis depends on the cellular concentration of glutamate and glutamine (DeBerardinis and Cheng, 2010). NMR analysis showed an increase of these two molecules at T6h in both PEST and TEMP groups. Glutamine is one of the principal transporters of nitrogen from peripheral tissues, as muscles, to the liver (Newsholme et al., 2003). In the liver, glutamine is breakdown in nitrogen and glutamate. Nitrogen is an essential compound for the synthesis of nucleotides, nucleic acid and urea. In another hand, glutamate may enter in several metabolic pathways including glutathione synthesis, protein synthesis, citric acid cycle or gluconeogenesis (Newsholme et al., 2003). According to their extensive variety of critical roles for the cell function and antioxidant defenses, increased glutamine and glutamate in the liver of fish could be considered as an important response to both chemical and thermal stresses.

Thermal stress also increased hepatic taurine levels at T6h and decreased malonate at T96h. Taurine is a sulfur-amino acid which counteract oxidative stress, although specific mechanisms are poorly understood (Kumar et al., 2009; Rosemberg et al., 2010). At the opposite, malonate induces mitochondrial potential collapse and ROS

production, leading to cell death (Fernandez-Gomez et al., 2005). Consequently, increased taurine level and decreased malonate may act in the same way to prevent ROS-induced damages in thermal exposed fish.

Another evidence of an oxidative stress induced in the liver of goldfish by both pesticide and temperature stresses is the significant increase of phosphocholine and/or glycerophosphocholine levels observed by NMR analysis. Phosphocholine and glycerophosphocholine are precursors of phospholipids, a major component of the biological membranes. The increased level observed for these precursors may result of the peroxidation of the membrane lipids by ROS and the consequent necessity for cell to rebuilding phospholipids (Li et al., 2014; Xu et al., 2015).

These results indicated ROS overproduction in the liver of fish exposed to individual chemical and thermal stresses, and consequent activation of antioxidant defenses. At the opposite, PEST*TEMP exposed fish showed no response of CAT, GST, glutathione, glutamate, glutamine, taurine, phosphocholine and glycerophosphocholine at T6h. Moreover, CAT and SOD activities were significantly reduced compared to control fish at T96h. Similar patterns of reciprocal inactivation of defense systems were shown in *Pimephales promelas* exposed to copper and heat shock (Lapointe et al., 2011). Moreover, it is well established that ROS (e.g. superoxide) oxidizes non enzymatic antioxidant defenses and inactivates several enzymes including CAT (see a review in Valavanidis et al., 2006). Inhibition of the stress defenses may indicate an overproduction of ROS under combined chemical and thermal stresses which exceeded the antioxidant capacity of the cells. Interestingly, CAT and SOD activity increased significantly at T16d while other responses were still shut down. This delayed response could emphasize the adverse effect of chemical and thermal-induced oxidative stress on cellular components, with increased risk of cell and tissue injuries.

4.3. Metabolic response to stress

The metabolic balance is a key process in the response to stress (Sokolova, 2013; Sokolova et al., 2012). NMR analysis in liver, as well as energy reserve concentrations and consumption in liver and white muscle showed that

both chemical and thermal stresses led to important metabolic changes with time and stress-specific responses.

We found increased liver energy consumption (EC) at T6h in both PEST and TEMPS groups. Cellular EC was assessed by measuring the electron transport system (ETS) activity. Increased ETS activity was shown in ectotherm species in response to chemical exposure and temperature rising (Gagné et al., 2007, 2006; Sappal et al., 2015; Schmidlin et al., 2015), which is consistent with our results. ETS activity reflects the production of ATP by mitochondria which depends directly on the cellular energetic demand (Gagné et al., 2007; Smith et al., 2012). The induction of defense systems, including detoxification, protection and reparation processes, is a costly process which increases the cellular energetic demand and requires metabolic compensations (Sherwood et al., 2000; Sokolova et al., 2012; Trudel et al., 2010). Proteins are the most energetic costly molecules to synthesis (Jorgensen, 1988; Smith et al., 2001). Increased hepatic protein concentrations were observed at T6h in both PEST and TEMP exposed fish. These increases may reflect the induction of defense systems, including antioxidant enzymes or heat shock proteins (Viant et al., 2003). Increased bioenergetic cost due to defense protein induction was shown in fish exposed to heat shock (Viant et al., 2003) or pollutants (Smith et al., 2001). We can also note that protein concentrations increased at T6h but not at T96h or T16d, which is consistent with the induction of antioxidant defenses and the increased energy consumed.

In PEST exposed fish, the co-occurring increases observed at T6h in liver EC, adenosine phosphate pool (AXP) and succinate, an intermediary product of the citric acid cycle, showed a metabolic compensation to the increased energy requirement. In a consistent way, hepatic glucose and lipids, which are important substrates for the energy production pathways, showed important decreases at T6h. However, we found an increase in total carbohydrate concentration in liver at T6h and T16d. Glycogen is the common form of storage of carbohydrates in cells and increased glycogen deposition is a classic metabolic response to cortisol (Mommsen et al., 1999). Furthermore, we observed a significant increase in the hepatosomatic index (HSI) at T6h and T16d. HSI increase was shown in fish exposed to pesticides (Arnold et al., 1995; Bacchetta et al., 2014;

Biagianti-Risbourg and Bastide, 1995). HSI is correlated to the metabolic status of the liver, and may reflect an increased glycogen storage (Chellappa et al., 1995; Zheng et al., 2013). But swollen HSI may also be due to sequestration of lipophilic pollutants in lipid droplets (Biagianti-Risbourg and Bastide, 1995), increased detoxification capacities (Arnold et al., 1995; Bacchetta et al., 2014) or degenerative changes in the liver tissue (Arnold et al., 1995; Guardiola et al., 2014). Histopathological analyses would be necessary to decide between these hypotheses. We can therefore conclude that pesticide exposure induced an increased energy demand in the liver of the goldfish, probably due to defense system induction, and metabolic compensations. While other responses shut down, the increased HSI, MI and hepatic carbohydrate concentration observed at T16d indicated persisting metabolic and/or histological perturbations in goldfish exposed to the pesticide mixture.

In TEMP group, energy consumption increased at T6h both in liver and white muscle, associate with significant decreases in muscular accessible energy (AE) and cellular energy allocation (CEA). In the tolerance range, temperature rising affects biochemical kinetics and enzyme activity leading to basal and active metabolism increased (Cech et al., 1985; López-Olmeda and Sánchez-Vázquez, 2011; Manciooco et al., 2014). Liver and muscular increased in energy consumption observed at T6h, and decreased available energy in muscle were consistent with systemic metabolic acceleration under temperature rising. The drop observed at T6h in the muscle CEA reflected a decreased metabolic status. Inversely, the hepatic CEA remained constant despite the increased energy consumption. A similar dichotomy between muscular and hepatic metabolic responses to heat shock was observed in *Oncorhynchus mykiss* (Viant et al., 2003). Under stress, lipid and protein reserves in white muscles are released into the blood system, carried to the liver and used as substrates for gluconeogenesis and protein synthesis (Mommsen et al., 1999). Glutamine, which increased in TEMP group at T6h, also enters through glutamate in the gluconeogenesis pathway (DeBerardinis and Cheng, 2010; Newsholme et al., 2003). These results showed that temperature rising entrained an increased energy demand and metabolic compensation through the whole organism. The vast majority of metabolic response to temperature rising

disappeared at T96h and T16d, suggesting that thermal-exposed fish reached an adapted physiological status.

In PEST*TEMP group, metabolic responses to individual stressor at T6h disappeared, including responses observed at the molecular, cellular and tissue levels. In particular, the ETS activity in both liver and muscle decreased compared to PEST and TEMP group, associated to decreased AXP and UXP energy pools. Decreased ETS activity under combined stressor could result from (1) perturbations in the normal function of the ETS or (2) a decreased mitochondrial densities in cells (Lannig et al., 2006; Lavergne et al., 2015; Sokolova and Lannig, 2008). In ectothermic species, mitochondrial plasticity plays a critical role in the metabolic response to environmental stressors (Strobel et al., 2013). The incapacity of fish to maintain an elevated energy production under multiple stress exposures could explain the absence of defense system induction observed at T6h. Consequently, it could also emphasize oxidative damages on cellular components, including proteins. PEST*TEMP exposed fish showed significant decreases in amino-acids levels as soon as T6h with proline and lysine reduced levels. At T16d, reduced concentrations were found for isoleucine, leucine, valine, alanine, proline, lysine, glutamate, glutamine, creatine and taurine, indicating an important perturbation of amino-acid metabolism and/or oxidative damages on proteins. In addition, lipid accumulation was observed in muscle at T16d, associated with MI and HSI increased, which may reflect lipid metabolism perturbations and/or histological damages. Finally, decreased global condition of fish (FCF) at T16d indicated reduced performance and fitness of fish exposed to combined pesticide mixture and temperature rising. These results showed that temperature rising may sensitize fish to complex environmental mixtures of pesticides, and *vice-versa*.

To resume, our results showed that both pesticide mixture at environmental concentrations and temperature rising in the tolerance range of the goldfish triggered an adaptive response to stress. Cortisol secretion, defense system induction and metabolic changes showed the same time-dependent pattern, drawing up a coordinated response from the molecular to the tissue levels. Moreover, the absence of adverse effect observed at T16d on the global condition of fish suggested an appropriate response that has enable fish to counteract the physiological stress induced by

individual stressors. However, histopathological analyses are required to assess the potential hepatotoxicity of the pesticide mixture.

Our study also showed that combined stressors inhibited the earlier endocrine response, antioxidant defenses induction and metabolic compensation to individual stressor. Insofar as the stress response is a fundamental process to coop with environmental variations and stressors, inhibited or delayed responses may increase the risks of detrimental effects at the individual level. This prediction was confirmed by the decreased global condition of fish observed at the end of the exposure. These results showed that multiple stress exposures could impair the adaptive stress response of fish, leading to decreased performance and fitness. It also confirmed that metabolic balance is a key process in the response of fish to stress and in the interaction between temperature and contaminants.

5. Conclusion

In our knowledge, this study was the first to assess the combined effects of a realistic pesticide mixture and temperature rising on fish from the molecular level to individual outcomes.

Our findings indicate that (1) individual thermal and chemical stresses induced an adapted and coordinated general stress response from the molecular to the tissue levels; (2) metabolic changes and defense system induction showed stress-specific response profiles; and (3) fish may be unable to set up an efficient adaptive response when chemical and thermal stresses were combined, with adverse outcomes at the individual level.

The use of combined metabolomic and biochemical approaches displayed a genuine interest to evaluate the response of organism to complex environmental stress. Our findings indicated at least three mechanisms of interaction which may explain the increased toxicity of pesticide with temperature rising. These mechanisms may result from each other or not:

- Inhibition of endocrine response to successive stress, preventing the induction of an appropriate stress response (Romero, 2004) ;
- Reciprocal inactivation of defense systems by thermal and chemical stress (Lapointe et al., 2011);

- Disruption of the function of the electron transport system (ETS) and/or mitochondrial density decrease (Lannig et al., 2006; Lavergne et al., 2015; Sokolova and Lannig, 2008).

Insofar as aquatic systems and organisms are submitted to physical, chemical and biological stresses, our study underlines the difficulty to predict the adverse effect of environmental contaminations on fish in a global changing world. Temperature rising increased the sensitivity of fish to a mixture of herbicide and fungicides at environmental concentrations. Inversely, pesticides mixture may compromise the adaptive response of fish to temperature changes. Consequently, the adverse effect of environmental contamination by herbicides and fungicides on wild fish could be widely underestimated.

References

- Anderson, P.E., Mahle, D.A., Doom, T.E., Reo, N. V., DelRaso, N.J., Raymer, M.L., 2010. Dynamic adaptive binning: an improved quantification technique for NMR spectroscopic data. *Metabolomics* 7, 179–190. doi:10.1007/s11306-010-0242-7
- Ankley, G.T., Kahl, M.D., Jensen, K.M., Hornung, M.W., Korte, J.J., Makynen, E.A., Leino, R.L., 2002. Evaluation of the Aromatase Inhibitor Fadrozole in a Short-Term Reproduction Assay with the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol. Sci.* 67, 121–130. doi:10.1093/toxsci/67.1.121
- Arnold, H., Pluta, H.-J., Braunbeck, T., 1995. Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton in vivo: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 33, 17–43. doi:10.1016/0166-445X(95)00006-P
- Auperin, B., Geslin, M., 2008. Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. *Gen. Comp. Endocrinol.* 158, 234–239. doi:10.1016/j.ygcen.2008.07.002
- Babo, S., Vasseur, P., 1992. In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 22, 61–68. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0166-445X(92)90036-M
- Bacchetta, C., Rossi, A., Ale, A., Campana, M., Parma, M.J., Cazenave, J., 2014. Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach. *Ecol. Indic.* 36, 532–538. doi:10.1016/j.ecolind.2013.09.016
- Barton, B.A., 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integr. Comp. Biol.* 42, 517–525. doi:10.1093/icb/42.3.517
- Baudiffier, D., 2012. Modes de perturbation de la stéroïdogenèse testiculaire et de la spermatogenèse chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) par des fongicides azolés. Université Rennes 1.
- Beckwith-Hall, B.M., Brindle, J.T., Barton, R.H., Coen, M., Holmes, E., Nicholson, J.K., Antti, H., 2002. Application of orthogonal signal correction to minimise the effects of physical and biological variation in high resolution 1H NMR spectra of biofluids. *Analyst* 127, 1283–1288. doi:10.1039/b205128c
- Biagiante-Risbourg, S., Bastide, J., 1995. Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an ultrastructural study. *Aquat. Toxicol.* 31, 217–229. doi:10.1016/0166-445X(94)00065-x
- Bisson, M., Hontela, A., 2002. Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 180, 110–117. doi:10.1006/taap.2002.9377
- Blahová, J., Plhalová, L., Hostovský, M., Divišová, L., Dobšíková, R., Mikulíková, I., Štěpánová, S., Svobodová, Z., 2013. Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine. *Food Chem. Toxicol.* 61, 82–85. doi:10.1016/j.fct.2013.02.041
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Calow, P., 1991. Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 100, 3–6. doi:10.1016/0742-8413(91)90110-F
- Cannon, W.B., 1932. *The wisdom of the body*, W.W. Norton, ed. New York.
- Cannon, W.B., 1916. *Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Research Into the Function of Emotional Excitement*. Appleton, D.
- Cech, J.J., Massingill, M.J., Vondracek, B., Linden, A.L., 1985. Respiratory metabolism of mosquitofish, *Gambusia affinis*: effects of temperature, dissolved oxygen, and sex difference. *Environ. Biol. Fishes* 13, 297–307. doi:10.1007/BF00002914
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Fagundes, M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Finco, J., da Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Anziliero, D., Barcellos, L.J.G., 2008. Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 148, 281–286. doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.008
- Cericato, L., Neto, J.G.M., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., da Rosa, J.G.S., Koakoski, G., Centenaro, L., Pottker, E., Marqueze, A., Barcellos, L.J.G., 2009. Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 149, 363–7. doi:10.1016/j.cbpc.2008.09.002
- Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y., 1995. Condition factor and hepatosomatic index as

- estimates of energy status in male three-spined stickleback. *J. Fish Biol.* 47, 775–787. doi:10.1111/j.1095-8649.1995.tb06002.x
- Cui, Y., Liu, B., Xie, J., Xu, P., Habte-Tsion, H.M., Zhang, Y., 2014. Effect of heat stress and recovery on viability, oxidative damage, and heat shock protein expression in hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Fish Physiol. Biochem.* 40, 721–729. doi:10.1007/s10695-013-9879-2
- DeBerardinis, R.J., Cheng, T., 2010. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29, 313–24. doi:10.1038/onc.2009.358
- Fernandez-Gomez, F.J., Galindo, M.F., Gómez-Lázaro, M., Yuste, V.J., Comella, J.X., Aguirre, N., Jordán, J., 2005. Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway. *Br. J. Pharmacol.* 144, 528–37. doi:10.1038/sj.bjp.0706069
- Fernandino, J.I., Hattori, R.S., Moreno Acosta, O.D., Strüssmann, C. a., Somoza, G.M., 2013. Environmental stress-induced testis differentiation: Androgen as a by-product of cortisol inactivation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 192, 36–44. doi:10.1016/j.ygcen.2013.05.024
- Ferrando, M.D., Andreu-Moliner, E., Almar, M.M., Cebrian, C., Nuñez, a., 1987. Acute toxicity of organochlorined pesticides to the European eel, *Anguilla anguilla*: The dependency on exposure time and temperature. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 365–369. doi:10.1007/BF01688297
- Ferreira, N.G.C., Morgado, R., Santos, M.J.G., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2015. Biomarkers and energy reserves in the isopod *Porcellionides pruinosus*: The effects of long-term exposure to dimethoate. *Sci. Total Environ.* 502, 91–102. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.08.062
- Fry, F., 1947. Effects of the environment on animal activity. Univ. of Toronto Press, Toronto.
- Gagné, F., Blaise, C., André, C., Pellerin, J., 2007. Implication of site quality on mitochondrial electron transport activity and its interaction with temperature in feral *Mya arenaria* clams from the Saguenay Fjord. *Environ. Res.* 103, 238–246. doi:10.1016/j.envres.2006.05.006
- Gagné, F., Blaise, C., André, C., Salazar, M., 2006. Effects of pharmaceutical products and municipal wastewaters on temperature-dependent mitochondrial electron transport activity in *Elliptio complanata* mussels. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 143, 388–393. doi:10.1016/j.cbpc.2006.04.013
- Gandar, A., Jean, S., Canal, J., Marty-Gasset, N., Gilbert, F., Laffaille, P., 2015. Multistress effects on behavior and physiology of *Carassius auratus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 3, 3323–3331. doi:10.1007/s12192-010-0223-9
- Gluth, G., Hanke, W., 1984. A comparison of physiological changes in Carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sublethal concentration - II. The dependency on the temperature. *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 79, 39–45. doi:10.1016/0742-8413(84)90160-9
- Gorbi, S., Baldini, C., Regoli, F., 2005. Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (*Anguillidae*) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (*Mugilidae*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 62–70. doi:10.1007/s00244-004-0150-9
- Gregory, T.R., Wood, C.M., 2010. The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiol. Biochem. Zool.* 72, 286–95. doi:10.1086/316673
- Guardiola, F.A., González-Párraga, P., Meseguer, J., Cuesta, A., Esteban, M.A., 2014. Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 36, 120–9. doi:10.1016/j.fsi.2013.10.020
- Guilherme, S., Gaivão, I., Santos, M.A., Pacheco, M., 2012. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 743, 1–9. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.10.017
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130–7139.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., others, 1999. Free radicals in biology and medicine. Oxford university press Oxford.
- Handy, R.D., Sims, D.W., Giles, a., Campbell, H. a., Musonda, M.M., 1999. Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper. *Aquat. Toxicol.* 47, 23–41. doi:10.1016/S0166-445X(99)00004-1
- Hashim, E.F., Zaki, M.S., 2005. Assessment of the hazardous effect of fungicide Dithane on *Clarias lazera* (catfish) including haematological, biochemical, and immunological parameters. *Arab Univ. J. Agric. Sci.* 13, 1005–1018.
- Hayes, T.B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjuoa, Y., Parker, J., Tsui, M., 2006. Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact? *Environ. Health Perspect.* 114, 40–50. doi:10.1289/ehp.8051
- Hinfray, N., Baudiffier, D., Leal, M.C., Porcher, J.-M., Aït-Aïssa, S., Le Gac, F., Schulz, R.W., Brion, F., 2011. Characterization of testicular expression of P450 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole. *Gen. Comp. Endocrinol.* 174, 309–317. doi:10.1016/j.ygcen.2011.09.008
- Holmstrup, M., Bindesbøl, A.M., Oostingh, G.J., Duschl, A., Scheil, V., Köhler, H.R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., Ferreira, A.L.G., Kienle, C., Gerhardt, A., Laskowski, R., Kramarz, P.E., Bayley, M., Svendsen, C., Spurgeon, D.J., 2010. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. *Sci. Total Environ.* 408, 3746–3762. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.10.067
- Hontela, A., 1997. Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticosteroid hormones.

- Rev. Toxicol. 1, 1–46.
- Islas-Flores, H., Gómez-Oliván, L.M., Galar-Martínez, M., Colín-Cruz, A., Neri-Cruz, N., García-Medina, S., 2013. Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92, 32–38. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.01.025
- Jeffrey, J.D., Gollock, M.J., Gilmour, K.M., 2014. Social stress modulates the cortisol response to an acute stressor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 196, 8–16. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2013.11.010
- Jin, Y., Zhang, X., Shu, L., Chen, L., Sun, L., Qian, H., Liu, W., Fu, Z., 2010. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 78, 846–852. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.044
- Jorgensen, C.B., 1988. Metabolic costs of growth and maintenance in the toad, *Bufo bufo*. *J. Exp. Biol.* 138, 319–331.
- Kennedy, C.J., Ross, P.S., 2012. Stress syndromes: Heightened bioenergetic costs associated with contaminant exposure at warm temperatures in teleosts. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 8, 202–204. doi:10.1002/ieam.1261
- Kinnberg, K., Holbech, H., Petersen, G.I., Bjerregaard, P., 2007. Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*). *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 145, 165–70. doi:10.1016/j.cbpc.2006.11.002
- Koakoski, G., Quevedo, R.M., Ferreira, D., Oliveira, T.A., da Rosa, J.G.S., de Abreu, M.S., Gusso, D., Marqueze, A., Kreutz, L.C., Giacomini, A.C.V., Fagundes, M., Barcellos, L.J.G., 2014. Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish. *Chemosphere* 112, 85–91. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.083
- Kumar, P., Prasad, Y., Patra, A.K., Ranjan, R., Swarup, D., Patra, R.C., Pal, S., 2009. Ascorbic acid, garlic extract and taurine alleviate cadmium-induced oxidative stress in freshwater catfish (*Clarias batrachus*). *Sci. Total Environ.* 407, 5024–5030. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.05.030
- Lannig, G., Cherkasov, A.S., Sokolova, I.M., 2006. Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*). *Mar. Environ. Res.* 62, 79–82. doi:10.1016/j.marenvres.2006.04.010
- Lapointe, D., Pierron, F., Couture, P., 2011. Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Aquat. Toxicol.* 104, 80–85. doi:10.1016/j.aquatox.2011.02.022
- Lavergne, E., Pedron, N., Calves, I., Claireaux, G., Mazurais, D., Zambonino-Infante, J., Le Bayon, N., Cahu, C., Laroche, J., 2015. Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance? *Mar. Pollut. Bull.* 95, 658–64. doi:10.1016/j.marpolbul.2015.01.006
- Lemly, A.D., 1996. Winter stress syndrome: an important consideration for hazard assessment of aquatic pollutants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 34, 223–227. doi:10.1006/eesa.1996.0067
- Li, M., Wang, J., Lu, Z., Wei, D., Yang, M., Kong, L., 2014. NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*). *Aquat. Toxicol.* 146, 82–92. doi:10.1016/j.aquatox.2013.10.024
- Lin, C.Y., Wu, H., Tjeerdema, R.S., Viant, M.R., 2007. Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics. *Metabolomics* 3, 55–67. doi:10.1007/s11306-006-0043-1
- López-Olmeda, J.F., Sánchez-Vázquez, F.J., 2011. Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*). *J. Therm. Biol.* 36, 91–104. doi:10.1016/j.jtherbio.2010.12.005
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 101, 13–30. doi:10.1016/j.aquatox.2010.10.006
- Lushchak, V.I., Lushchak, L.P., Mota, A.A., Hermes-Lima, M., 2001. Oxidative stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and reoxygenation. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 280, R100–R107.
- Lyytikäinen, T., Pylkkö, P., Ritola, O., Lindström-Seppä, P., 2002. The effect of acute stress and temperature on plasma cortisol and ion concentrations and growth of Lake Inari Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Environ. Biol. Fishes* 64, 195–202. doi:10.1023/A:1016017822700
- Madeira, D., Narciso, L., Cabral, H., 2013. Influence of temperature in thermal and oxidative stress responses in estuarine fish. ... *Physiol. Part A ...* 166, 237–243. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.06.008
- Malek, R.L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M.A., Gerhard, G.S., 2004. The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 138, 363–73. doi:10.1016/j.cca.2004.08.014
- Maltby, L., Brock, T.C.M., van den Brink, P.J., 2009. Fungicide Risk Assessment for Aquatic Ecosystems: Importance of Interspecific Variation, Toxic Mode of Action, and Exposure Regime. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7556–7563. doi:10.1021/es901461c
- Manciocco, A., Calamandrei, G., Alleva, E., 2014. Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms: The need of the etho-toxicology approach. *Chemosphere* 100, 1–7. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.12.072
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.-T., Laroche, J., 2004. Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70, 327–343. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.10.001
- McBride, J.R., Dye, H.M., Donaldson, E.M., 1981. Stress response of Juvenile Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) to the butoxyethanol ester of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27–27, 877–884. doi:10.1007/BF01611111
- McCarty, R., 2010. Fight-or-Flight Response, in: *Encyclopedia of Stress*. Elsevier Inc., pp. 62–64.

- Mommsen, T., Vijayan, M., Moon, T., 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Rev. Fish Biol. Fish.* 9, 211–268. doi:10.1023/a:1008924418720
- Moon, T.W., Johnston, I. a., 1980. Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*. *J. Comp. Physiol. B* 136, 31–38. doi:10.1007/BF00688619
- Nascimento, C.R.B., Souza, M.M., Martinez, C.B.R., 2012. Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 155, 456–61. doi:10.1016/j.cbpc.2011.12.002
- Newsholme, P., Procopio, J., Lima, M.M.R., Pithon-Curi, T.C., Curi, R., 2003. Glutamine and glutamate—their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem. Funct.* 21, 1–9.
- Norris, D.O., 1997. The mammalian adrenal glands and Comparative aspects of vertebrate adrenals: Cortical and chromaffin cells, in: Norris, D.O. (Ed.), *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press, New York, pp. 299–355.
- Noyes, P.D., McElwee, M.K., Miller, H.D., Clark, B.W., Van Tiem, L. a., Walcott, K.C., Erwin, K.N., Levin, E.D., 2009. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ. Int.* 35, 971–986. doi:10.1016/j.envint.2009.02.006
- Nwani, C.D., Nagpure, N.S., Kumar, R., Kushwaha, B., Lakra, W.S., 2013. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 36, 539–547. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.001
- Ohlsson, A., Ullerås, E., Oskarsson, A., 2009. A biphasic effect of the fungicide prochloraz on aldosterone, but not cortisol, secretion in human adrenal H295R cells—underlying mechanisms. *Toxicol. Lett.* 191, 174–80. doi:10.1016/j.toxlet.2009.08.020
- Osterauer, R., Köhler, H.R., 2008. Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 86, 485–494. doi:10.1016/j.aquatox.2007.12.013
- Pankhurst, N.W., Van Der Kraak, G., 2011. Effect of stress on reproduction and growth of fish, in: Iwama, G.K., Pickering, A.D., Sumpter, J.P., Schreck, C.B. (Eds.), *Fish Stress and Health in Aquaculture*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 73–93.
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A., 1986. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. *Anal. Biochem.* 154, 536–541. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(86)90026-6
- Regoli, F., Giuliani, M.E., 2014. Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms. *Mar. Environ. Res.* 93, 106–117. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2013.07.006
- Regoli, F., Giuliani, M.E., Benedetti, M., Arukwe, A., 2011. Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues. *Aquat. Toxicol.* 105, 56–66. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.014
- Rohr, J.R., Palmer, B.D., 2013. Climate change, multiple stressors, and the decline of ectotherms. *Conserv. Biol.* 27, 741–751. doi:10.1111/cobi.12086
- Romero, L.M., 2010. Fight or Flight responses, *Encyclopedia of Animal Behavior*. Elsevier. doi:10.1016/B978-0-08-045337-8.00261-8
- Romero, L.M., 2004. Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research. *Trends Ecol. Evol.* 19, 249–255. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2004.03.008
- Rosemberg, D.B., da Rocha, R.F., Rico, E.P., Zanotto-Filho, A., Dias, R.D., Bogo, M.R., Bonan, C.D., Moreira, J.C.F., Klamt, F., Souza, D.O., 2010. Taurine prevents enhancement of acetylcholinesterase activity induced by acute ethanol exposure and decreases the level of markers of oxidative stress in zebrafish brain. *Neuroscience* 171, 683–92. doi:10.1016/j.neuroscience.2010.09.030
- Sappal, R., MacDougald, M., Fast, M., Stevens, D., Kibenge, F., Siah, A., Kamunde, C., 2015. Alterations in mitochondrial electron transport system activity in response to warm acclimation, hypoxia-reoxygenation and copper in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquat. Toxicol.* 165, 51–63. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.05.014
- Schiedek, D., Sundelin, B., Readman, J.W., Macdonald, R.W., 2007. Interactions between climate change and contaminants. *Mar. Pollut. Bull.* 54, 1845–1856. doi:10.1016/j.marpolbul.2007.09.020
- Schmidlin, L., von Fumetti, S., Nagel, P., 2015. Copper sulphate reduces the metabolic activity of *Gammarus fossarum* in laboratory and field experiments. *Aquat. Toxicol.* 161, 138–145. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.005
- Selye, H., 1950. Stress and the General Adaptation Syndrome. *BMJ* 1, 1383–1392. doi:10.1136/bmj.1.4667.1383
- Selye, H., 1946. The General Adaptation Syndrome and the disease of adaptation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 6, 117–230.
- Sherwood, G.D., Rasmussen, J.B., Rowan, D.J., Brodeur, J., Hontela, A., 2000. Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (¹³⁷Cs) technique. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57, 441–450. doi:10.1139/cjfas-57-2-441
- Sinhorin, V.D.G., Sinhorin, A.P., Teixeira, J.M. dos S., Miléski, K.M.L., Hansen, P.C., Moreira, P.S.A., Kawashita, N.H., Baviera, A.M., Loro, V.L., 2014. Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 181–7. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.04.040
- Slaninová, A., Smutna, M., Modra, H., Svobodová, Z., 2009. A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinol. Lett.* 30, 2–12. doi:NEL300709R01 [pii]
- Sloman, K.A., Montpetit, C.J., Gilmour, K.M., 2002. Modulation of catecholamine release and cortisol secretion by social

- interactions in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 127, 136–146. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0016-6480\(02\)00033-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-6480(02)00033-3)
- Smilde, A.K., Jansen, J.J., Hoefsloot, H.C.J., Lamers, R.-J.A.N., van der Greef, J., Timmerman, M.E., 2005. ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): a new tool for analyzing designed metabolomics data. *Bioinformatics* 21, 3043–8. doi:[10.1093/bioinformatics/bti476](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bti476)
- Smith, R.A.J., Hartley, R.C., Cochemé, H.M., Murphy, M.P., 2012. Mitochondrial pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 33, 341–52. doi:[10.1016/j.tips.2012.03.010](https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.03.010)
- Smith, R.W., Blaney, S.C., Dowling, K., Sturm, A., Jönsson, M., Houlihan, D.F., 2001. Protein synthesis costs could account for the tissue-specific effects of sub-lethal copper on protein synthesis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 53, 265–277. doi:[10.1016/S0166-445X\(01\)00171-0](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(01)00171-0)
- Smolders, R., Coen, W. De, Blust, R., 2005. Integrative measures of toxicant exposure in zebra fish (*Danio rerio*) at different levels of biological organization, in: Ostrander, G.K. (Ed.), *Techniques in Aquatic Toxicology - Volume 2*. pp. 5–7.
- Sokolova, I.M., 2013. Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors. *Integr. Comp. Biol.* doi:[10.1093/icb/ict028](https://doi.org/10.1093/icb/ict028)
- Sokolova, I.M., Frederich, M., Bagwe, R., Lannig, G., Sukhotin, A. a., 2012. Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates. *Mar. Environ. Res.* 79, 1–15. doi:[10.1016/j.marenvres.2012.04.003](https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2012.04.003)
- Sokolova, I.M., Lannig, G., 2008. Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change. *Clim. Res.* 37, 181–201. doi:[10.3354/cr00764](https://doi.org/10.3354/cr00764)
- Solomon, K.R., Carr, J.A., Preez, L.H. Du, Giesy, J.P., Kendall, R.J., Smith, E.E., Kraak, G.J. Van Der, 2008. Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review. *Crit. Rev. Toxicol.* 38.
- Solomon, K.R., Dalhoff, K., Volz, D., Van Der Kraak, G., 2013. Effect of herbicides on fish, in: Tierney, K.B., Farrell, A., Brauner, C.J. (Eds.), *Organic Chemical Toxicology of Fishes. Fish Physiology: Volume 33*. pp. 369–409.
- Soso, A.B., Barcellos, L.J.G., Ranzani-Paiva, M.J., Kreutz, L.C., Quevedo, R.M., Anziliero, D., Lima, M., Silva, L.B. da, Ritter, F., Bedin, A.C., Finco, J.A., 2007. Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 23, 308–313. doi:[10.1016/j.etap.2006.11.008](https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.11.008)
- Stara, A., Machova, J., Velisek, J., 2012. Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 33, 334–43. doi:[10.1016/j.etap.2011.12.019](https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.019)
- Strobel, A., Leo, E., Pörtner, H.O., Mark, F.C., 2013. Elevated temperature and pco2 shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of *notothenia rossii*. *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.* 166, 48–57. doi:[10.1016/j.cbpb.2013.06.006](https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2013.06.006)
- Tierney, K.B., Taylor, A.L., Ross, P.S., Kennedy, C.J., 2006. The alarm reaction of coho salmon parr is impaired by the carbamate fungicide IPBC. *Aquat. Toxicol.* 79, 149–57. doi:[10.1016/j.aquatox.2006.06.003](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.06.003)
- Trudel, M., Goto, D., Wallace, W.G., 2010. Bioenergetic responses of a benthic forage fish (*Fundulus heteroclitus*) to habitat degradation and altered prey community in polluted salt marshes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 67, 1566–1584. doi:[10.1139/F10-082](https://doi.org/10.1139/F10-082)
- Ulrich, E.L., Akutsu, H., Dorelejers, J.F., Harano, Y., Ioannidis, Y.E., Lin, J., Livny, M., Mading, S., Maziuk, D., Miller, Z., Nakatani, E., Schulte, C.F., Tolmie, D.E., Kent Wenger, R., Yao, H., Markley, J.L., 2008. BioMagResBank. *Nucleic Acids Res.* 36, D402–8. doi:[10.1093/nar/gkm957](https://doi.org/10.1093/nar/gkm957)
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M., Press, A.I.N., Press, A.I.N., 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Environ. Chem.* 64, 178–189. doi:[10.1016/j.ecoenv.2005.03.013](https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.03.013)
- Van Der Kraak, G.J., Hosmer, A.J., Hanson, M.L., Kloas, W., Solomon, K.R., 2014. Effects of Atrazine in Fish, Amphibians, and Reptiles: An Analysis Based on Quantitative Weight of Evidence, *Critical Reviews in Toxicology*. doi:[10.3109/10408444.2014.967836](https://doi.org/10.3109/10408444.2014.967836)
- Viant, M.R., Werner, I., Rosenblum, E.S., Gantner, a. S., Tjeerdema, R.S., Johnson, M.L., 2003. Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature. *Fish Physiol. Biochem.* 29, 159–171. doi:[10.1023/B:FISH.0000035938.92027.81](https://doi.org/10.1023/B:FISH.0000035938.92027.81)
- Waring, C.P., Moore, A., 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. *Aquat. Toxicol.* 66, 93–104. doi:[10.1016/j.aquatox.2003.09.001](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2003.09.001)
- Wishart, D.S., Tzur, D., Knox, C., Eisner, R., Guo, A.C., Young, N., Cheng, D., Jewell, K., Arndt, D., Sawhney, S., Fung, C., Nikolai, L., Lewis, M., Coutouly, M.-A., Forsythe, I., Tang, P., Shrivastava, S., Jeroncic, K., Stothard, P., Amegbey, G., Block, D., Hau, D.D., Wagner, J., Miniaci, J., Clements, M., Gebremedhin, M., Guo, N., Zhang, Y., Duggan, G.E., Macinnis, G.D., Weljie, A.M., Dowlatabadi, R., Bamforth, F., Clive, D., Greiner, R., Li, L., Marrie, T., Sykes, B.D., Vogel, H.J., Querengesser, L., 2007. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res.* 35, D521–6. doi:[10.1093/nar/gkl923](https://doi.org/10.1093/nar/gkl923)
- Wu, H., Southam, A.D., Hines, A., Viant, M.R., 2008. High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics. *Anal. Biochem.* 372, 204–212. doi:[10.1016/j.ab.2007.10.002](https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.10.002)
- Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., Wang, X., 2012. Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pestic. Biochem. Physiol.* 103, 74–80. doi:[10.1016/j.pestbp.2012.03.007](https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.03.007)
- Xu, H.-D., Wang, J.-S., Li, M.-H., Liu, Y., Chen, T., Jia, A.-Q., 2015. 1H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius*

auratus). *Aquat. Toxicol.* 159, 69–80.
doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.020

Yin, F., Sun, P., Peng, S., Tang, B., Zhang, D., Wang, C., Mu, C., Shi, Z., 2013. The respiration, excretion and biochemical response of the juvenile common chinese cuttlefish, *Sepiella maindroni* at different temperatures. *Aquaculture* 402-403, 127–132.
doi:10.1016/j.aquaculture.2013.03.018

Zheng, J.-L., Luo, Z., Liu, C.-X., Chen, Q.-L., Tan, X.-Y., Zhu, Q., Gong, Y., 2013. Differential effects of acute and chronic zinc (Zn) exposure on hepatic lipid deposition and metabolism in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. *Aquat. Toxicol.* 132-133, 173–181.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.02.002

Additional File: Table 1. Mean \pm SD of metabolic and physiological responses to pesticide exposure and/or temperature rising.

Time	Parameters	CONTROL	PEST	TEMP	PEST*TEMP
T6h	Cortisol	41,33 \pm 29,80	90,12 \pm 59,37	95,99 \pm 69,83	85,83 \pm 56,56
	Liver carbohydrates	2,61 \pm 0,68	3,42 \pm 0,83	2,89 \pm 0,76	3,22 \pm 0,87
	Liver proteins	1,24 \pm 0,27	1,48 \pm 0,09	1,56 \pm 0,25	1,31 \pm 0,32
	Liver lipids	10,15 \pm 3,58	7,30 \pm 2,41	8,86 \pm 4,95	8,92 \pm 4,71
	Liver AE	14,23 \pm 3,59	12,61 \pm 2,18	14,07 \pm 4,27	14,16 \pm 4,39
	Liver EC	8,46 \pm 2,99	10,8 \pm 2,50	15,6 \pm 6,78	10,56 \pm 4,55
	Liver CEA	1,75 \pm 0,87	1,23 \pm 0,61	1,38 \pm 1,33	1,41 \pm 0,89
	Muscle carbohydrates	0,18 \pm 0,07	0,22 \pm 0,07	0,17 \pm 0,05	0,19 \pm 0,06
	Muscle proteins	3,58 \pm 0,99	3,10 \pm 1,04	3,51 \pm 0,86	3,02 \pm 1,28
	Muscle lipids	6,54 \pm 2,21	7,47 \pm 3,73	5,14 \pm 1,26	6,99 \pm 2,97
	Muscle AE	10,30 \pm 1,66	9,89 \pm 2,35	8,52 \pm 1,92	9,70 \pm 1,21
	Muscle EC	3,85 \pm 1,09	5,33 \pm 2,89	5,21 \pm 1,58	4,97 \pm 3,05
	Muscle CEA	2,85 \pm 0,65	2,28 \pm 1,00	1,73 \pm 0,42	2,73 \pm 1,24
	HSI	4,20 \pm 1,41	5,43 \pm 0,32	4,16 \pm 1,13	4,08 \pm 0,43
	MI	11,95 \pm 3,23	13,36 \pm 2,23	12,40 \pm 1,18	12,48 \pm 2,47
FCF	1,76 \pm 0,22	1,87 \pm 0,24	1,85 \pm 0,22	1,84 \pm 0,22	
T96h	Cortisol	96,48 \pm 56,01	138,1 \pm 81,86	106,72 \pm 58,74	140,28 \pm 110,12
	Liver carbohydrates	3,76 \pm 1,81	2,63 \pm 1,37	2,89 \pm 1,00	3,45 \pm 1,64
	Liver proteins	1,63 \pm 0,46	1,44 \pm 0,24	1,58 \pm 0,32	1,75 \pm 0,42
	Liver lipids	7,05 \pm 6,46	4,95 \pm 3,11	8,22 \pm 4,10	7,66 \pm 3,11
	Liver AE	12,45 \pm 6,91	9,03 \pm 3,79	13,02 \pm 3,68	12,87 \pm 3,96
	Liver EC	8,32 \pm 5,04	8,51 \pm 3,75	9,66 \pm 6,10	10,11 \pm 6,16
	Liver CEA	1,98 \pm 1,32	1,28 \pm 0,68	1,76 \pm 1,31	1,53 \pm 0,67
	Muscle carbohydrates	0,20 \pm 0,09	0,22 \pm 0,12	0,24 \pm 0,10	0,20 \pm 0,07
	Muscle proteins	3,08 \pm 0,89	2,42 \pm 1,18	2,57 \pm 1,45	2,99 \pm 1,01
	Muscle lipids	5,88 \pm 2,22	7,99 \pm 2,77	5,05 \pm 1,25	5,94 \pm 2,83
	Muscle AE	9,18 \pm 1,94	10,6 \pm 2,82	7,87 \pm 2,05	9,14 \pm 2,61
	Muscle EC	7,05 \pm 4,16	6,42 \pm 3,61	3,91 \pm 2,10	5,81 \pm 3,81
	Muscle CEA	1,91 \pm 1,32	2,22 \pm 1,25	2,40 \pm 1,04	2,01 \pm 0,90
	HSI	4,31 \pm 0,67	4,39 \pm 0,55	3,83 \pm 0,89	4,13 \pm 0,61
	MI	13,42 \pm 2,43	12,67 \pm 3,27	12,81 \pm 1,51	14,61 \pm 2,24
FCF	1,97 \pm 0,21	2,02 \pm 0,22	1,98 \pm 0,20	1,88 \pm 0,09	
T16d	Cortisol	66,89 \pm 54,69	57,0 \pm 37,29	56,3 \pm 41,67	47,4 \pm 29,93
	Liver carbohydrates	1,83 \pm 0,77	2,79 \pm 0,98	1,85 \pm 0,95	2,28 \pm 0,82
	Liver proteins	1,80 \pm 0,36	2,00 \pm 0,40	1,95 \pm 0,42	1,85 \pm 0,58
	Liver lipids	7,52 \pm 6,61	9,88 \pm 4,57	6,22 \pm 2,86	9,04 \pm 10,9
	Liver AE	11,45 \pm 7,00	14,68 \pm 4,78	10,03 \pm 3,18	13,14 \pm 11,2
	Liver EC	6,92 \pm 5,52	7,56 \pm 4,44	6,52 \pm 2,95	9,18 \pm 6,73
	Liver CEA	2,38 \pm 1,60	2,87 \pm 1,91	1,95 \pm 1,50	1,88 \pm 0,82
	Muscle carbohydrates	0,16 \pm 0,09	0,18 \pm 0,08	0,19 \pm 0,08	0,16 \pm 0,07
	Muscle proteins	3,32 \pm 0,91	3,32 \pm 0,81	3,38 \pm 0,70	3,56 \pm 0,83
	Muscle lipids	6,58 \pm 2,28	8,92 \pm 5,64	7,65 \pm 2,94	10,3 \pm 4,35
	Muscle AE	10,07 \pm 1,81	12,43 \pm 5,81	11,23 \pm 3,22	14,07 \pm 4,55
	Muscle EC	4,41 \pm 2,81	6,64 \pm 3,03	3,54 \pm 2,55	3,71 \pm 1,98
	Muscle CEA	3,09 \pm 1,59	2,16 \pm 1,08	4,05 \pm 1,84	4,42 \pm 1,74
	HSI	2,29 \pm 0,33	2,71 \pm 0,46	2,49 \pm 0,46	2,78 \pm 0,39
	MI	15,29 \pm 1,64	18,04 \pm 2,54	16,48 \pm 4,98	19,85 \pm 4,76
FCF	2,04 \pm 0,22	2,07 \pm 0,16	1,99 \pm 0,30	1,91 \pm 0,26	

Abbreviations: AE: available energy; EC: energy consumed; CEA: cellular energy allocation; HSI: hepatosomatic index; MI: muscle index; FCF: Fulton's condition factor

CHAPITRE 6.

Synthèse générale et conclusion

1. SYNTHÈSE GÉNÉRALE

Les objectifs généraux de ce travail de thèse étaient d'évaluer la toxicité d'un mélange d'herbicides et de fongicides à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental sur une espèce modèle en toxicologie aquatique, le carassin doré (*Carassius auratus*), ainsi que les effets croisés du mélange de pesticides et de l'augmentation de la température.

Pour cela, des expérimentations en conditions contrôlées ont été réalisées, au cours desquelles les poissons ont été exposés à un mélange de six herbicides et d'un fongicide à deux températures différentes. Les effets sur les poissons ont été évalués de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle afin de comprendre les processus physiologiques mis en jeu et de prédire leur répercussions potentielles à des niveaux d'organisation biologiques plus élevés. Les pesticides du mélange sont parmi les plus utilisés dans le monde, mais également les plus fréquemment détectés dans les milieux aquatiques [179,180,196,409,485]. Les concentrations retrouvées dans les rivières varient d'un pays à l'autre, d'un bassin versant à un autre et dans une même rivière selon les conditions climatiques et hydrologiques. La concentration la plus faible du mélange ($8,4 \mu\text{g.L}^{-1}$) reflète des situations de fortes contaminations dans le bassin versant de la Save, situé dans le sud-ouest de la France [183]. La concentration la plus forte ($42 \mu\text{g.L}^{-1}$) est quant à elle réaliste à l'échelle mondiale [178,196,409]. Par exemple, si l'on considère uniquement l'atrazine (dont le principal métabolite, l'atrazine déséthyl, est utilisé dans le mélange), des concentrations jusqu'à $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ sont jugées représentatives des contaminations environnementales [6]. Même à des concentrations aussi élevées, la toxicité de ces molécules sur les vertébrés aquatiques est considérée comme faible, voire nulle [5,6,204]. Toutefois ces études se focalisent uniquement sur les effets individuels de quelques herbicides. Par ailleurs, les effets sublétaux sur les poissons de la grande majorité des herbicides et fongicides n'ont pas été évalués. Les études portant sur les effets des mélanges complexes rencontrés dans les milieux aquatiques sont également très rares.

Dans un premier temps, les réponses moléculaires, physiologiques et comportementales ont été évaluées chez le carassin doré exposé pendant 96h au mélange de pesticides aux deux concentrations (faible dose : $4,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ et forte dose : $42 \mu\text{g.L}^{-1}$) à deux températures différentes (22°C et 32°C). Ces analyses ont été présentées dans les chapitres 3 et 4. Ce travail de thèse montre qu'un mélange d'herbicides et de fongicides à des concentrations environnementales induit des effets moléculaires, métaboliques, physiologiques et comportementaux chez le carassin doré. L'utilisation combinée d'analyses de l'échelle moléculaire à l'individu permet de mettre en relation les réponses observées aux différents niveaux d'organisation biologique et d'étudier le mode d'action de ce mélange (Figure 41). L'analyse en protéomique montre que le cocktail de pesticides agit notamment sur le foie *via* l'induction d'un stress oxydant. Les pesticides, incluant les herbicides et les fongicides, sont connus pour être des

molécules pro-oxydantes bien que les mécanismes de production des espèces réactives de l'oxygène impliqués soient peu étudiés [60]. De manière générale, la surproduction de ROS par les pesticides peut être liée à une perturbation de la chaîne de transfert d'électron et/ou du métabolisme mitochondrial, des cycles redox, le métabolisme intracellulaire des pesticides, la photosensibilisation, l'inhibition des systèmes de défense antioxydants ou encore une activité anticholinergique [60]. L'analyse en protéomique montre que le mélange de pesticides augmente notamment l'expression de la protéine de choc thermique HSP60. Cette protéine est induite en réponse à l'augmentation de la production de ROS dans les mitochondries, ce qui suggère que le mélange de pesticide induit un stress oxydant dans les cellules hépatique en partie *via* la perturbation du fonctionnement des mitochondries [61].

L'exposition à la faible dose de pesticides à 22°C entraîne une réponse générale de stress impliquant l'induction de système de défense et de réparation et une stratégie métabolique de compensation [150] (Figure 41). Celle-ci passe par la transformation du foie en organe glucogène et cétoène. Cette réponse indique que l'exposition de poissons à une faible concentration de pesticides entraîne un coût énergétique important conduisant à l'épuisement des réserves énergétiques hépatiques en moins de 96h. Il faut toutefois noter que l'épuisement des réserves énergétiques est très vraisemblablement amplifié par le fait que les poissons sont à jeun. L'augmentation de la demande énergétique et l'épuisement des réserves énergétiques hépatiques est visible aux échelles supérieures où l'on observe une diminution des concentrations hépatique et musculaire en protéines ainsi qu'une diminution de l'indice hépatique. De plus, la diminution du comportement de remaniement sédimentaire, de l'activité générale et de l'indice gonadosomatique est cohérente avec une réponse métabolique de compensation de la demande énergétique induite par l'activation des systèmes de défenses. Elle indique la mise en place de compromis énergétique entre la maintenance et les processus non vitaux consommateurs d'énergie tels que l'activité et la reproduction [17,18,144,145,430].

L'exposition à la forte dose de pesticides à 22°C inhibe l'expression de certaines protéines de défense (Figure 41), ce qui suggère que les systèmes de défenses sont dépassés. En revanche, des effets importants sur le comportement ont été observés, incluant une diminution de l'activité générale, du remaniement sédimentaire, de la vitesse moyenne et de la distance parcourue au cours de l'exposition ainsi qu'une augmentation du comportement alimentaire. Du point de vue métabolique, peu de réponses ont été observées, et ce quel que soit le niveau d'organisation biologique étudié. Les changements comportementaux ne résultent donc probablement pas de compromis énergétiques à l'échelle de l'individu, mais plus vraisemblablement de la perturbation de l'intégrité structurelle et du fonctionnement des organes. L'analyse en protéomique a également permis de mettre en évidence des modifications importantes de l'expression de protéines impliquées dans la structure cellulaire et les processus de méthylation, indiquant une perturbation de l'intégrité structurelle et du fonctionnement

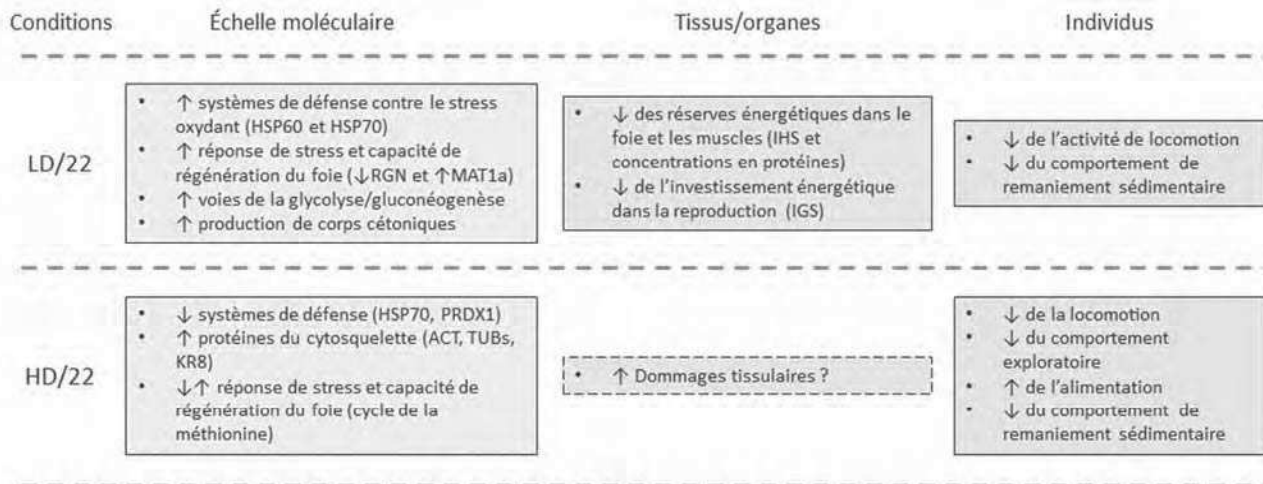


Figure 41. Mode d'action du mélange de pesticides à 22°C sur le carassin doré de l'échelle moléculaire jusqu'à l'individu : synthèse des résultats présentés dans les chapitres 3 et 4.

Les poissons sont exposés pendant 96h à un mélange de pesticides à deux concentrations : 4,8 µg.L⁻¹ (LD/22) et 42 µg.L⁻¹ (HD/22). La réponse moléculaire est évaluée dans le foie par protéomique 2D. La réponse métabolique est mesurée à l'échelle des organes (indices somatiques et concentration en protéines). Au niveau de l'individu, les effets du mélange sont évalués par des essais comportementaux incluant le suivi de l'activité de locomotion (temps de nage, vitesse, distance parcourue), de l'exploration (nombre de changement de direction) et l'alimentation. Flèches : ↑↓ régulation, ↑ augmentation, ↓ diminution. Abréviations : HSP : protéines de choc thermique, RGN : régucalcine, MAT1a : méthionine adénosyltransférase 1a, PRDX : périrédoxines, ACT : actine, TUB : tubulines, KR8 : kératine 8, IHS : indice hépatosomatique, IGS : indice gonadosomatique.

du foie [469,472,486–498]. Par ailleurs, Polard (2011 [183]) a montré que l'exposition du carassin commun (*Carassius carassius*) au même mélange et à la même concentration induisait des dommages à l'ADN au niveau des érythrocytes, indiquant un potentiel génotoxique de ce cocktail chez les poissons. Des dommages tissulaires ont également été mis en évidence chez des poissons exposés à des concentrations comparables d'atrazine, incluant les branchies [289,294–296], le foie [240,291] et le cerveau [285]. L'ensemble de ces résultats suggère un effet toxique du mélange de pesticides, lié à l'induction d'un stress oxydant, et conduisant à une perturbation du comportement des poissons.

L'effet de la température sur les poissons a largement été étudié, tant à l'échelle moléculaire que physiologique et individuelle [54,94,327,336]. Nos résultats sont cohérents avec ces études et montrent que l'augmentation de la température induit l'expression de systèmes de défense (i.e. protéines chaperonnes et antioxydantes), augmente l'activité générale des carassins (i.e. locomotion, exploration, alimentation), diminue le comportement de remaniement sédimentaire, augmente l'utilisation des réserves énergétiques hépatiques et musculaires et diminue l'investissement énergétique dans la reproduction (Figure 42). L'induction des systèmes de défenses contre le stress thermique et oxydant mise en évidence dans le foie par l'analyse en protéomique a un coût métabolique important [342], qui est supporté par l'utilisation des réserves énergétiques non protéiques du foie et les réserves protéiques musculaires, la production de corps cétoniques par le foie et potentiellement par des compromis énergétiques avec la reproduction. Par ailleurs, la diminution de l'oxygène dissous combinée à l'augmentation du besoin en oxygène pour le métabolisme aérobie peut entraîner une modification de

la position du poisson dans la colonne d'eau [94], ce qui pourrait expliquer la diminution du remaniement sédimentaire bien que l'activité générale augmente. La température modifie également la structure, l'organisation, le fonctionnement et le cycle de vie cellulaire. L'ensemble de ces réponses forme un schéma cohérent d'acclimatation à l'augmentation de la température.

Les résultats présentés dans les chapitres 3 et 4 montrent des effets croisés importants de l'exposition aux pesticides et de l'augmentation de la température, notamment sur l'induction des systèmes de défense, la régulation du cycle cellulaire et le métabolisme énergétique. L'analyse en protéomique a mis en évidence une augmentation du nombre de protéines régulées impliquées dans la défense contre le stress oxydant et le contrôle de l'apoptose par rapport aux effets individuels de la température et des pesticides, surtout à la concentration la plus forte. La diminution de l'actine, une protéine majeure du cytosquelette, à la forte concentration suggère également une perturbation du cytosquelette, et par conséquent de la structure cellulaire, sous l'effet du stress oxydant [454,469]. Ces résultats suggèrent une augmentation du stress oxydant sous l'effet combiné de l'augmentation de la température et de l'exposition aux pesticides. Si l'on regarde le métabolisme énergétique, l'analyse en protéomique, le dosage de la concentration en protéines dans les muscles et l'indice hépatosomatique montrent une diminution de l'utilisation des réserves énergétiques par rapport aux effets individuels de la température et/ou des mélanges de pesticides. Malgré l'absence de réponse métabolique, des effets importants sur le comportement ont été observés aux deux concentrations. La diminution de l'activité générale peut être liée à des dommages tissulaires et/ou à une perturbation du fonctionnement des organes.

Une autre hypothèse permet d'expliquer la diminution de l'activité et l'absence de réponse métabolique : le passage d'une stratégie de compensation métabolique à une stratégie de conservation [150,151]. Cette stratégie de conservation est caractérisée par l'induction de systèmes de défense ou de réparation des dommages, une diminution de la demande énergétique ainsi qu'une diminution de l'énergie disponible pour les activités non vitales. Elle permet à l'organisme de préserver ses réserves énergétiques jusqu'à ce que la source de stress ait disparu. Toutefois, cette stratégie n'est pas soutenable à long terme et entraîne des effets importants sur les performances, la fitness et finalement la survie des individus. Qu'elle fasse partie de la réponse générale de stress ou qu'elle soit la conséquence de la perturbation du fonctionnement de certains organes, la diminution de l'activité observée chez les carassins exposés au cocktail de pesticides est susceptible d'affecter la capacité des poissons à éviter la prédation, à se nourrir et à se reproduire, avec des conséquences potentielles sur leur fitness et par extension sur les communautés et les chaînes trophiques [196,436].

Conditions	Échelle moléculaire	Tissus/organes	Individus
CON/32	<ul style="list-style-type: none"> • ↓↑ défense contre le stress thermique et oxydant (↓HSP60, ↑HSP70, ↑PRDX1 et ↓PRDX2) • ↓↑ réponse de stress, capacité de régénération du foie et contrôle de l'apoptose (↓RGN, cycle de la méthionine, ↑15-PGDH) • ↓↑ métabolisme des carbohydrates, des acides aminés et production d'énergie • ↑ de la production de corps cétoniques • ↓↑ protéines du cytosquelette (↓TUBs, ↓KR8, ↑TPMs) 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ concentrations en protéines dans les muscles • ↓ de l'investissement énergétique dans la reproduction (IGS) 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ de la locomotion • ↑ de l'exploration • ↑ de l'alimentation • ↓ du comportement de remaniement sédimentaire
LD/32	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ système de défense contre le stress oxydant (HSP60) • ↓↑ réponse de stress et capacité de régénération du foie et contrôle de l'apoptose (↓ cycle de la méthionine, ↓ 15-PGDH, ↑ 14-3-3p) • ↓ de protéines impliquées dans les voies de la glycolyse/gluconéogenèse 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Dommages tissulaires ? 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ de l'activité de locomotion
HD/32	<ul style="list-style-type: none"> • ↓↑ système de défense contre le stress oxydant (↑ HSP60, ↑ GST, ↓PRDX1 et 6) • ↓↑ réponse de stress et contrôle de l'apoptose (↓ 15-PGDH, ↑ 14-3-3p) • ↓ de protéines impliquées dans les voies de la glycolyse/gluconéogenèse • ↓ de la production de corps cétoniques • ↓ protéines du cytosquelette (ACT) 	<ul style="list-style-type: none"> • ↑ Dommages tissulaires ? 	<ul style="list-style-type: none"> • ↓ de l'activité de locomotion • ↓ du comportement exploratoire

Figure 42. Effets croisés du mélange de pesticide et de l'augmentation de la température : synthèse des résultats présentés dans les chapitres 3 et 4.

Les poissons sont soumis à une augmentation de la température puis exposés pendant 96h à un mélange de pesticides selon trois conditions : $0 \mu\text{g.L}^{-1}$ (CON/32), $4,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ (LD/23) et $42 \mu\text{g.L}^{-1}$ (HD/23). Pour la condition CON/32, les résultats présentés correspondent aux effets de l'augmentation de la température par rapport au groupe contrôle à 22°C . Pour les conditions LD/32 et HD/32, les résultats correspondent aux effets de l'exposition aux pesticides par rapport à la condition CON/32. La réponse moléculaire est évaluée dans le foie par protéomique 2D. La réponse métabolique est mesurée à l'échelle des organes (indices somatiques et concentration en protéines). Au niveau de l'individu, les effets du mélange sont évalués par des essais comportementaux incluant le suivi de l'activité de locomotion (temps de nage, vitesse, distance parcourue), de l'exploration (nombre de changement de direction) et l'alimentation. Flèches : ↑↓ régulation, ↑ augmentation, ↓ diminution. Abréviations : HSP : protéines de choc thermique, RGN : régucalcine, MAT1a : méthionine adénosyltransférase 1a, PRDX : périrédoxines, ACT : actine, TUB : tubulines, KR8 : kératine 8, TPM : tropomyosines, 14-3-3p : protéine 14-3-3, IHS : indice hépatosomatique, IGS : indice gonadosomatique.

Selon cette théorie, l'exposition combinée à une augmentation de la température et à un cocktail de pesticides à des concentrations réalistes entraîne un coût énergétique qui dépasse les capacités métaboliques des poissons.

Cette conclusion doit toutefois être prise avec précaution dans la mesure où les poissons ne sont pas nourris pendant l'exposition aux pesticides. Kennedy et Ross (2012 [26]) ont montré que l'augmentation de la température amplifiait les effets d'une privation de nourriture de 12 semaines sur les réserves énergétiques, les indices somatiques et la croissance de saumons rouges juvéniles (*Oncorhynchus nerka*) et de *Ptychocheilus oregonensis* (i.e. poissons de la famille des cyprinidés). Cet effet était exacerbé

lorsque les poissons étaient également exposés au carbaryl (i.e. insecticide de la famille des carbamates). A l'inverse, aucun effet sur le statut métabolique n'a été observé lorsque les poissons ont été exposés à l'augmentation de température et au carbaryl tout en étant nourris. Ces résultats montrent que le coût énergétique de l'induction des systèmes de défense et/ou de réparation est compensé par une augmentation de l'alimentation. Les auteurs suggèrent toutefois que la dégradation des habitats, et notamment de la quantité et de la qualité des ressources alimentaires qu'ils contiennent, peut entraîner un effet combiné de stress thermique, chimique et alimentaire sur les organismes aquatiques, avec des conséquences importantes sur leur fitness et leur survie.

Bien que l'effet d'un jeûne de 7 jours sur le statut métabolique du carassin doré n'est pas été évalué dans ce travail de thèse, les résultats présentés dans les chapitres 3 et 4 montrent que l'augmentation de la température et l'exposition au cocktail de pesticides entraînent une augmentation de la demande énergétique et que la balance énergétique joue un rôle déterminant dans les effets croisés, que ce soit à l'échelle du protéome, des organes ou de l'individu. Afin de confirmer ces résultats, une évaluation de la réponse générale de stress a été réalisée sur 16 jours, les poissons étant cette fois nourris *ad libitum*.

La réponse générale de stress des carassins dorés a été évaluée en cinétique en se focalisant sur des traits en lien avec la régulation du métabolisme énergétique : la sécrétion de cortisol (i.e. une des hormones de stress dont le rôle principale est la mobilisation des ressources énergétiques), l'induction de systèmes de défense antioxydants, le statut métabolique aux échelles moléculaires, cellulaires et des organes et pour finir la condition générale des poissons. Dans un souci de réduire le nombre de poissons utilisés et de privilégier un nombre suffisant d'individus par groupes plutôt qu'un grand nombre de conditions, seule la forte concentration du cocktail de pesticides a été utilisée dans cette expérience. Cette étude, présentée dans le chapitre 5, a permis de confirmer le rôle important de la balance énergétique et, plus largement, de la réponse générale de stress dans les effets croisés sur les poissons de l'augmentation de la température et de l'exposition à un mélange de pesticides. Les résultats montrent que la réponse des poissons au stress dépend de la nature de celui-ci et varie dans le temps. Deux patterns généraux de réponses ont été observés : (1) une réponse précoce (T6h) coordonnée de l'échelle moléculaire à l'échelle tissulaire en cas de stress chimique et thermique individuels, et la disparition de la majorité des effets observés à T96h et T16 jours; et (2) une réponse précoce inhibée et des effets importants de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle à T16 jours lorsque les deux stress sont combinés. La diminution de la condition générale des poissons montre que la perturbation de la réponse générale de stress, incluant l'absence de mise en place d'une réponse métabolique de compensation, entraînent des conséquences importantes sur l'état de santé général des poissons.

Outre l'augmentation du stress oxydant lorsque les deux stress sont combinés, plusieurs mécanismes d'interaction possibles entre l'augmentation de la température et l'exposition à des contaminants ont été proposés dans la littérature :

- Inhibition de la réponse endocrinienne chez les organismes déjà stressés, empêchant l'organisme de mettre en place une réponse générale de stress appropriée lorsqu'ils sont soumis à un second facteur de stress [29] ;
- Inactivation réciproque des systèmes de défenses par les stress thermiques et chimiques [369] ;
- Perturbation du fonctionnement du système de transport d'électron (ETS) et/ou de la densité mitochondriale [368,370,499].

Quels que soient le ou les mécanismes d'interaction, ce travail de thèse montre que l'augmentation de la température sensibilise les poissons à la contamination de l'eau par les pesticides. Dans un monde soumis à des stress multiples et à des pressions anthropiques croissantes, la diminution de la capacité des poissons à s'acclimater aux changements de leur environnement pose de nombreuses questions quant à leur conservation dans les milieux naturels. Cette étude confirme également la difficulté d'évaluer les risques environnementaux des contaminants sans prendre en compte les effets des forçages climatiques.

2. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'évaluation des effets des stress multiples sur les organismes, incluant les effets cocktails et les effets croisés des polluants avec des stress physiques ou biologiques, est un challenge important en sciences environnementales. Au cours de ces travaux de thèse, l'évaluation des effets croisés sur le carassin doré d'un mélange d'herbicides et de fongicides à des concentrations réalistes et d'une augmentation de la température a été abordée à travers l'utilisation conjointe d'analyses moléculaires, biochimiques, indicielles et comportementales. Les techniques omiques comme la protéomique et la métabolomique permettent d'aborder les effets des stress multiples sans à priori sur les processus impliqués. Couplées à des analyses plus classiques (e.g. activités enzymatiques, réserves énergétiques...) et à des échelles d'organisation biologique plus élevées, elles ont permis de mettre en lumière différentes voies biologiques pouvant être impliquées dans la réponse des poissons aux mélanges de pesticides ainsi que les effets croisés avec l'augmentation de la température. Avec l'évolution des techniques d'analyse statistique permettant aujourd'hui d'intégrer les données issues de différentes approches omiques, l'utilisation conjointe de plusieurs d'entre elles telles que la protéomique en « shot-gun », plus sensible que la protéomique 2-D utilisée ici, la métabolomique ou encore la transcriptomique présenterait un véritable potentiel pour évaluer de manière plus fine les réponses des organismes soumis à des stress multiples. Par ailleurs, des approches moléculaires et cellulaires ciblées sur certaines des voies biologiques proposées dans ce travail, et notamment sur le fonctionnement des mitochondries et leur rôle dans les effets croisés température - pesticides, permettraient d'étudier les mécanismes mis en jeu.

L'analyse en protéomique a notamment permis de confirmer le rôle important du cycle de la méthionine dans la réponse des poissons aux mélanges d'herbicides [8,9]. Ce cycle participe à plusieurs processus cellulaires fondamentaux tels que la synthèse des acides nucléiques et des lipides membranaires, la méthylation des protéines et la défense contre le stress oxydant [463]. Il contribue au maintien des fonctions mitochondriales et joue un rôle important dans la régénération du foie et la protection contre le développement de cancers hépatiques [464,465]. Dans la mesure où la perturbation du cycle de la méthionine est suspecté de jouer un rôle important dans la toxicité de l'arsenic et du benzo(a)pyrène chez les poissons [496], des études plus approfondies sur les effets des mélanges d'herbicides et/ou fongicides sur le fonctionnement de ce cycle et la méthylation de l'ADN seraient nécessaires.

Le stress oxydant et/ou la perturbation de fonctionnement des mitochondries sont susceptibles de modifier le fonctionnement et le cycle de vie cellulaire, incluant l'induction des processus d'apoptose ou de nécrose [282]. Ces effets cellulaires peuvent à leur tour induire des dommages au niveau des tissus et

organes [283]. Dans la majorité des études sur les effets des herbicides ou des fongicides sur les poissons, l'analyse des systèmes de défense antioxydants indique l'induction d'un stress oxydant aux concentrations entraînant des dommages histopathologiques. Ces résultats vont dans le sens de dommages histologiques induits par le stress oxydant. Toutefois, à l'exception de quelques études sur l'atrazine [240,284,285,289], les publications portant sur les effets histopathologiques des herbicides et fongicides ne permettent pas de conclure sur la toxicité de ces molécules à des concentrations environnementales. Dans cette étude, des effets importants sur le foie des poissons exposés aux pesticides ont été observés, notamment au niveau de l'indice hépatosomatique ainsi que sur la régulation de protéines structurelles ou impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et le contrôle de l'apoptose. Certaines de ces protéines sont des marqueurs de dommages tissulaires [462,464,470,471]. Des analyses histopathologiques permettraient de déterminer si ces effets sont le signe de dommages histologiques causés par les pesticides [481,482], d'une augmentation des capacités de détoxification du foie [481,483] ou du piégeage des pesticides dans des vacuoles lipidiques [484]. Certaines de ces protéines sont également des marqueurs de cancérogenèse chez les rongeurs ou l'homme [465,472–477]. Malgré certaines différences physiologiques, les processus impliqués dans le fonctionnement cellulaire ont été extrêmement conservés au cours de l'évolution. De ce fait, les poissons sont de plus en plus utilisés comme modèles biologiques pour étudier le développement et la progression des cancers humains [500–502]. Bien que les études soient contradictoires, l'atrazine est considéré comme un cancérigène potentiel chez le poisson [503] et les mammifères [504]. A notre connaissance, le potentiel carcinogène de l'atrazine-déséthyl n'a pas été évalué. D'un autre côté, le S-métolachlore, le pendiméthaline, le tébuconazole et le linuron sont classés comme potentiellement cancérigène pour l'homme dans la liste de l'Agence de Protection Environnementale des Etats Unis. Des études à long terme et des analyses histologiques seraient nécessaires pour tester ces hypothèses.

Un autre aspect important des résultats présentés ici est la diminution de la sécrétion de cortisol chez les poissons exposés au mélange d'herbicides et de fongicides et soumis à un stress thermique. La perturbation endocrinienne de la synthèse des hormones stéroïdiennes, i.e. cortisol et/ou hormones sexuelles, peut avoir des conséquences importantes sur la fitness et la survie des poissons en affectant des traits physiologiques et comportements liés à l'adaptation au stress et à la reproduction [37]. L'effet indirect des herbicides et fongicides *via* l'inhibition de la réponse au stress pourraient être plus délétères pour la survie des poissons que les effets directs proprement dits [29]. Dans un objectif d'évaluation des risques pour l'environnement des pesticides, ces effets indirects devraient être pris en compte. Pour cela, la validation de ces observations doit être réalisée en expérimentant d'autres combinaisons de stress, par exemple en soumettant les poissons à des challenges bactériens, à un risque de prédation ou encore, dans un contexte de changements climatiques, à des changements physiques de l'environnement comme l'oxygénation ou le pH. Par ailleurs, des études *in situ*, par

exemple de « caging » ou de prélèvements effectués sur des espèces natives soumises à des gradients de pressions biotiques et abiotiques, permettraient d'évaluer les effets des stress multiples auxquels sont soumis les poissons dans leur milieu naturels. Bien que les résultats des études *in situ* soient souvent complexes à analyser, ces études permettraient de valider les résultats observés lors des expérimentations en conditions contrôlées. Elles permettraient également d'étudier le rôle de l'acclimatation et de l'adaptation locale des populations de poissons dans la résistance aux stress multiples [29,430].

Références

- [1] A. Lecerf, "Perturbations anthropiques et fonctionnement écologique des cours d'eau de tête de bassin ; Etude du processus de décomposition des litières," Toulouse III, France, 2005.
- [2] Commissariat Général au Développement Durable, "Bilan de présence de micropolluants dans les milieux aquatiques continentaux période 2007-2009," *Etudes Doc.*, 2011.
- [3] Commissariat Général au Développement Durable, "Contamination des cours d'eau par les pesticides en 2011," *Chiffres Stat.*, vol. 436, p. 7, 2013.
- [4] M. C. Celander, "Cocktail effects on biomarker responses in fish.," *Aquat. Toxicol.*, vol. 105, no. 3–4 Suppl, pp. 72–7, Oct. 2011.
- [5] K. R. Solomon, K. Dalhoff, D. Volz, and G. Van Der Kraak, "Effect of herbicides on fish," in *Organic Chemical Toxicology of Fishes. Fish Physiology: Volume 33*, K. B. Tierney, A. Farrell, and C. J. Brauner, Eds. 2013, pp. 369–409.
- [6] G. J. Van Der Kraak, A. J. Hosmer, M. L. Hanson, W. Kloas, and K. R. Solomon, "Effects of Atrazine in Fish, Amphibians, and Reptiles: An Analysis Based on Quantitative Weight of Evidence," *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 44, pp. 1–66, 2014.
- [7] T. Polard, S. Jean, L. Gauthier, C. Laplanche, G. Merlina, J. M. Sánchez-Pérez, and E. Pinelli, "Mutagenic impact on fish of runoff events in agricultural areas in south-west France," *Aquat. Toxicol.*, vol. 101, no. 1, pp. 126–134, 2011.
- [8] J. Marchand, A. Tanguy, G. Charrier, L. Quiniou, and J. Laroche, "Molecular Identification and Expression of Differentially Regulated Genes of the European Flounder , *Platichthys flesus* , Submitted to Pesticide Exposure," *Mar. Biotechnol.*, vol. 8, pp. 275–294, 2006.
- [9] E. Evrard, J. Marchand, M. Theron, K. Pichavant-Rafini, G. Durand, L. Quiniou, and J. Laroche, "Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*," *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 152, no. 3, pp. 321–331, 2010.
- [10] T. B. Hayes, P. Case, S. Chui, D. Chung, C. Haeffele, K. Haston, M. Lee, V. P. Mai, Y. Marjuoa, J. Parker, and M. Tsui, "Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: Are we underestimating the impact?," *Environ. Health Perspect.*, vol. 114, no. SUPPL.1, pp. 40–50, 2006.
- [11] K. F. Drinkwater, G. Beaugrand, M. Kaeriyama, S. Kim, G. Ottersen, R. I. Perry, H. O. Pörtner, J. J. Polovina, and A. Takasuka, "On the processes linking climate to ecosystem changes," *J. Mar. Syst.*, vol. 79, no. 3–4, pp. 374–388, 2010.
- [12] D. Schiedek, B. Sundelin, J. W. Readman, and R. W. Macdonald, "Interactions between climate change and contaminants," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 54, no. 12, pp. 1845–1856, 2007.
- [13] P. D. Noyes, M. K. McElwee, H. D. Miller, B. W. Clark, L. a. Van Tiem, K. C. Walcott, K. N. Erwin, and E. D. Levin, "The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world," *Environ. Int.*, vol. 35, no. 6, pp. 971–986, 2009.
- [14] M. Holmstrup, A. M. Bindesbøl, G. J. Oostingh, A. Duschl, V. Scheil, H. R. Köhler, S. Loureiro, A. M. V. M. Soares, A. L. G. Ferreira, C. Kienle, A. Gerhardt, R. Laskowski, P. E. Kramarz, M. Bayley, C. Svendsen, and D. J. Spurgeon, "Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review," *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 18, pp. 3746–3762, 2010.

- [15] M. Dossena, G. Yvon-Durocher, J. Grey, J. M. Montoya, D. M. Perkins, M. Trimmer, and G. Woodward, "Warming alters community size structure and ecosystem functioning," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 279, no. 1740, pp. 3011–3019, 2012.
- [16] B. Jalabert, J.-F. Baroiller, B. Breton, A. Fostier, F. Le Gac, Y. Guiguen, and G. Monod, "Main Neuro-Endocrine, Endocrine and Paracrine Regulations of Fish Reproduction, and Vulnerability to Xenobiotics," *Ecotoxicology*, vol. 9, no. 1–2, pp. 25–40, 2000.
- [17] B. A. Barton, "Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids," *Integr. Comp. Biol.*, vol. 42, no. 3, pp. 517–525, 2002.
- [18] H. Selye, "Stress and the General Adaptation Syndrome," *BMJ*, vol. 1, no. 4667, pp. 1383–1392, 1950.
- [19] W. B. Cannon, *The wisdom of the body*, W.W. Norton. New York, 1932.
- [20] R. McCarty, "Fight-or-Flight Response," in *Encyclopedia of Stress*, Elsevier Inc., 2010, pp. 62–64.
- [21] J. R. Rohr and B. D. Palmer, "Climate change, multiple stressors, and the decline of ectotherms," *Conserv. Biol.*, vol. 27, no. 4, pp. 741–751, 2013.
- [22] J. J. Cech, M. J. Massingill, B. Vondracek, and A. L. Linden, "Respiratory metabolism of mosquitofish, *Gambusia affinis*: effects of temperature, dissolved oxygen, and sex difference," *Environ. Biol. Fishes*, vol. 13, no. 4, pp. 297–307, 1985.
- [23] J. F. López-Olmeda and F. J. Sánchez-Vázquez, "Thermal biology of zebrafish (*Danio rerio*)," *J. Therm. Biol.*, vol. 36, no. 2, pp. 91–104, 2011.
- [24] A. Manciocco, G. Calamandrei, and E. Alleva, "Global warming and environmental contaminants in aquatic organisms: The need of the etho-toxicology approach," *Chemosphere*, vol. 100, no. 0, pp. 1–7, 2014.
- [25] A. D. Lemly, "Winter stress syndrome: an important consideration for hazard assessment of aquatic pollutants," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 34, no. 3, pp. 223–227, 1996.
- [26] C. J. Kennedy and P. S. Ross, "Stress syndromes: Heightened bioenergetic costs associated with contaminant exposure at warm temperatures in teleosts," *Integr. Environ. Assess. Manag.*, vol. 8, no. 1, pp. 202–204, 2012.
- [27] W. B. Cannon, *Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Research Into the Function of Emotional Excitement*. Appleton, D., 1916.
- [28] H. Selye, "The General Adaptation Syndrome and the disease of adaptation," *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 6, no. 2, pp. 117–230, 1946.
- [29] L. M. Romero, "Physiological stress in ecology: lessons from biomedical research," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 19, no. 5, pp. 249–255, 2004.
- [30] G. P. Chrousos, "Stressors, Stress, and Neuroendocrine Integration of the Adaptive Response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 851, no. 1, pp. 311–335, 1998.
- [31] J. Bruslé and J.-P. Quignard, *Les poissons et leur environnement : écophysiologie et comportements adaptatifs*, Editions T. Paris, 2004.

- [32] C. Bernard, *Introduction à l'étude de la médecine expérimentale*. Paris: J.B. Baillièrre et Fils, 1865.
- [33] C. Darwin, *The Expression of the Emotions in Man and Animals*, John Murra. Londre, 1872.
- [34] D. Harper, "Online Etymology Dictionary," 2015. [Online]. Available: <http://www.etymonline.com/>. [Accessed: 20-Aug-2015].
- [35] S. J. Haggbloom, J. E. Warnick, V. K. Jones, G. L. Yarbrough, T. M. Russell, C. M. Borecky, and R. McGahhey, "Study ranks the top 20th century psychologists," *Monit. Psychol.*, vol. 33, no. 7, p. 29, 2002.
- [36] E. Ottaviani and C. Franceschi, "The neuroimmunology of stress from invertebrates to man," *Prog. Neurobiol.*, vol. 48, no. 4–5, pp. 421–440, 1996.
- [37] T. Mommsen, M. Vijayan, and T. Moon, "Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation," *Rev. Fish Biol. Fish.*, vol. 9, no. 3, pp. 211–268, 1999.
- [38] D. O. Norris, "The mammalian adrenal glands and Comparative aspects of vertebrate adrenals: Cortical and chromaffin cells," in *Vertebrate Endocrinology*, D. O. Norris, Ed. New York: Academic Press, 1997, pp. 299–355.
- [39] A. Hontela, "Endocrine and physiological responses of fish to xenobiotics: Role of glucocorticosteroid hormones.," *Rev. Toxicol.*, vol. 1, pp. 1–46, 1997.
- [40] A. Hontela, "Adrenal toxicology: Environmental pollutants and the HPI axis," in *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, T. P. Mommsen and T. W. Moon, Eds. 2005, pp. 332–363.
- [41] R. M. Sapolsky, L. M. Romero, and A. U. Munck, "How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions," *Endocr. Rev.*, vol. 21, no. 1, pp. 55–89, 2000.
- [42] S. G. Reid, N. J. Bernier, and S. F. Perry, "The adrenergic stress response in fish: control of catecholamine storage and release," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, vol. 120, no. 1, pp. 1–27, 1998.
- [43] M. J. Leaver, A. Diab, E. Boukouvala, T. D. Williams, J. K. Chipman, C. F. Moffat, C. D. Robinson, and S. G. George, "Hepatic gene expression in flounder chronically exposed to multiply polluted estuarine sediment: Absence of classical exposure 'biomarker' signals and induction of inflammatory, innate immune and apoptotic pathways," *Aquat. Toxicol.*, vol. 96, no. 3, pp. 234–245, 2010.
- [44] A. D. Biales, D. C. Bencic, R. L. Flick, K. a. Blocksom, J. M. Lazorchak, and D. L. Lattier, "Proteomic analysis of a model fish species exposed to individual pesticides and a binary mixture," *Aquat. Toxicol.*, vol. 101, no. 1, pp. 196–206, 2011.
- [45] J. Dorts, P. Kestemont, M. Dieu, M. Raes, and F. Silvestre, "Proteomic response to sublethal cadmium exposure in a sentinel fish species, *Cottus gobio*," *J. Proteome Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 470–478, 2011.
- [46] L. M. Samuelsson, B. Björlnenius, L. Förlin, and D. G. J. Larsson, "Reproducible ¹H NMR-based metabolomic responses in fish exposed to different sewage effluents in two separate studies," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, no. 4, pp. 1703–1710, 2011.
- [47] A. Bermejo-Nogales, M. Nederlof, L. Benedito-Palos, G. F. Ballester-Lozano, O. Folkedal, R. E. Olsen, A. Sitjà-Bobadilla, and J. Pérez-Sánchez, "Metabolic and transcriptional responses of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to environmental stress: New insights in fish mitochondrial phenotyping," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 205, no. 1, pp. 305–315, 2014.

- [48] R. L. Malek, H. Sajadi, J. Abraham, M. A. Grundy, and G. S. Gerhard, "The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish.," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 138, no. 3, pp. 363–73, 2004.
- [49] G. Goldspink, "Adaptation of fish to different environmental temperature by qualitative and quantitative changes in gene expression," *J. Therm. Biol.*, vol. 20, no. 1–2, pp. 167–174, 1995.
- [50] A. Kullgren, F. Jutfelt, R. Fontanillas, K. Sundell, L. Samuelsson, K. Wiklander, P. Kling, W. Koppe, D. G. J. Larsson, B. T. Björnsson, and E. Jönsson, "The impact of temperature on the metabolome and endocrine metabolic signals in Atlantic salmon (*Salmo salar*)," *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 164, no. 1, pp. 44–53, 2013.
- [51] W. K. F. Tse, J. Sun, H. Zhang, A. Y. S. Law, B. H. Y. Yeung, S. C. Chow, J. W. Qiu, and C. K. C. Wong, "Transcriptomic and iTRAQ proteomic approaches reveal novel short-term hyperosmotic stress responsive proteins in the gill of the Japanese eel (*Anguilla japonica*)," *J. Proteomics*, vol. 89, no. 0, pp. 81–94, 2013.
- [52] V. B. Kumar, I. F. Jiang, H. H. Yang, and C. F. Weng, "Effects of serum on phagocytic activity and proteomic analysis of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) serum after acute osmotic stress," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 26, no. 5, pp. 760–767, 2009.
- [53] J. Douxfils, M. Deprez, S. N. M. Mandiki, S. Milla, E. Henrotte, C. Mathieu, F. Silvestre, M. Vandecan, C. Rougeot, C. Mélard, M. Dieu, M. Raes, and P. Kestemont, "Physiological and proteomic responses to single and repeated hypoxia in juvenile Eurasian perch under domestication - Clues to physiological acclimation and humoral immune modulations," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 33, no. 5, pp. 1112–1122, 2012.
- [54] K. S. Kassahn, R. H. Crozier, H. O. Pörtner, and M. J. Caley, "Animal performance and stress: Responses and tolerance limits at different levels of biological organisation," *Biol. Rev.*, vol. 84, no. 2, pp. 277–292, 2009.
- [55] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, and others, *Free radicals in biology and medicine*, vol. 3. Oxford university press Oxford, 1999.
- [56] V. I. Lushchak, "Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals," *Aquat. Toxicol.*, vol. 101, no. 1, pp. 13–30, 2011.
- [57] F. Regoli and M. E. Giuliani, "Oxidative pathways of chemical toxicity and oxidative stress biomarkers in marine organisms," *Mar. Environ. Res.*, vol. 93, pp. 106–117, 2014.
- [58] A. Valavanidis, T. Vlahogianni, M. Dassenakis, M. Scoullou, A. I. N. Press, and A. I. N. Press, "Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants," *Environ. Chem.*, vol. 64, no. 2, pp. 178–189, 2006.
- [59] H. Islas-Flores, L. M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, A. Colín-Cruz, N. Neri-Cruz, and S. García-Medina, "Diclofenac-induced oxidative stress in brain, liver, gill and blood of common carp (*Cyprinus carpio*)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 92, pp. 32–38, 2013.
- [60] A. Slaninová, M. Smutná, H. Modra, and Z. Svobodová, "A review: Oxidative stress in fish induced by pesticides," *Neuroendocrinol. Lett.*, vol. 30, no. SUPPL.1, pp. 2–12, 2009.
- [61] Y. Cui, B. Liu, J. Xie, P. Xu, H. M. Habte-Tsion, and Y. Zhang, "Effect of heat stress and recovery on viability, oxidative damage, and heat shock protein expression in hepatic cells of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)," *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 40, no. 3, pp. 721–729, 2014.

- [62] O. B. Matoo, a V Ivanina, C. Ullstad, E. Beniash, and I. M. Sokolova, "Interactive effects of elevated temperature and CO₂ levels on metabolism and oxidative stress in two common marine bivalves (*Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*)," *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 164, no. 4, pp. 545–553, 2013.
- [63] A. R. Lopes, K. Trübenbach, T. Teixeira, V. M. Lopes, V. Pires, M. Baptista, T. Repolho, R. Calado, M. Diniz, and R. Rosa, "Oxidative stress in deep scattering layers: Heat shock response and antioxidant enzymes activities of myctophid fishes thriving in oxygen minimum zones," *Deep. Res. Part I Oceanogr. Res. Pap.*, vol. 82, pp. 10–16, 2013.
- [64] H. Wu, X. Liu, X. Zhang, C. Ji, J. Zhao, and J. Yu, "Proteomic and metabolomic responses of clam *Ruditapes philippinarum* to arsenic exposure under different salinities," *Aquat. Toxicol.*, vol. 136–137, no. 0, pp. 91–100, 2013.
- [65] C. Guerra, T. Zenteno-Savín, A. N. Maeda-Martínez, D. Abele, and E. E. R. Philipp, "The effect of predator exposure and reproduction on oxidative stress parameters in the Catarina scallop *Argopecten ventricosus*," *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 165, no. 1, pp. 89–96, 2013.
- [66] H. Wu, C. Ji, L. Wei, J. Zhao, and H. Lu, "Proteomic and metabolomic responses in hepatopancreas of *Mytilus galloprovincialis* challenged by *Micrococcus luteus* and *Vibrio anguillarum*," *J. Proteomics*, vol. 94, no. 0, pp. 54–67, 2013.
- [67] I. M. Copple, C. E. Goldring, N. R. Kitteringham, and B. K. Park, "The Nrf2-Keap1 defence pathway: role in protection against drug-induced toxicity," *Toxicology*, vol. 246, no. 1, pp. 24–33, 2008.
- [68] D. D. Zhang, "Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway," *Drug Metab. Rev.*, vol. 38, no. 4, pp. 769–89, 2006.
- [69] F. Regoli, M. E. Giuliani, M. Benedetti, and A. Arukwe, "Molecular and biochemical biomarkers in environmental monitoring: A comparison of biotransformation and antioxidant defense systems in multiple tissues," *Aquat. Toxicol.*, vol. 105, no. 3–4 SUPPL., pp. 56–66, 2011.
- [70] C. a Neumann, D. S. Krause, C. V Carman, S. Das, D. P. Dubey, J. L. Abraham, R. T. Bronson, Y. Fujiwara, S. H. Orkin, and R. a Van Etten, "Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression," *Nature*, vol. 424, no. 6948, pp. 561–565, 2003.
- [71] G. K. Iwama, P. Thomas, R. B. Forsyth, and M. M. Vijayan, "Heat shock protein expression in fish," *Rev. Fish Biol. Fish.*, vol. 8, no. 1, pp. 35–56, 1998.
- [72] G. K. Iwama, M. M. Vijayan, R. O. B. B. Forsyth, and P. A. Ackerman, "Heat Shock Proteins and Physiological Stress in Fish," *Am. Zool.*, vol. 39, no. 6, pp. 901–909, 1999.
- [73] N. Basu, A. E. Todgham, P. A. Ackerman, M. R. Bibeau, K. Nakano, P. M. Schulte, and G. K. Iwama, "Heat shock protein genes and their functional significance in fish," *Gene*, vol. 295, no. 2, pp. 173–183, 2002.
- [74] M. E. Feder and G. E. Hofmann, "Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology," *Annu. Rev. Physiol.*, vol. 61, pp. 243–82, 1999.
- [75] J. G. Sørensen, T. N. Kristensen, and V. Loeschcke, "The evolutionary and ecological role of heat shock proteins," *Ecol. Lett.*, vol. 6, no. 11, pp. 1025–1037, 2003.
- [76] A. M. Sapozhnikov, T. N. Tarasenko, A. D. Ponomarev, G. A. Gusarova, D. A. Murashko, and R. V. Petrov, "The Adrenalin-Mediated Activation of Expression of the 70-kDa Heat-Shock Protein in the Population of Thymocytes," *Dokl. Biol. Sci.*, vol. 392, no. 1–6, pp. 388–390, 2003.

- [77] P. A. Ackerman, R. B. Forsyth, C. F. Mazur, and G. K. Iwama, "Stress hormones and the cellular stress response in salmonids," *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 23, no. 4, pp. 327–336, 2000.
- [78] N. Basu, T. Nakano, E. G. Grau, and G. K. Iwama, "The Effects of Cortisol on Heat Shock Protein 70 Levels in Two Fish Species," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 124, no. 1, pp. 97–105, 2001.
- [79] R. Sathiyaa, T. Campbell, and M. M. Vijayan, "Cortisol modulates HSP90 mRNA expression in primary cultures of trout hepatocytes," *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 129, no. 2–3, pp. 679–685, 2001.
- [80] E. Fabbri, A. Capuzzo, and T. W. Moon, "The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, vol. 120, no. 2, pp. 177–192, 1998.
- [81] R. Laiz-Carrión, S. Sangiao-Alvarellos, J. M. Guzmán, M. P. Martín del Río, J. M. Míguez, J. L. Soengas, and J. M. Mancera, "Energy metabolism in fish tissues related to osmoregulation and cortisol action," *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 27, no. 3–4, pp. 179–188, 2002.
- [82] T. W. Moon, "Hormones and fish hepatocyte metabolism: 'the good, the bad and the ugly!,'" *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 139, no. 3, pp. 335–345, 2004.
- [83] T. W. Moon, "Glucose intolerance in teleost fish: fact or fiction?," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 129, no. 2–3, pp. 243–249, 2001.
- [84] S. Polakof, S. Panserat, J. Soengas, and T. Moon, "Glucose metabolism in fish: a review," *J. Comp. Physiol. B*, vol. 182, no. 8, pp. 1015–1045, 2012.
- [85] L. Galluzzi, O. Kepp, C. Trojel-Hansen, and G. Kroemer, "Mitochondrial control of cellular life, stress, and death.," *Circ. Res.*, vol. 111, no. 9, pp. 1198–207, 2012.
- [86] R. A. J. Smith, R. C. Hartley, H. M. Cochemé, and M. P. Murphy, "Mitochondrial pharmacology.," *Trends Pharmacol. Sci.*, vol. 33, no. 6, pp. 341–52, 2012.
- [87] P. Venditti, L. Di Stefano, and S. Di Meo, "Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species.," *Mitochondrion*, vol. 13, no. 2, pp. 71–82, 2013.
- [88] A. Strobel, E. Leo, H. O. Pörtner, and F. C. Mark, "Elevated temperature and pco2 shift metabolic pathways in differentially oxidative tissues of notothenia rossii," *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 166, no. 1, pp. 48–57, 2013.
- [89] M. Erecińska and D. F. Wilson, "Regulation of cellular energy metabolism," *J. Membr. Biol.*, vol. 70, no. 1, pp. 1–14, 1982.
- [90] F. Gagné, C. Blaise, C. André, and J. Pellerin, "Implication of site quality on mitochondrial electron transport activity and its interaction with temperature in feral *Mya arenaria* clams from the Saguenay Fjord," *Environ. Res.*, vol. 103, no. 2, pp. 238–246, 2007.
- [91] F. Gagné, C. Blaise, C. André, and M. Salazar, "Effects of pharmaceutical products and municipal wastewaters on temperature-dependent mitochondrial electron transport activity in *Elliptio complanata* mussels," *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 143, no. 4, pp. 388–393, 2006.
- [92] R. Sappal, M. MacDougald, M. Fast, D. Stevens, F. Kibenge, A. Siah, and C. Kamunde, "Alterations in mitochondrial electron transport system activity in response to warm acclimation, hypoxia-reoxygenation and copper in rainbow

- trout, *Oncorhynchus mykiss*," *Aquat. Toxicol.*, vol. 165, pp. 51–63, 2015.
- [93] L. Schmidlin, S. von Fumetti, and P. Nagel, "Copper sulphate reduces the metabolic activity of *Gammarus fossarum* in laboratory and field experiments," *Aquat. Toxicol.*, vol. 161, pp. 138–145, 2015.
- [94] H. O. Pörtner, F. C. Mark, and C. Bock, "Oxygen limited thermal tolerance in fish? Answers obtained by nuclear magnetic resonance techniques," *Respir. Physiol. Neurobiol.*, vol. 141, no. 3, pp. 243–260, 2004.
- [95] A. Sommer and H.-O. Pörtner, "Metabolic cold adaptation in the lugworm *Arenicola marina* (L.): comparison of a White Sea and a North Sea population," *Mar. Ecol.Prog. Ser.*, vol. 240, pp. 171–182, 2002.
- [96] B. S. Polla, S. Kantengwa, D. François, S. Salvioli, C. Franceschi, C. Marsac, and A. Cossarizza, "Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 13, pp. 6458–6463, 1996.
- [97] R. Gerl, "Apoptosis in the development and treatment of cancer," *Carcinogenesis*, vol. 26, no. 2, pp. 263–270, 2004.
- [98] A. Ashkenazi, "Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 7, no. 12, pp. 1001–1012, 2008.
- [99] S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death," *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, no. 4, pp. 495–516, 2007.
- [100] R. F. Lee and S. Steinert, "Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals," *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.*, vol. 544, no. 1, pp. 43–64, 2003.
- [101] a. Hagenaaars, L. Vergauwen, D. Benoot, K. Laukens, and D. Knapen, "Mechanistic toxicity study of perfluorooctanoic acid in zebrafish suggests mitochondrial dysfunction to play a key role in PFOA toxicity," *Chemosphere*, vol. 91, no. 6, pp. 844–856, 2013.
- [102] A. Topal, M. Atamanalp, E. Oruç, M. Kırıcı, and E. M. Kocaman, "Apoptotic effects and glucose-6-phosphate dehydrogenase responses in liver and gill tissues of rainbow trout treated with chlorpyrifos," *Tissue Cell*, vol. 46, no. 6, pp. 490–496, 2014.
- [103] L. M. Romero, *Fight or Flight responses*. Elsevier, 2010.
- [104] S. F. Perry and N. J. Bernier, "The acute humoral adrenergic stress response in fish: facts and fiction," *Aquaculture*, vol. 177, no. 1–4, pp. 285–295, 1999.
- [105] R. Glaser and J. K. Kiecolt-Glaser, "Stress-induced immune dysfunction: implications for health," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, no. 3, pp. 243–51, 2005.
- [106] N. I. Eisenberger and S. W. Cole, "Social neuroscience and health: neurophysiological mechanisms linking social ties with physical health," *Nat. Neurosci.*, vol. 15, no. 5, pp. 669–74, 2012.
- [107] H. Fu, O. M. Steinebach, C. J. A. van den Hamer, P. H. M. Balm, and R. A. C. Lock, "Involvement of cortisol and metallothionein-like proteins in the physiological responses of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to sublethal cadmium stress," *Aquat. Toxicol.*, vol. 16, no. 4, pp. 257–269, 1990.
- [108] T. L. Beitinger, "Behavioral Reactions for the Assessment of Stress in Fishes," *J. Great Lakes Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 495–528, 1990.

- [109] N. J. Bernier and R. E. Peter, "The hypothalamic–pituitary–interrenal axis and the control of food intake in teleost fish," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 129, no. 2–3, pp. 639–644, 2001.
- [110] T. R. Gregory and C. M. Wood, "The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout," *Physiol. Biochem. Zool.*, vol. 72, no. 3, pp. 286–295, 2010.
- [111] S. . McCormick, J. . Shrimpton, J. . Carey, M. . O’Dea, K. . Sloan, S. Moriyama, and B. T. Björnsson, "Repeated acute stress reduces growth rate of Atlantic salmon parr and alters plasma levels of growth hormone, insulin-like growth factor I and cortisol," *Aquaculture*, vol. 168, no. 1–4, pp. 221–235, 1998.
- [112] N. W. Pankhurst, S. L. Ludke, H. R. King, and R. E. Peter, "The relationship between acute stress, food intake, endocrine status and life history stage in juvenile farmed Atlantic salmon, *Salmo salar*," *Aquaculture*, vol. 275, no. 1–4, pp. 311–318, 2008.
- [113] M. Herrera, M. F. Castanheira, L. E. C. Conceição, and C. I. Martins, "Linking risk taking and the behavioral and metabolic responses to confinement stress in gilthead seabream *Sparus aurata*," *Appl. Anim. Behav. Sci.*, vol. 155, no. 0, pp. 101–108, 2014.
- [114] R. D. Handy, D. W. Sims, a. Giles, H. a. Campbell, and M. M. Musonda, "Metabolic trade-off between locomotion and detoxification for maintenance of blood chemistry and growth parameters by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during chronic dietary exposure to copper," *Aquat. Toxicol.*, vol. 47, no. 1, pp. 23–41, 1999.
- [115] T. G. Pottinger and T. R. Carrick, "Stress responsiveness affects dominant-subordinate relationships in rainbow trout," *Horm. Behav.*, vol. 40, no. 3, pp. 419–427, 2001.
- [116] M. F. Castanheira, M. Herrera, B. Costas, L. E. C. Conceição, and C. I. M. Martins, "Linking cortisol responsiveness and aggressive behaviour in gilthead seabream *Sparus aurata*: Indication of divergent coping styles," *Appl. Anim. Behav. Sci.*, vol. 143, no. 1, pp. 75–81, 2013.
- [117] E. Sokołowska, A. Kleszczyńska, H. Kalamarz-Kubiak, B. Arciszewski, and E. Kulczykowska, "Changes in brain arginine vasotocin, isotocin, plasma 11-ketotestosterone and cortisol in round goby, *Neogobius melanostomus*, males subjected to overcrowding stress during the breeding season," *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 165, no. 2, pp. 237–242, 2013.
- [118] R. J. Balment, W. Lu, E. Weybourne, and J. M. Warne, "Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: A review with insights from mammalian models," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 147, no. 1, pp. 9–16, 2006.
- [119] J. R. Brett, "Environmental factors and growth," in *Fish Physiology*, vol. 8, W. S. Hoar, D. J. Randall, and J. R. Brett, Eds. New York: Academic Press, 1979, pp. 599–675.
- [120] G. Bœuf and P. Payan, "How should salinity influence fish growth?," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 130, no. 4, pp. 411–423, 2001.
- [121] N. W. Pankhurst and G. Van Der Kraak, "Effect of stress on reproduction and growth of fish," in *Fish Stress and Health in Aquaculture*, G. K. Iwama, A. D. Pickering, J. P. Sumpter, and C. B. Schreck, Eds. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2011, pp. 73–93.
- [122] A. D. Pickering, T. G. Pottinger, J. P. Sumpter, J. F. Carragher, and P. Y. Le Bail, "Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 83, no. 1, pp. 86–93, 1991.

- [123] T. W. Moon, "Stress Effect on Growth and Metabolism," in *Encyclopedia of Fish Physiology: from Genome to Environment*, A. P. Farrell, Ed. 2011, pp. 1534–1540.
- [124] M. Trudel, D. Goto, and W. G. Wallace, "Bioenergetic responses of a benthic forage fish (*Fundulus heteroclitus*) to habitat degradation and altered prey community in polluted salt marshes," *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 67, no. 10, pp. 1566–1584, 2010.
- [125] C. B. Schreck, W. Contreras-Sanchez, and M. S. Fitzpatrick, "Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny," *Aquaculture*, vol. 197, no. 1–4, pp. 3–24, 2001.
- [126] C. B. Schreck, "Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 165, no. 3, pp. 549–56, 2010.
- [127] J. F. Carragher, J. P. Sumpter, T. G. Pottinger, and A. D. Pickering, "The deleterious effects of cortisol implantation on reproductive function in two species of trout, *Salmo trutta* L. and *Salmo gairdneri* Richardson," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 76, no. 2, pp. 310–321, 1989.
- [128] P. M. Campbell, T. G. Pottinger, and J. P. Sumpter, "Preliminary evidence that chronic confinement stress reduces the quality of gametes produced by brown and rainbow trout," *Aquaculture*, vol. 120, no. 1–2, pp. 151–169, 1994.
- [129] T. G. Pottinger and A. D. Pickering, "The effect of cortisol administration on hepatic and plasma estradiol-binding capacity in immature female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 80, no. 2, pp. 264–273, 1990.
- [130] S. J. Clearwater and N. W. Pankhurst, "The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard," *J. Fish Biol.*, vol. 50, no. 2, pp. 429–441, 1997.
- [131] C. E. Short, L. W. Crim, and M. J. Morgan, "The effects of stress on spawning performance and larval development in Atlantic cod, *Gadus morhua*," in *Reproductive Physiology of Fish*, F. W. Goetz and P. Thomas, Eds. Austin: University of Texas, 1995, p. 136.
- [132] L. Kleppe, Ø. Karlsen, R. B. Edvardsen, B. Norberg, E. Andersson, G. L. Taranger, and A. Wargelius, "Cortisol treatment of prespawning female cod affects cytogenesis related factors in eggs and embryos," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 189, pp. 84–95, 2013.
- [133] M. S. Eriksen, M. Bakken, A. Espmark, B. O. Braastad, and R. Salte, "Prespawning stress in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*: maternal cortisol exposure and hyperthermia during embryonic development affect offspring survival, growth and incidence of malformations," *J. Fish Biol.*, vol. 69, no. 1, pp. 114–129, 2006.
- [134] M. S. Eriksen, Å. Espmark, B. O. Braastad, R. Salte, and M. Bakken, "Long-term effects of maternal cortisol exposure and mild hyperthermia during embryogeny on survival, growth and morphological anomalies in farmed Atlantic salmon *Salmo salar* offspring," *J. Fish Biol.*, vol. 70, no. 2, pp. 462–473, 2007.
- [135] Å. M. Espmark, M. S. Eriksen, R. Salte, B. O. Braastad, and M. Bakken, "A note on pre-spawning maternal cortisol exposure in farmed Atlantic salmon and its impact on the behaviour of offspring in response to a novel environment," *Appl. Anim. Behav. Sci.*, vol. 110, no. 3–4, pp. 404–409, 2008.
- [136] M. S. Eriksen, G. Faerevik, S. Kittilsen, M. I. McCormick, B. Damsgård, V. A. Braithwaite, B. O. Braastad, and M. Bakken, "Stressed mothers - troubled offspring: a study of behavioural maternal effects in farmed *Salmo salar*," *J. Fish Biol.*, vol. 79, no. 3, pp. 575–586, 2011.
- [137] K. A. Sloman, "Exposure of ova to cortisol pre-fertilisation affects subsequent behaviour and physiology of brown trout," *Horm. Behav.*, vol. 58, no. 3, pp. 433–439, 2010.

- [138] A. D. Pickering and T. G. Pottinger, "Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol," *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 7, no. 1–6, pp. 253–258, 1989.
- [139] A. L. Pulsford, M. Crampe, A. Langston, and P. J. Glynn, "Modulatory effects of disease, stress, copper, TBT and vitamin E on the immune system of flatfish," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 5, no. 8, pp. 631–643, 1995.
- [140] M. D. Fast, S. Hosoya, S. C. Johnson, and L. O. B. Afonso, "Cortisol response and immune-related effects of Atlantic salmon (*Salmo salar* Linnaeus) subjected to short- and long-term stress," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 24, no. 2, pp. 194–204, 2008.
- [141] A. G. Maule, R. A. Tripp, S. L. Kaattari, and C. B. Schreck, "Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)," *J. Endocrinol.*, vol. 120, no. 1, pp. 135–142, 1989.
- [142] S. A. L. M. Kooijman, *Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems*. Cambridge University Press, 2000.
- [143] S. A. L. M. Kooijman, *Dynamic Energy Budget Theory for Metabolic Organisation*. Cambridge University Press, 2010.
- [144] R. Smolders, W. De Coen, and R. Blust, "Integrative measures of toxicant exposure in zebra fish (*Danio rerio*) at different levels of biological organization," in *Techniques in aquatic toxicology - Volume 2*, CRC Press., G. K. Ostrander, Ed. 2005, pp. 5–7.
- [145] F. Fry, *Effects of the environment on animal activity*. Toronto: Univ. of Toronto Press, 1947.
- [146] J. C. McGeer, C. Szebedinszky, D. G. McDonald, and C. M. Wood., "Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout. 1: Iono-regulatory disturbance and metabolic costs," *Aquat. Toxicol.*, vol. 50, no. 3, pp. 231–243, 2000.
- [147] J. Rajotte and P. Couture, "Effects of environmental metal contamination on the condition, swimming performance, and tissue metabolic capacities of wild yellow perch (*Perca flavescens*)," *Can. J. Fish.*, vol. 1304, no. 8, pp. 1296–1304, 2002.
- [148] E. I. Zimmer, T. Jager, V. Ducrot, L. Lagadic, and S. A. Kooijman, "Juvenile food limitation in standardized tests: a warning to ecotoxicologists," *Ecotoxicology*, vol. 21, no. 8, pp. 2195–2204, 2012.
- [149] E. Brodte, R. Knust, and H. O. Pörtner, "Temperature-dependent energy allocation to growth in Antarctic and boreal eelpout (*Zoarcidae*)," *Polar Biol.*, vol. 30, no. 1, pp. 95–107, 2006.
- [150] I. M. Sokolova, M. Frederich, R. Bagwe, G. Lannig, and A. a. Sukhotin, "Energy homeostasis as an integrative tool for assessing limits of environmental stress tolerance in aquatic invertebrates," *Mar. Environ. Res.*, vol. 79, pp. 1–15, 2012.
- [151] I. M. Sokolova, "Energy-Limited Tolerance to Stress as a Conceptual Framework to Integrate the Effects of Multiple Stressors," *Integr. Comp. Biol.*, pp. 1–12, 2013.
- [152] N. W. Pankhurst, "The endocrinology of stress in fish An environmental perspective," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 170, no. 2, pp. 265–275, 2011.
- [153] M. R. Baker, K. S. Gobush, and C. H. Vynne, "Review of factors influencing stress hormones in fish and wildlife," *J. Nat. Conserv.*, vol. 21, no. 5, pp. 309–318, 2013.

- [154] T. G. Pottinger and T. R. Carrick, "Modification of the Plasma Cortisol Response to Stress in Rainbow Trout by Selective Breeding," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 116, no. 1, pp. 122–132, 1999.
- [155] B. Auperin and M. Geslin, "Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 158, no. 3, pp. 234–239, 2008.
- [156] R. J. Arends, J. M. Mancera, J. L. Munoz, S. E. Wendelaar Bonga, and G. Flik, "The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement," *J. Endocrinol.*, vol. 163, no. 1, pp. 149–157, 1999.
- [157] C. W. Laidley and J. F. Leatherland, "Cohort sampling, anaesthesia and stocking-density effects on plasma cortisol, thyroid hormone, metabolite and ion levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson," *J. Fish Biol.*, vol. 33, no. 1, pp. 73–88, 1988.
- [158] T. Dickmeis, B. D. Weger, and M. Weger, "The circadian clock and glucocorticoids – Interactions across many time scales," *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 380, no. 1–2, pp. 2–15, 2013.
- [159] C. M. Bauer, N. K. Skaff, A. B. Bernard, J. M. Trevino, J. M. Ho, L. M. Romero, L. a. Ebensperger, and L. D. Hayes, "Habitat type influences endocrine stress response in the degu (*Octodon degus*)," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 186, pp. 136–144, 2013.
- [160] B. A. Barton, C. B. Schreck, R. D. Ewing, A. R. Hemmingsen, and R. Patiño, "Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch*," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 59, no. 3, pp. 468–471, 1985.
- [161] K. A. Sloman, C. J. Montpetit, and K. M. Gilmour, "Modulation of catecholamine release and cortisol secretion by social interactions in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 127, no. 2, pp. 136–146, 2002.
- [162] J. D. Jeffrey, M. J. Gollock, and K. M. Gilmour, "Social stress modulates the cortisol response to an acute stressor in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 196, pp. 8–16, 2014.
- [163] Inserm, *Pesticides - Effets sur la santé*, Inserm. Paris, France, France, 2013.
- [164] FAO, "FAO Statistical Yearbook 2013 - World food and agriculture," Rome, 2013.
- [165] A. Grube, D. Donaldson, T. Kiely, and L. Wu, "Pesticides Industry - Sales and Usage 2006 and 2007," Washington, USA, USA, 2011.
- [166] G. Agrios, *Plant Pathology*, 5th Editio. Academic Press, 2005.
- [167] H. Blanchoud, E. Barriuso, M. Chevreuil, B. Guery, E. Moreau-Guigon, C. Schott, S. Théry, and J. Tournebize, "Les pesticides dans le bassin de la Seine," *Collect. PIREN-SEINE*, vol. 14, p. 67, 2011.
- [168] Alim'agri, "Les chiffres de l'agriculture, de l'agroalimentaire, et de la forêt," Rapport du Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt, 2012.
- [169] Eurostat, "Production agricole de l'Union européenne en 2014," 2015. [Online]. Available: http://www.insee.fr/fr/themes/tableau.asp?reg_id=98&ref_id=CMPTEF10113. [Accessed: 22-Sep-2015].
- [170] Sénat, "Rapport d'information fait au nom de la mission commune d'information sur les pesticides et leur impact sur la santé et l'environnement.," Paris, France, 2012.

- [171] J.-P. Butault, C.-A. Dedryver, C. Gary, L. Guichard, F. Jacquet, J.-M. Meynard, P. Nicot, M. Pitra, R. Reau, B. Sauphanor, I. Savini, and T. Volay, "Ecophyto R&D : Quelles voies pour réduire l'usage des pesticides ? - Synthèse du rapport d'étude," France, 2010.
- [172] D. Pimentel, "Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics," *J. Agric. Environ. Ethics*, vol. 8, no. 1, pp. 17–29, 1995.
- [173] H. M. G. van der Werf, "Assessing the impact of pesticides on the environment," *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 60, no. 2–3, pp. 81–96, 1996.
- [174] F. Sánchez-Bayo, S. Baskaran, and I. R. Kennedy, "Ecological relative risk (EcoRR): another approach for risk assessment of pesticides in agriculture," *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 37–57, 2002.
- [175] M. Arias-Estévez, E. López-Periago, E. Martínez-Carballo, J. Simal-Gándara, J.-C. Mejuto, and L. García-Río, "The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources," *Agric. Ecosyst. Environ.*, vol. 123, no. 4, pp. 247–260, 2008.
- [176] M. Kahle, I. J. Buerge, A. Hauser, M. D. Müller, and T. Poiger, "Azole Fungicides: Occurrence and Fate in Wastewater and Surface Waters," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 42, no. 19, pp. 7193–7200, 2008.
- [177] N. Berenzen, A. Lentzen-Godding, M. Probst, H. Schulz, R. Schulz, and M. Liess, "A comparison of predicted and measured levels of runoff-related pesticide concentrations in small lowland streams on a landscape level.," *Chemosphere*, vol. 58, no. 5, pp. 683–91, 2005.
- [178] J. Kreuger, "Pesticides in stream water within an agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996," *Sci. Total Environ.*, vol. 216, no. 3, pp. 227–251, 1998.
- [179] Commissariat Général au Développement Durable, "Les pesticides dans les eaux," 2015. [Online]. Available: <http://www.statistiques.developpement-durable.gouv.fr/lessentiel/ar/246/211/contamination-globale-cours-deau-pesticides.html>. [Accessed: 23-Sep-2015].
- [180] L. Boithias, S. Sauvage, L. Taghavi, G. Merlina, J. L. Probst, and J. M. Sánchez Pérez, "Occurrence of metolachlor and trifluralin losses in the Save river agricultural catchment during floods," *J. Hazard. Mater.*, vol. 196, pp. 210–219, 2011.
- [181] T. Debenest, J. Silvestre, M. Coste, F. Delmas, and E. Pinelli, "Herbicide effects on freshwater benthic diatoms: Induction of nucleus alterations and silica cell wall abnormalities," *Aquat. Toxicol.*, vol. 88, no. 1, pp. 88–94, 2008.
- [182] L. Taghavi, J.-L. Probst, G. Merlina, A.-L. Marchand, G. Durbe, and A. Probst, "Flood event impact on pesticide transfer in a small agricultural catchment (Montoussé at Auradé, south west France)," *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 90, no. 3–6, pp. 390–405, 2010.
- [183] T. Polard, "Caractérisation des effets génotoxiques sur poisson des produits phytosanitaires en période de crue," Université Paul Sabatier, Toulouse III, France, 2011.
- [184] L. Taghavi, G. Merlina, and J.-L. Probst, "The role of storm flows in concentration of pesticides associated with particulate and dissolved fractions as a threat to aquatic ecosystems - Case study: the agricultural watershed of Save river (Southwest of France)," *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.*, no. 400, p. 06, 2011.
- [185] R. W. Risebrough, "Pesticides and Bird Populations," in *Current Ornithology*, R. F. Johnston, Ed. Boston, MA: Springer US, 1986, pp. 397–427.

- [186] C. Davidson and R. A. Knapp, "Multiples stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs," *Ecol. Appl.*, vol. 17, no. 2, pp. 587–597, 2007.
- [187] P. T. Agbohessi, I. Imorou Toko, A. Ouédraogo, T. Jauniaux, S. N. M. Mandiki, and P. Kestemont, "Assessment of the health status of wild fish inhabiting a cotton basin heavily impacted by pesticides in Benin (West Africa)," *Sci. Total Environ.*, vol. 506–507, no. 0, pp. 567–584, 2015.
- [188] S. Mostafalou and M. Abdollahi, "Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 268, no. 2, pp. 157–177, 2013.
- [189] R. A. Relyea, "The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities.," *Ecol. Appl.*, vol. 15, no. 2, pp. 618–627, 2005.
- [190] L. Maltby, T. C. M. Brock, and P. J. van den Brink, "Fungicide Risk Assessment for Aquatic Ecosystems: Importance of Interspecific Variation, Toxic Mode of Action, and Exposure Regime," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 43, no. 19, pp. 7556–7563, 2009.
- [191] R. A. Relyea and J. T. Hoverman, "Interactive effects of predators and a pesticide on aquatic communities," *Oikos*, vol. 117, no. 11, pp. 1647–1658, 2008.
- [192] N. E. Mills and R. D. Semlitsch, "Competition and predation mediate the indirect effects on an insecticide on southern leopard frogs.," *Ecol. Appl.*, vol. 14, no. 4, pp. 1041–1054, 2004.
- [193] M. J. Barry and D. C. Logan, "The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure," *Aquat. Toxicol.*, vol. 41, no. 1–2, pp. 101–124, 1998.
- [194] C. Newbold, "Herbicides in aquatic systems," *Biol. Conserv.*, vol. 7, no. 2, pp. 97–118, 1975.
- [195] T. C. M. Brock, S. J. H. Crum, J. W. Deneer, F. Heimbach, R. M. M. Roijackers, and J. A. Sinkeldam, "Comparing aquatic risk assessment methods for the photosynthesis-inhibiting herbicides metribuzin and metolachlor," *Environ. Pollut.*, vol. 130, no. 3, pp. 403–26, 2004.
- [196] M. Graymore, F. Stagnitti, and G. Allinson, "Impacts of atrazine in aquatic ecosystems," *Environ. Int.*, vol. 26, no. 7–8, pp. 483–495, 2001.
- [197] J. P. Zubrod, D. Englert, A. Feckler, N. Koksharova, M. Konschak, R. Bundschuh, N. Schnetzer, K. Englert, R. Schulz, and M. Bundschuh, "Does the current fungicide risk assessment provide sufficient protection for key drivers in aquatic ecosystem functioning?," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 49, no. 2, pp. 1173–81, 2015.
- [198] M. O. Gessner, E. Chauvet, and M. Dobson, "A Perspective on Leaf Litter Breakdown in Streams," *Oikos*, vol. 85, no. 2, pp. 377–384, 1999.
- [199] F. de Noyelles, W. D. Kettle, C. H. Fromm, M. F. Moffett, and S. L. Dewey, "Use of experimental ponds to assess the effects of a pesticide on the aquatic environment," *Using Mesocosms to Assess Aquat. Ecol. Risk Pestic. Theory Pract.* (Voshell JR, ed). Lanham, MD Entomol. Soc. Am., pp. 41–56, 1989.
- [200] K. R. Solomon, D. B. Baker, R. P. Richards, K. R. Dixon, S. J. Klaine, T. W. La Point, R. J. Kendall, C. P. Weisskopf, J. M. Giddings, J. P. Giesy, and others, "Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 15, no. 1, pp. 31–76, 1996.
- [201] M. Sekine, H. Nakanishi, and M. Ukita, "Study on fish mortality caused by the combined effects of pesticides and changes in environmental conditions," *Ecol. Modell.*, vol. 86, no. 2–3, pp. 259–264, 1996.

- [202] K. B. Tierney, A. P. Farrell, and C. J. Brauner, *Organic chemical toxicology of fishes*. 2014.
- [203] K. B. Tierney, D. H. Baldwin, T. J. Hara, P. S. Ross, N. L. Scholz, and C. J. Kennedy, "Olfactory toxicity in fishes," *Aquat. Toxicol.*, vol. 96, no. 1, pp. 2–26, 2010.
- [204] K. R. Solomon, J. A. Carr, L. H. Du Preez, J. P. Giesy, R. J. Kendall, E. E. Smith, and G. J. Van Der Kraak, "Effects of Atrazine on Fish, Amphibians, and Aquatic Reptiles: A Critical Review," *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 38, no. 9, 2008.
- [205] J. R. Rohr and K. a. McCoy, "A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians," *Environ. Health Perspect.*, vol. 118, no. 1, pp. 20–32, 2010.
- [206] C. P. Waring and A. Moore, "The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer," *Aquat. Toxicol.*, vol. 66, no. 1, pp. 93–104, 2004.
- [207] A. B. Soso, L. J. G. Barcellos, M. J. Ranzani-Paiva, L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, D. Anziliero, M. Lima, L. B. da Silva, F. Ritter, A. C. Bedin, and J. A. Finco, "Chronic exposure to sub-lethal concentration of a glyphosate-based herbicide alters hormone profiles and affects reproduction of female Jundiá (*Rhamdia quelen*)," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 23, no. 3, pp. 308–313, 2007.
- [208] J. R. McBride, H. M. Dye, and E. M. Donaldson, "Stress response of Juvenile Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) to the butoxyethanol ester of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 27–27, no. 1, pp. 877–884, 1981.
- [209] K. B. Tierney, A. L. Taylor, P. S. Ross, and C. J. Kennedy, "The alarm reaction of coho salmon parr is impaired by the carbamate fungicide IPBC," *Aquat. Toxicol.*, vol. 79, no. 2, pp. 149–57, 2006.
- [210] E. F. Hashim and M. S. Zaki, "Assessment of the hazardous effect of fungicide Dithane on *Clarias lazera* (catfish) including haematological, biochemical, and immunological parameters," *Arab Univ. J. Agric. Sci.*, vol. 13, no. 3, pp. 1005–1018, 2005.
- [211] C. R. B. Nascimento, M. M. Souza, and C. B. R. Martinez, "Copper and the herbicide atrazine impair the stress response of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 155, no. 3, pp. 456–61, 2012.
- [212] V. do C. Langiano and C. B. R. Martinez, "Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 147, no. 2, pp. 222–231, 2008.
- [213] J. D. Simonato, C. L. B. Guedes, and C. B. R. Martinez, "Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 69, no. 1, pp. 112–20, 2008.
- [214] L. Pereira Maduenho and C. B. R. Martinez, "Acute effects of diflubenzuron on the freshwater fish *Prochilodus lineatus*," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 148, no. 3, pp. 265–72, 2008.
- [215] L. Glusczak, D. dos S. Miron, B. S. Moraes, R. R. Simões, M. R. C. Schetinger, V. M. Morsch, and V. L. Loro, "Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*)," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 146, no. 4, pp. 519–524, 2007.
- [216] M. Crestani, C. Menezes, L. Glusczak, D. dos Santos Miron, R. Lazzari, M. F. Duarte, V. M. Morsch, A. L. Pippi, and V. P. Vieira, "Effects of Clomazone Herbicide on hematological and some parameters of protein and carbohydrate metabolism of silver catfish *Rhamdia quelen*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 65, no. 1, pp. 48–55, 2006.

- [217] L. Glusczak, D. dos Santos Miron, M. Crestani, M. Braga da Fonseca, F. De Araújo Pedron, M. F. Duarte, and V. L. P. Vieira, "Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 65, no. 2, pp. 237–241, 2006.
- [218] M. B. da Fonseca, L. Glusczak, B. Silveira Moraes, C. C. de Menezes, A. Pretto, M. A. Tierno, R. Zanella, F. F. Gonçalves, and V. Lúcia Loro, "The 2,4-D herbicide effects on acetylcholinesterase activity and metabolic parameters of piava freshwater fish (*Leporinus obtusidens*)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 69, no. 3, pp. 416–420, 2008.
- [219] C. Toni, D. Ferreira, L. C. Kreutz, V. L. Loro, and L. J. G. Barcellos, "Assessment of oxidative stress and metabolic changes in common carp (*Cyprinus carpio*) acutely exposed to different concentrations of the fungicide tebuconazole," *Chemosphere*, vol. 83, no. 4, pp. 579–584, 2011.
- [220] O. I. Kubrak, T. M. Atamaniuk, V. V. Husak, and V. I. Lushchak, "Transient effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) exposure on some metabolic and free radical processes in goldfish white muscle," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 59, pp. 356–361, 2013.
- [221] O. I. Kubrak, T. M. Atamaniuk, K. B. Storey, and V. I. Lushchak, "Goldfish can recover after short-term exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetate: Use of blood parameters as vital biomarkers," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 157, no. 3, pp. 259–265, 2013.
- [222] L. Cericato, J. G. M. Neto, M. Fagundes, L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, J. Finco, J. G. S. da Rosa, G. Koakoski, L. Centenaro, E. Pottker, D. Anziliero, and L. J. G. Barcellos, "Cortisol response to acute stress in jundiá *Rhamdia quelen* acutely exposed to sub-lethal concentrations of agrichemicals," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 148, no. 3, pp. 281–286, 2008.
- [223] G. Koakoski, R. M. Quevedo, D. Ferreira, T. A. Oliveira, J. G. S. da Rosa, M. S. de Abreu, D. Gusso, A. Marqueze, L. C. Kreutz, A. C. V. Giacomini, M. Fagundes, and L. J. G. Barcellos, "Agrichemicals chronically inhibit the cortisol response to stress in fish," *Chemosphere*, vol. 112, no. 0, pp. 85–91, 2014.
- [224] M. Bisson and A. Hontela, "Cytotoxic and endocrine-disrupting potential of atrazine, diazinon, endosulfan, and mancozeb in adrenocortical steroidogenic cells of rainbow trout exposed in vitro.," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 180, no. 2, pp. 110–117, 2002.
- [225] L. Cericato, J. G. M. Neto, L. C. Kreutz, R. M. Quevedo, J. G. S. da Rosa, G. Koakoski, L. Centenaro, E. Pottker, A. Marqueze, and L. J. G. Barcellos, "Responsiveness of the interrenal tissue of Jundiá (*Rhamdia quelen*) to an in vivo ACTH test following acute exposure to sublethal concentrations of agrichemicals.," *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, vol. 149, no. 3, pp. 363–7, 2009.
- [226] G. Koakoski, M. De Abreu, and C. Da Cruz, "Cortisol Response in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., Following Acute Exposure to a Glyphosate-based Herbicide," *Environ. Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 25–32, 2013.
- [227] J. T. Sanderson, R. J. Letcher, M. Heneweer, J. P. Giesy, and M. van den Berg, "Effects of chloro-s-triazine herbicides and metabolites on aromatase activity in various human cell lines and on vitellogenin production in male carp hepatocytes.," *Environ. Health Perspect.*, vol. 109, no. 10, pp. 1027–31, 2001.
- [228] C. Le Mer, R. L. Roy, J. Pellerin, C. M. Couillard, and D. Maltais, "Effects of chronic exposures to the herbicides atrazine and glyphosate to larvae of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 89, pp. 174–181, 2013.
- [229] C. J. Martyniuk, S. Alvarez, B. P. Lo, J. R. Elphick, and V. L. Marlatt, "Hepatic Protein Expression Networks Associated with Masculinization in the Female Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)," *J. Proteome Res.*, vol. 11, no. 8, pp. 4147–4161, 2012.

- [230] I. H. H. Kang, H. S. S. Kim, J.-H. Shin, T. S. S. Kim, H. J. J. Moon, I. Y. Y. Kim, K. S. S. Choi, K. S. S. Kil, Y. I. I. Park, M. S. S. Dong, and S. Y. Y. Han, "Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay.," *Toxicology*, vol. 199, no. 2–3, pp. 145–59, J2004.
- [231] C. Jolly, I. Katsiadaki, S. Morris, N. Le Belle, S. Dufour, I. Mayer, T. G. Pottinger, and A. P. Scott, "Detection of the anti-androgenic effect of endocrine disrupting environmental contaminants using in vivo and in vitro assays in the three-spined stickleback.," *Aquat. Toxicol.*, vol. 92, no. 4, pp. 228–39, 2009.
- [232] N. S. Hogan, M. J. Gallant, and M. R. van den Heuvel, "Exposure to the pesticide linuron affects androgen-dependent gene expression in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*).," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 31, no. 6, pp. 1391–5, 2012.
- [233] N. Hinfray, D. Baudiffier, M. C. Leal, J.-M. Porcher, S. Aït-Aïssa, F. Le Gac, R. W. Schulz, and F. Brion, "Characterization of testicular expression of P450 17 α -hydroxylase, 17,20-lyase in zebrafish and its perturbation by the pharmaceutical fungicide clotrimazole," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 174, no. 3, pp. 309–317, 2011.
- [234] D. Baudiffier, "Modes de perturbation de la stéroïdogénèse testiculaire et de la spermatogénèse chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) par des fongicides azolés," Université Rennes 1, 2012.
- [235] G. T. Ankley, M. D. Kahl, K. M. Jensen, M. W. Hornung, J. J. Korte, E. A. Makynen, and R. L. Leino, "Evaluation of the Aromatase Inhibitor Fadrozole in a Short-Term Reproduction Assay with the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)," *Toxicol. Sci.*, vol. 67, no. 1, pp. 121–130, 2002.
- [236] K. Kinnberg, H. Holbeck, G. I. Petersen, and P. Bjerregaard, "Effects of the fungicide prochloraz on the sexual development of zebrafish (*Danio rerio*).," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 145, no. 2, pp. 165–70, 2007.
- [237] A. Ohlsson, E. Ullerås, and A. Oskarsson, "A biphasic effect of the fungicide prochloraz on aldosterone, but not cortisol, secretion in human adrenal H295R cells--underlying mechanisms.," *Toxicol. Lett.*, vol. 191, no. 2–3, pp. 174–80, 2009.
- [238] Y. Jin, X. Zhang, L. Shu, L. Chen, L. Sun, H. Qian, W. Liu, and Z. Fu, "Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*)," *Chemosphere*, vol. 78, no. 7, pp. 846–852, 2010.
- [239] J. Blahová, L. Plhalová, M. Hostovský, L. Divišová, R. Dobšíková, I. Mikulíková, S. Štěpánová, and Z. Svobodová, "Oxidative stress responses in zebrafish *Danio rerio* after subchronic exposure to atrazine," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 61, pp. 82–85, 2013.
- [240] H. Xing, S. Li, Z. Wang, X. Gao, S. Xu, and X. Wang, "Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 103, no. 1, pp. 74–80, 2012.
- [241] A. Stara, J. Machova, and J. Velisek, "Effect of chronic exposure to simazine on oxidative stress and antioxidant response in common carp (*Cyprinus carpio* L.).," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 33, no. 2, pp. 334–43, Mar. 2012.
- [242] S. Guilherme, I. Gaivão, M. A. Santos, and M. Pacheco, "DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress," *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 743, no. 1–2, pp. 1–9, 2012.
- [243] C. D. Nwani, N. S. Nagpure, R. Kumar, B. Kushwaha, and W. S. Lakra, "DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, *Channa punctatus*," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 36, pp. 539–547, 2013.
- [244] V. D. G. Sinhgorin, A. P. Sinhgorin, J. M. dos S. Teixeira, K. M. L. Miléski, P. C. Hansen, P. S. A. Moreira, N. H. Kawashita, A.

- M. Baviera, and V. L. Loro, "Effects of the acute exposition to glyphosate-based herbicide on oxidative stress parameters and antioxidant responses in a hybrid Amazon fish surubim (*Pseudoplatystoma* sp).," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 106, pp. 181–7, 2014.
- [245] I. V Maksymiv, V. V Husak, N. M. Mosiichuk, T. M. Matviishyn, I. Y. Sluchyuk, J. M. Storey, K. B. Storey, and V. I. Lushchak, "Hepatotoxicity of herbicide Sencor in goldfish may result from induction of mild oxidative stress," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 122, pp. 67-75, 2015.
- [246] T. M. Matviishyn, O. I. Kubrak, V. V Husak, K. B. Storey, and V. I. Lushchak, "Tissue-specific induction of oxidative stress in goldfish by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid: Mild in brain and moderate in liver and kidney," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 37, no. 2, pp. 861-869, 2014.
- [247] C. Toni, C. Menezes, B. Clasen, J. Leitemperger, A. Pretto, M. B. Adaime, M. Leonardo Martins, R. Zanella, and V. Lucia Loro, "Oxidative stress in carp exposed to quinclorac herbicide under rice field condition," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 92, pp. 27-31, 2013.
- [248] C. Toni, V. L. Loro, A. Santi, C. C. de Menezes, R. Cattaneo, B. E. Clasen, and R. Zanella, "Exposure to tebuconazol in rice field and laboratory conditions induces oxidative stress in carp (*Cyprinus carpio*).," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 153, no. 1, pp. 128–132, 2011.
- [249] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, and R. Colombo, "Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress," *Clin. Chim. Acta*, vol. 329, no. 1–2, pp. 23–38, 2003.
- [250] K. England, C. O'Driscoll, and T. G. Cotter, "Carbonylation of glycolytic proteins is a key response to drug-induced oxidative stress and apoptosis," *Cell Death Differ.*, vol. 11, no. 3, pp. 252–60, 2004.
- [251] S. Guilherme, I. Gaivão, M. a. Santos, and M. Pacheco, "European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup® - A glyphosate-based herbicide," *Mutagenesis*, vol. 25, no. 5, pp. 523–530, 2010.
- [252] A. Azqueta, S. Shaposhnikov, and A. R. Collins, "DNA oxidation: Investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 674, no. 1–2, pp. 101–108, 2009.
- [253] K. D. Sugden, C. K. Campo, and B. D. Martin, "Direct Oxidation of Guanine and 7,8-Dihydro-8-oxoguanine in DNA by a High-Valent Chromium Complex: A Possible Mechanism for Chromate Genotoxicity," *Chem. Res. Toxicol.*, vol. 14, no. 9, pp. 1315–1322, 2001.
- [254] A. Marques, S. Guilherme, I. Gaivão, M. A. Santos, and M. Pacheco, "Progression of DNA damage induced by a glyphosate-based herbicide in fish (*Anguilla anguilla*) upon exposure and post-exposure periods--insights into the mechanisms of genotoxicity and DNA repair.," *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 166, pp. 126–33, 2014.
- [255] S. L. Anderson and G. C. Wild, "Linking genotoxic responses and reproductive success in ecotoxicology," *Environ. Health Perspect.*, vol. 102, no. SUPPL. 12, pp. 9–12, 1994.
- [256] Theodorakis, "Integration of Genotoxic and Population Genetic Endpoints," *Ecotox.*, vol. 10, pp. 245-256, 2001.
- [257] X.-M. Liu, J.-Z. Shao, L.-X. Xiang, and X.-Y. Chen, "Cytotoxic effects and apoptosis induction of atrazine in a grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) cell line.," *Environ. Toxicol.*, vol. 21, no. 1, pp. 80–9, 2006.
- [258] T. Cavas, "In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine-based herbicide on fish *Carassius auratus* using the micronucleus test and the comet assay," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 49, no. 6, pp. 1431–1435, 2011.

- [259] B. de Campos Ventura, D. D. F. de Angelis, and M. A. Marin-Morales, "Mutagenic and genotoxic effects of the Atrazine herbicide in *Oreochromis niloticus* (Perciformes, Cichlidae) detected by the micronuclei test and the comet assay," *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 90, no. 1, pp. 42–51, 2008.
- [260] N. C. Moreno, S. H. Sofia, and C. B. R. Martinez, "Genotoxic effects of the herbicide Roundup Transorb and its active ingredient glyphosate on the fish *Prochilodus lineatus*," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 37, no. 1, pp. 448–54, 2014.
- [261] J. Vera-Candioti, S. Soloneski, and M. L. Larramendy, "Evaluation of the genotoxic and cytotoxic effects of glyphosate-based herbicides in the ten spotted live-bearer fish *Cnesterodon decemmaculatus* (Jenyns, 1842)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 89, pp. 166–73, 2013.
- [262] T. Cavas and S. Konen, "Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay," *Mutagenesis*, vol. 22, no. 4, pp. 263–268, 2007.
- [263] S. Braz-Mota, H. Sadauskas-Henrique, R. M. Duarte, A. L. Val, and V. M. F. Almeida-Val, "Roundup® exposure promotes gills and liver impairments, DNA damage and inhibition of brain cholinergic activity in the Amazon teleost fish *Colossoma macropomum*," *Chemosphere*, vol. 135, pp. 53–60, 2015.
- [264] D. G. S. M. Cavalcante, C. B. R. Martinez, and S. H. Sofia, "Genotoxic effects of Roundup on the fish *Prochilodus lineatus*," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 695, no. 1–2, pp. 41–46, 2010.
- [265] L. D. S. Piancini, I. C. Guiloski, H. C. S. de Assis, and M. M. Cestari, "Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species," *Toxicol. Reports*, vol. 2, pp. 1157–1163, 2015.
- [266] B. Ateeq, M. A. Farah, and W. Ahmad, "Detection of DNA damage by alkaline single cell gel electrophoresis in 2,4-dichlorophenoxyacetic-acid- and butachlor-exposed erythrocytes of *Clarias batrachus*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 62, no. 3, pp. 348–354, 2005.
- [267] S. Könen and T. Çavaş, "Genotoxicity testing of the herbicide trifluralin and its commercial formulation treflan using the piscine micronucleus test," *Environ. Mol. Mutagen.*, vol. 49, no. 6, pp. 434–438, 2008.
- [268] S. Bony, I. Gaillard, and A. Devaux, "Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish," *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, vol. 90, no. 3–6, pp. 421–428, 2010.
- [269] S. Guilherme, M. A. Santos, I. Gaivão, and M. Pacheco, "Are DNA-damaging effects induced by herbicide formulations (Roundup® and Garlon®) in fish transient and reversible upon cessation of exposure?," *Aquat. Toxicol.*, vol. 155, pp. 213–21, 2014.
- [270] S. Bony, C. Gillet, a. Bouchez, C. Margoum, and a. Devaux, "Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys," *Aquat. Toxicol.*, vol. 89, no. 3, pp. 197–203, 2008.
- [271] V. JanakiDevi, N. Nagarani, M. YokeshBabu, A. K. Kumaraguru, and C. M. Ramakritinan, "A study of proteotoxicity and genotoxicity induced by the pesticide and fungicide on marine invertebrate (*Donax faba*)," *Chemosphere*, vol. 90, no. 3, pp. 1158–66, 2013.
- [272] K. Šiviková, J. Dianovský, B. Holečková, M. Galdíková, and V. Kolesárová, "Assessment of cytogenetic damage in bovine peripheral lymphocytes exposed to in vitro tebuconazole-based fungicide," *Chemosphere*, vol. 92, no. 5, pp. 555–62, 2013.
- [273] S. Soloneski, M. González, E. Piaggio, M. Apezteguía, M. A. Reigosa, and M. L. Larramendy, "Effect of the dithiocarbamate pesticide zineb and its commercial formulation azzurro. I. Genotoxic evaluation on cultured human

- lymphocytes exposed in vitro," *Mutagenesis*, vol. 16, no. 6, pp. 487–493, 2001.
- [274] V. V. Husak, N. M. Mosiichuk, I. V. Maksymiv, I. Y. Sluchyuk, J. M. Storey, K. B. Storey, and V. I. Lushchak, "Histopathological and biochemical changes in goldfish kidney due to exposure to the herbicide Sencor may be related to induction of oxidative stress.," *Aquat. Toxicol.*, vol. 155, pp. 181–189, 2014.
- [275] M. Fernández, J. C. Ríos, a. Jos, and G. Repetto, "Comparative cytotoxicity of alachlor on RTG-2 trout and SH-SY5Y human cells," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 51, no. 4, pp. 515–520, 2006.
- [276] N. Nikoloff, L. Escobar, S. Soloneski, and M. L. Larramendy, "Comparative study of cytotoxic and genotoxic effects induced by herbicide s-metolachlor and its commercial formulation twin gold pack® in human hepatoma (hepg2) cells," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 62, pp. 777–781, 2013.
- [277] N. Nikoloff, M. L. Larramendy, and S. Soloneski, "Assessment of DNA damage, cytotoxicity, and apoptosis in human hepatoma (HepG2) cells after flurochloridone herbicide exposure.," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 65, pp. 233–41, 2014.
- [278] B. Ateeq, M. Abul farah, M. Niamat Ali, and W. Ahmad, "Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor," *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.*, vol. 518, no. 2, pp. 135–144, 2002.
- [279] E. Clair, R. Mesnage, C. Travert, and G.-É. Séralini, "A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels.," *Toxicol. In Vitro*, vol. 26, no. 2, pp. 269–79, 2012.
- [280] D. Kaioumova, C. Süsal, and G. Opelz, "Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid," *Hum. Immunol.*, vol. 62, no. 1, pp. 64–74, 2001.
- [281] I. Rojik, J. Nemcsók, and L. Boross, "Morphological and biochemical studies on liver, kidney and gill of fishes affected by pesticides.," *Acta Biol. Hung.*, vol. 34, no. 1, pp. 81–92, 1983.
- [282] S. Russmann, G. A. Kullak-Ublick, and I. Grattagliano, "Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity.," *Curr. Med. Chem.*, vol. 16, no. 23, pp. 3041–53, 2009.
- [283] H. Jaeschke, "Mechanisms of Hepatotoxicity," *Toxicol. Sci.*, vol. 65, no. 2, pp. 166–176, 2002.
- [284] X. Wang, H. Xing, Y. Jiang, H. Wu, G. Sun, Q. Xu, and S. Xu, "Accumulation, histopathological effects and response of biochemical markers in the spleens and head kidneys of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 32, pp. 148–158, 2013.
- [285] H. Xing, S. Li, Z. Wang, X. Gao, S. Xu, and X. Wang, "Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos," *Chemosphere*, vol. 88, no. 4, pp. 377–383, 2012.
- [286] T. L. Rocha, A. P. R. Dos Santos, Á. T. Yamada, C. M. de A. Soares, C. L. Borges, A. M. Bailão, and S. M. T. Sabóia-Morais, "Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide.," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 40, no. 1, pp. 175–186, 2015.
- [287] N. S. Shiogiri, M. G. Paulino, S. P. Carraschi, F. G. Baraldi, C. da Cruz, and M. N. Fernandes, "Acute exposure of a glyphosate-based herbicide affects the gills and liver of the Neotropical fish, *Piaractus mesopotamicus*.," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 34, no. 2, pp. 388–96, 2012.
- [288] M. S. Butchiram, K. S. Tilak, and P. W. Raju, "Studies on histopathological changes in the gill, liver and kidney of *Channa punctatus* (Bloch) exposed to alachlor," *J. Environ. Biol.*, vol. 30, no. 2, pp. 303–306, 2009.

- [289] M. G. Paulino, N. E. S. Souza, and M. N. Fernandes, "Subchronic exposure to atrazine induces biochemical and histopathological changes in the gills of a Neotropical freshwater fish, *Prochilodus lineatus*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 80, pp. 6–13, 2012.
- [290] Y. Uyanıkgil, M. Yalçınkaya, U. Ateş, M. Baka, H. Karakişi, Y. Uyanıkgil, M. Yalçınkaya, U. Ateş, M. Baka, and H. Karakişi, "Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid formulation on medulla spinalis of *Poecilia reticulata*: A histopathological study," *Chemosphere*, vol. 76, no. 10, pp. 1386–1391, 2009.
- [291] M. Mela, I. C. Guiloski, H. B. Doria, M. A. F. Randi, C. A. de Oliveira Ribeiro, L. Pereira, A. C. Maraschi, V. Prodocimo, C. A. Freire, and H. C. Silva de Assis, "Effects of the herbicide atrazine in neotropical catfish (*Rhamdia quelen*)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 93, pp. 13–21, 2013.
- [292] C. Shinn, "Impact of toxicants on stream fish biological traits," Université Paul Sabatier, Toulouse III, Toulouse, 2010.
- [293] R. A. Drummond and C. L. Russom, "Behavioral toxicity syndromes: A promising tool for assessing toxicity mechanisms in juvenile fathead minnows," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 9, no. 1, pp. 37–46, 1990.
- [294] M. G. Paulino, M. M. Sakuragui, and M. N. Fernandes, "Effects of atrazine on the gill cells and ionic balance in a neotropical fish, *Prochilodus lineatus*," *Chemosphere*, vol. 86, no. 1, pp. 1–7, 2012.
- [295] N. K. Nesković, I. Elezović, V. Karan, V. Poleksić, and M. Budimir, "Acute and subacute toxicity of atrazine to carp (*Cyprinus carpio* L.)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 25, no. 2, pp. 173–82, 1993.
- [296] B. M. Alazemi, J. W. Lewis, and E. B. Andrews, "Gill Damage in the Freshwater Fish *Gnathonemus Petersii* (Family: Mormyridae) Exposed to Selected Pollutants: An Ultrastructural Study," *Environ. Technol.*, vol. 17, no. 3, pp. 225–238, 1996.
- [297] W. Jiraungkoorskul, E. S. Upatham, M. Kruatrachue, S. Sahaphong, S. Vichasri-Grams, and P. Pokethitiyook, "Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)," *Environ. Toxicol.*, vol. 18, no. 4, pp. 260–7, 2003.
- [298] N. K. Nešković, V. Poleksić, I. Elezović, V. Karan, and M. Budimir, "Biochemical and Histopathological Effects of Glyphosate on Carp, *Cyprinus carpio* L.," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 56, no. 2, pp. 295–302, 1996.
- [299] M. del Carmen Alvarez, L. a. Fuiman, M. D. C. Alvarez, and L. a. Fuiman, "Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae," *Aquat. Toxicol.*, vol. 74, no. 3, pp. 229–241, 2005.
- [300] P. Saglio and S. Trijasse, "Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 35, no. 3, pp. 484–491, 1998.
- [301] C. V. M. Araújo, C. Shinn, L. B. Mendes, D. Delello-Schneider, A. L. Sanchez, and E. L. G. Espíndola, "Avoidance response of *Danio rerio* to a fungicide in a linear contamination gradient," *Sci. Total Environ.*, vol. 484, pp. 36–42, 2014.
- [302] K. B. Tierney, C. R. Singh, P. S. Ross, and C. J. Kennedy, "Relating olfactory neurotoxicity to altered olfactory-mediated behaviors in rainbow trout exposed to three currently-used pesticides," *Aquat. Toxicol.*, vol. 81, no. 1, pp. 55–64, 2007.
- [303] H. . Jarrard, K. . Delaney, and C. . Kennedy, "Impacts of carbamate pesticides on olfactory neurophysiology and cholinesterase activity in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 69, no. 2, pp. 133–148, 2004.

- [304] I. D. McCarthy and L. A. Fuiman, "Growth and protein metabolism in red drum (*Sciaenops ocellatus*) larvae exposed to environmental levels of atrazine and malathion," *Aquat. Toxicol.*, vol. 88, no. 4, pp. 220–229, 2008.
- [305] K. Nieves-Puigdoller, B. T. Bjornsson, and S. D. McCormick, "Effects of hexazinone and atrazine on the physiology and endocrinology of smolt development in Atlantic salmon," *Aquat. Toxicol.*, vol. 84, pp. 27–37, 2007.
- [306] J. Matsumoto, A. J. Hosmer, and G. Van Der Kraak, "Survival and iono-regulatory performance in Atlantic salmon smolts is not affected by atrazine exposure. *Comp. Biochem.*," *Comp. Biochem. Physiol. C*, vol. 52, pp. 379–384, 2010.
- [307] C. A. Y. Harayashiki, A. S. Varela, A. A. de S. Machado, L. da C. Cabrera, E. G. Primel, A. Bianchini, and C. D. Corcini, "Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water," *Aquat. Toxicol.*, vol. 142–143, pp. 176–84, 2013.
- [308] G. T. Ankley, K. M. Jensen, E. J. Durhan, E. A. Makynen, B. C. Butterworth, M. D. Kahl, D. L. Villeneuve, A. Linnum, L. E. Gray, M. Cardon, and V. S. Wilson, "Effects of Two Fungicides with Multiple Modes of Action on Reproductive Endocrine Function in the Fathead Minnow (*Pimephales promelas*)," *Toxicol. Sci.*, vol. 86, no. 2, pp. 300–308, 2005.
- [309] R. Lavado, R. Thibaut, D. Raldúa, R. Martín, and C. Porte, "First evidence of endocrine disruption in feral carp from the Ebro River," *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, vol. 196, no. 2, pp. 247–57, 2004.
- [310] E. Noaksson, M. Linderoth, A. T. C. Bosveld, and L. Balk, "Altered steroid metabolism in several teleost species exposed to endocrine disrupting substances in refuse dump leachate," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 134, no. 3, pp. 273–284, 2003.
- [311] R. I. L. Eggen, R. Behra, P. Burkhardt-Holm, B. I. Escher, and N. Schweigert, "Challenges in ecotoxicology," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 38, no. 3, p. 58A–64A, 2004.
- [312] D. Ribera, J. Teberly, and J.-F. Narbonne, "Mélanges de polluants : état des connaissances sur leur toxicité et écotoxicités," Bordeaux, France, 2012.
- [313] C. a. Laetz, B. D.H., T. K. Collier, V. Hebert, J. D. Stark, and N. L. Scholz, "The Synergistic Toxicity of Pesticide Mixtures: Implications for Risk Assessment and the Conservation of Endangered Pacific Salmon," *Environmental Health Perspectives*, vol. 117, no. 3, 2009.
- [314] M. Fatima, S. N. M. Mandiki, J. Douxfils, F. Silvestre, P. Coppe, and P. Kestemont, "Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish. Immune and antioxidant effects," *Aquat. Toxicol.*, vol. 81, no. 2, pp. 159–167, 2007.
- [315] C. Shinn, M. M. Santos, S. Lek, and G. Grenouillet, "Behavioral response of juvenile rainbow trout exposed to an herbicide mixture," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 112, pp. 15–21, 2015.
- [316] L. J. Schuler and G. M. Rand, "Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of South Florida," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 54, no. 4, pp. 571–83, 2008.
- [317] A. Coors and T. Frische, "Predicting the aquatic toxicity of commercial pesticide mixtures," *Environ. Sci. Eur.*, vol. 23, no. 1, p. 22, 2011.
- [318] D. Caissie, "The thermal regime of rivers: a review," *Freshw. Biol.*, vol. 51, no. 8, pp. 1389–1406, 2006.
- [319] B. W. Webb and F. Nobilis, "Long-term changes in river temperature and the influence of climatic and hydrological factors," *Hydrol. Sci. J.*, vol. 52, no. 1, pp. 74–85, 2007.

- [320] C. C. Coutant and A. J. Brook, "Biological aspects of thermal pollution I. Entrainment and discharge canal effects*," *C R C Crit. Rev. Environ. Control*, vol. 1, no. 1–4, pp. 341–381, 1970.
- [321] J. M. Reutter and C. E. Herdendorf, "Thermal Discharge from a Nuclear Power Plant: Predicted Effects on Lake Erie Fish," *Ohio J. Sc.*, vol. 76, no. 1, pp. 39–45, 1976.
- [322] T. Langford, *Ecological effects of thermal discharges*. Springer Science & Business Media, 1990.
- [323] M. J. Genner, D. W. Sims, V. J. Wearmouth, E. J. Southall, A. J. Southward, P. A. Henderson, and S. J. Hawkins, "Regional climatic warming drives long-term community changes of British marine fish.," *Proc. Biol. Sci.*, vol. 271, no. 1539, pp. 655–61, 2004.
- [324] A. Occhipinti-Ambrogi, "Global change and marine communities: alien species and climate change.," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 55, no. 7–9, pp. 342–52, 2007.
- [325] M. Daufresne, M. C. Roger, H. Capra, and N. Lamouroux, "Long-term changes within the invertebrate and fish communities of the Upper Rhone River: effects of climatic factors," *Glob. Chang. Biol.*, vol. 10, no. 1, pp. 124–140, Jan. 2004.
- [326] M. Frederich and H. O. Pörtner, "Oxygen limitation of thermal tolerance defined by cardiac and ventilatory performance in spider crab, *Maja squinado*," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 279, no. 5, pp. 1531–1538, 2000.
- [327] H. . Pörtner, "Climate variations and the physiological basis of temperature dependent biogeography: systemic to molecular hierarchy of thermal tolerance in animals," *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 132, no. 4, pp. 739–761, 2002.
- [328] H. O. Pörtner and R. Knust, "Climate change affects marine fishes through the oxygen limitation of thermal tolerance.," *Science*, vol. 315, no. 5808, pp. 95–97, 2007.
- [329] K. Sullivan, D. J. Martin, and R. D. Cardwell, *An analysis of the effect of temperature on salmonids of the Pacific northwest with implications for selecting temperature criteria*, Institute . Portland, Oregon, 2000.
- [330] T. L. Beitinger, W. A. Bennett, and R. W. McCauley, "Temperature Tolerances of North American Freshwater Fishes Exposed to Dynamic Changes in Temperature," *Environ. Biol. Fishes*, vol. 58, no. 3, pp. 237–275, 2000.
- [331] L. Tissot and Y. Souchon, "Synthèse des tolérances thermiques des principales espèces de poissons des rivières et fleuves de plaine de l'ouest européen," *Hydroécologie Appliquée*, vol. 17, pp. 17–76, 2011.
- [332] T. L. Beitinger and W. A. Bennett, "Quantification of the Role of Acclimation Temperature in Temperature Tolerance of Fishes," *Environ. Biol. Fishes*, vol. 58, no. 3, pp. 277–288, 2000.
- [333] T. Ford and T. L. Beitinger, "Temperature tolerance in the goldfish , *Carassius auratus*," *J. Therm. Biol.*, vol. 30, no. 2, pp. 147–152, 2005.
- [334] C. C. Coutant, "Temperature, Reproduction and Behavior," *Chesap. Sci.*, vol. 10, no. 3/4, pp. 261–274, 1969.
- [335] V. H. Hutchison and J. D. Maness, "The Role of Behavior in Temperature Acclimation and Tolerance in Ectotherms," *Integr. Comp. Biol.*, vol. 19, no. 1, pp. 367–384, 1979.
- [336] H. O. Pörtner, L. Peck, and G. Somero, "Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative

- view.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 362, no. 1488, pp. 2233–2258, 2007.
- [337] G. Balogh, M. Péter, A. Glatz, I. Gombos, Z. Török, I. Horváth, J. L. Harwood, and L. Vígh, "Key role of lipids in heat stress management," *FEBS Lett.*, vol. 587, no. 13, pp. 1970–1980, 2013.
- [338] P. W. Hochachka and G. N. Somero, "Biochemical Adaptation, Mechanism and Process in Physiological Evolution Oxford University Press," 478 p, 2002.
- [339] J. E. Podrabsky, "Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*," *J. Exp. Biol.*, vol. 207, no. 13, pp. 2237–2254, 2004.
- [340] H. . Pörtner, B. Berdal, R. Blust, O. Brix, A. Colosimo, B. De Wachter, A. Giuliani, T. Johansen, T. Fischer, R. Knust, G. Lannig, G. Naevdal, A. Nedenes, G. Nyhammer, F. . Sartoris, I. Serendero, P. Sirabella, S. Thorkildsen, and M. Zakhartsev, "Climate induced temperature effects on growth performance, fecundity and recruitment in marine fish: developing a hypothesis for cause and effect relationships in Atlantic cod (*Gadus morhua*) and common eelpout (*Zoarces viviparus*)," *Cont. Shelf Res.*, vol. 21, no. 18–19, pp. 1975–1997, 2001.
- [341] van Dijk PL, C. Tesch, I. Hardewig, and H. Portner, "Physiological disturbances at critically high temperatures: a comparison between stenothermal antarctic and eurythermal temperate eelpouts (*Zoarcidae*)," *J. Exp. Biol.*, vol. 202 Pt 24, no. 24, pp. 3611–3621, 1999.
- [342] M. R. Viant, I. Werner, E. S. Rosenblum, a. S. Gantner, R. S. Tjeerdema, and M. L. Johnson, "Correlation between heat-shock protein induction and reduced metabolic condition in juvenile steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) chronically exposed to elevated temperature," *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 29, no. 2, pp. 159–171, 2003.
- [343] G. Lannig, C. Bock, F. J. Sartoris, and H. O. Pörtner, "Oxygen limitation of thermal tolerance in cod, *Gadus morhua* L., studied by magnetic resonance imaging and on-line venous oxygen monitoring.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 287, no. 4, pp. 902–910, 2004.
- [344] F. C. Mark, C. Bock, and H. O. Pörtner, "Oxygen-limited thermal tolerance in Antarctic fish investigated by MRI and (31)P-MRS.," *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 283, no. 5, pp. 1254–1262, 2002.
- [345] F. J. Sartoris, C. Bock, I. Serendero, G. Lannig, and H. O. Pörtner, "Temperature-dependent changes in energy metabolism, intracellular pH and blood oxygen tension in the Atlantic cod," *J. Fish Biol.*, vol. 62, no. 6, pp. 1239–1253, 2003.
- [346] J. Sollid, R. E. Weber, and G. Nilsson, "Temperature alters the respiratory surface area of crucian carp *Carassius carassius* and goldfish *Carassius auratus*," *J. Exp. Biol.*, vol. 208, no. 6, pp. 1109–1116, 2005.
- [347] J. Sollid and G. E. Nilsson, "Plasticity of respiratory structures - Adaptive remodeling of fish gills induced by ambient oxygen and temperature," *Respir. Physiol. Neurobiol.*, vol. 154, no. 1–2, pp. 241–251, 2006.
- [348] M. V. Zakhartsev, B. De Wachter, F. J. Sartoris, H. O. Pörtner, and R. Blust, "Thermal physiology of the common eelpout (*Zoarces viviparus*)," *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.*, vol. 173, no. 5, pp. 365–378, 2003.
- [349] M. F. Steinhausen, E. Sandblom, E. J. Eliason, C. Verhille, and A. P. Farrell, "The effect of acute temperature increases on the cardiorespiratory performance of resting and swimming sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*).," *J. Exp. Biol.*, vol. 211, no. Pt 24, pp. 3915–3926, 2008.
- [350] A. P. Farrell and S. M. Clutterham, "On-line venous oxygen tensions in rainbow trout during graded exercise at two acclimation temperatures," *J. Exp. Biol.*, vol. 206, no. 3, pp. 487–496, 2003.

- [351] A. P. Farrell, "Cardiorespiratory performance in salmonids during exercise at high temperature: Insights into cardiovascular design limitations in fishes," *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 132, no. 4, pp. 797–810, 2002.
- [352] J. H. Selong, T. E. McMahon, A. V. Zale, and F. T. Barrows, "Effect of Temperature on Growth and Survival of Bull Trout, with Application of an Improved Method for Determining Thermal Tolerance in Fishes," *Trans. Am. Fish. Soc.*, vol. 130, no. 6, pp. 1026–1037, 2001.
- [353] J. L. Lessard and D. B. Hayes, "Effects of elevated water temperature on fish and macroinvertebrate communities below small dams," *River Res. Appl.*, vol. 19, no. 7, pp. 721–732, 2003.
- [354] E. Jeppesen, M. Meerhoff, K. Holmgren, I. González-Bergonzoni, F. Teixeira-de Mello, S. A. J. Declerck, L. De Meester, M. Søndergaard, T. L. Lauridsen, R. Bjerring, J. M. Conde-Porcuna, N. Mazzeo, C. Iglesias, M. Reizenstein, H. J. Malmquist, Z. Liu, D. Balayla, and X. Lazzaro, "Impacts of climate warming on lake fish community structure and potential effects on ecosystem function," *Hydrobiologia*, vol. 646, no. 1, pp. 73–90, 2010.
- [355] V. J. T. van Ginneken and G. E. Maes, "The European eel (*Anguilla anguilla*, Linnaeus), its Lifecycle, Evolution and Reproduction: A Literature Review," *Rev. Fish Biol. Fish.*, vol. 15, no. 4, pp. 367–398, 2005.
- [356] W. W. Reynolds and M. E. Casterlin, "Effect of temperature on locomotor activity in the goldfish (*Carassius auratus*) and the bluegill (*Lepomis macrochirus*): Presence of an 'activity well' in the region of the final preferendum," *Hydrobiologia*, vol. 65, no. 1, pp. 3–5, 1979.
- [357] W. W. Reynolds and M. E. Casterlin, "The role of temperature in the environmental physiology of fishes," in *Environmental Physiology of Fishes*, vol. 35, M. A. Ali, Ed. Springer US, 1980, pp. 497–518.
- [358] J. J. Magnuson and B. T. DeStasio, "Thermal niche of fishes and global warming," in *Global Warming: implications for freshwater and marine fish*, Society fo., vol. 61, C. M. Wood and D. G. McDonald, Eds. Cambridge University Press, 1996, pp. 377–408.
- [359] B. W. Webb and D. E. Walling, "Temporal variability in the impact of river regulation on thermal regime and some biological implications," *Freshw. Biol.*, vol. 29, no. 1, pp. 167–182, 1993.
- [360] S. Pasquaud, M. Béguet, M. H. Larsen, A. Chaalali, H. Cabral, and J. Lobry, "Increase of marine juvenile fish abundances in the middle Gironde estuary related to warmer and more saline waters, due to global changes," *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, vol. 104–105, no. 0, pp. 46–53, 2012.
- [361] S. Dembski, G. Masson, D. Monnier, P. Wagner, and J. C. Pihan, "Consequences of elevated temperatures on life-history traits of an introduced fish, pumpkinseed *Lepomis gibbosus*," *J. Fish Biol.*, vol. 69, no. 2, pp. 331–346, 2006.
- [362] F. J. Rahel and J. D. Olden, "Assessing the Effects of Climate Change on Aquatic Invasive Species," *Conserv. Biol.*, vol. 22, no. 3, pp. 521–533, 2008.
- [363] M. Winder and D. E. Schindler, "Climate change uncouples trophic interactions in an aquatic ecosystem," *Ecology*, vol. 85, no. 8, pp. 2100–2106, 2004.
- [364] L. Hughes, "Biological consequences of global warming: is the signal already apparent?," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 15, no. 2, pp. 56–61, 2000.
- [365] R. Laskowski, A. J. Bednarska, P. E. Kramarz, S. Loureiro, V. Scheil, J. Kudřek, and M. Holmstrup, "Interactions between toxic chemicals and natural environmental factors - A meta-analysis and case studies," *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 18, pp. 3763–3774, 2010.

- [366] E. H. W. Heugens, A. J. Hendriks, T. Dekker, N. M. van Straalen, and W. Admiraal, "A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment," *Crit. Rev. Toxicol.*, vol. 31, no. 3, pp. 247–284, 2001.
- [367] M. C. Jackson, C. J. G. Loewen, R. D. Vinebrooke, and C. T. Chimimba, "Net effects of multiple stressors in freshwater ecosystems: a meta-analysis," *Glob. Chang. Biol.*, 2015.
- [368] I. M. I. M. Sokolova and G. Lannig, "Interactive effects of metal pollution and temperature on metabolism in aquatic ectotherms: implications of global climate change," *Clim. Res.*, vol. 37, no. September, pp. 181–201, 2008.
- [369] D. Lapointe, F. Pierron, and P. Couture, "Individual and combined effects of heat stress and aqueous or dietary copper exposure in fathead minnows (*Pimephales promelas*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 104, no. 1–2, pp. 80–85, 2011.
- [370] E. Lavergne, N. Pedron, I. Calves, G. Claireaux, D. Mazurais, J. Zambonino-Infante, N. Le Bayon, C. Cahu, and J. Laroche, "Does the chronic chemical contamination of a European flounder population decrease its thermal tolerance?," *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 95, no. 2, pp. 658–64, 2015.
- [371] R. W. Patra, J. C. Chapman, R. P. Lim, and P. C. Gehrke, "The effect of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes," *Environ. Toxicol. Chem.*, vol. 26, no. 7, p. 1454, 2007.
- [372] B. M. Sanders and L. S. Martin, "Copper inhibits the induction of stress protein synthesis by elevated temperatures in embryos of the sea urchin *Strongylocentrus purpuratus*," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, vol. 109, no. 3, pp. 295–307, 1994.
- [373] M. Abdel-Tawwab and M. Wafeek, "Influence of water temperature and waterborne cadmium toxicity on growth performance and metallothionein-cadmium distribution in different organs of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.)," *J. Therm. Biol.*, vol. 45, no. 0, pp. 157–162, 2014.
- [374] P. W. Perschbacher, "Temperature effects on acute copper toxicity to juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus*," *Aquaculture*, vol. 243, no. 1–4, pp. 225–228, 2005.
- [375] R. Osterauer and H. R. Köhler, "Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 86, no. 4, pp. 485–494, 2008.
- [376] M. D. Ferrando, E. Andreu-Moliner, M. M. Almar, C. Cebrian, and a. Nuñez, "Acute toxicity of organochlorined pesticides to the European eel, *Anguilla anguilla*: The dependency on exposure time and temperature," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 39, no. 3, pp. 365–369, 1987.
- [377] G. Gluth and W. Hanke, "A comparison of physiological changes in Carp, *Cyprinus carpio*, induced by several pollutants at sublethal concentration - II. The dependency on the temperature," *Comp. Biochem. Physiol. - C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.*, vol. 79, no. 1, pp. 39–45, 1984.
- [378] F. V. Paladino, J. R. Spotila, J. P. Schubaur, and K. T. Kowalski, "The critical thermal maximum: A technique used to elucidate physiological stress and adaptation in fishes," *Rev Can Biol*, vol. 39, pp. 115–122, 1980.
- [379] D. Watenpugh and T. Beitinger, "Se exposure and temperature tolerance of fathead minnows, *Pimephales promelas*," *J. Therm. Biol.*, vol. 10, no. 2, pp. 83–86, 1985.
- [380] M. Lydy and T. Wissing, "Effect of sublethal concentrations of copper on the critical thermal maxima (CTMax) of the fantail (*Etheostoma flabellare*) and johnny (*E. nigrum*) darters," *Aquat. Toxicol.*, vol. 12, no. 4, pp. 311–321, 1988.

- [381] D. T. Burton, E. L. Morgan, and J. Cairns, "Mortality Curves of Bluegills (*Lepomis macrochirus* Rafinesque) Simultaneously Exposed to Temperature and Zinc Stress," *Trans. Am. Fish. Soc.*, vol. 101, no. 3, pp. 435–441, 1972.
- [382] C. Becker and M. Wolford, "Thermal resistance of juvenile salmonids sublethally exposed to nickel, determined by the critical thermal maximum method," *Environ. Pollut. Ser. A, Ecol.*, vol. 31, no. 3, pp. 181–189, 1980.
- [383] G. Lannig, J. F. Flores, and I. M. Sokolova, "Temperature-dependent stress response in oysters, *Crassostrea virginica*: pollution reduces temperature tolerance in oysters.," *Aquat. Toxicol.*, vol. 79, no. 3, pp. 278–287, 2006.
- [384] C. D. S. Carvalho and M. N. Fernandes, "Effect of copper on liver key enzymes of anaerobic glucose metabolism from freshwater tropical fish *Prochilodus lineatus*," *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 151, no. 3, pp. 437–442, 2008.
- [385] M. Takada, K. Tachihara, T. Kon, G. Yamamoto, K. Iguchi, M. Miya, and M. Nishida, "Biogeography and evolution of the *Carassius auratus*-complex in East Asia.," *BMC Evol. Biol.*, vol. 10, p. 7, 2010.
- [386] T. Komiyama, H. Kobayashi, Y. Tatenno, H. Inoko, T. Gojobori, and K. Ikeo, "An evolutionary origin and selection process of goldfish," *Gene*, vol. 430, no. 1–2, pp. 5–11, 2009.
- [387] J. E. DeKay, *Zoology of New-York, or the New-York fauna. Part IV. Fishes*. Albany, NY, 1842.
- [388] W. R. Courtenay and J. R. Stauffer, "The Introduced Fish Problem and the Aquarium Fish Industry," *J. World Aquac. Soc.*, vol. 21, no. 3, pp. 145–159, 1990.
- [389] D. A. Hensley and W. R. Courtenay Jr., "Carassius auratus (Linnaeus) Goldfish," in *Atlas of North American Fresh Water Fishes*, North Caro., D. S. Lee, C. R. Gilbert, C. H. Hocutt, R. E. Jenkins, D. E. McAllister, and J. R. Stauffer Jr., Eds. North Carolina State Museum of Natural History, 1979, p. 147.
- [390] P. Keith, H. Persat, E. Feunteun, and J. Allardi, *Les poissons d'eau douce de France*. Paris: Muséum National d'Histoire Naturelle, 2011.
- [391] J. Luo, Y. P. Zhang, C. L. Zhu, W. H. Xiao, and S. Y. Huang, "Genetic diversity in crucian carp (*Carassius auratus*).," *Biochem. Genet.*, vol. 37, no. 9–10, pp. 267–279, 1999.
- [392] M. J. Richardson, F. G. Whoriskey, and L. H. Roy, "Turbidity generation and biological impacts of an exotic fish *Carassius auratus*, introduced into shallow seasonally anoxic ponds," *J. Fish Biol.*, vol. 47, no. 4, pp. 576–585, 1995.
- [393] F. E. J. Fry and J. S. Hart, "The relation of temperature to oxygen consumption in the goldfish.," *Anat. Rec.*, vol. 96, no. 4, p. 586, 1946.
- [394] G. van den Thillart, F. Kesbeke, and A. van Waarde, "Anaerobic energy-metabolism of goldfish, *Carassius auratus* (L.).," *J. Comp. Physiol.*, vol. 136, no. 1, pp. 45–52, 1980.
- [395] E. Hindle and F. L. Chow, "Experiments with malaria and mosquitoes in Shantung, China: With a note on the value of local species of fish for the destruction of Mosquito Larvae," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 23, no. 1, pp. 71–80, 1929.
- [396] F. R. Wilson, G. S. Whitt, and C. L. Prosser, "Lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase isozyme patterns in tissues of temperature-acclimated goldfish (*Carassius auratus* L.).," *Comp. Biochem. Physiol. B.*, vol. 46, no. 1, pp. 105–116, 1973.

- [397] a M. Vaccaro, R. Raschetti, G. Ricciardi, and G. Morpurgo, "Temperature adaptation at the hemoglobin level in *Carassius auratus*," *Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.*, vol. 52, no. 4, pp. 627–634, 1975.
- [398] H.-D. Xu, J.-S. Wang, M.-H. Li, Y. Liu, T. Chen, and A.-Q. Jia, "1H NMR based metabolomics approach to study the toxic effects of herbicide butachlor on goldfish (*Carassius auratus*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 159, no. 0, pp. 69–80, 2015.
- [399] C. Wang, G. Lu, J. Cui, and P. Wang, "Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 28, no. 3, pp. 414–419, 2009.
- [400] H. Shi, Y. Sui, X. Wang, Y. Luo, and L. Ji, "Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus*," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. & Pharmacol.*, vol. 140, no. 1, pp. 115–121, 2005.
- [401] H. Liu, W. Wang, J. Zhang, and X. Wang, "Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Carassius auratus*," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 65, no. 3, pp. 350–354, 2006.
- [402] J. Schjolden, J. Sørensen, G. E. Nilsson, and A. B. S. Poléo, "The toxicity of copper to crucian carp (*Carassius carassius*) in soft water," *Sci. Total Environ.*, vol. 384, no. 1–3, pp. 239–251, 2007.
- [403] R. Kreitsberg, J. Baršienė, R. Freiberg, L. Andreikėnaitė, T. Tammaru, K. Rumvolt, and A. Tuvikene, "Biomarkers of effects of hypoxia and oil-shale contaminated sediments in laboratory-exposed gibel carp (*Carassius auratus gibelio*)," *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, vol. 98, no. 0, pp. 227–235, 2013.
- [404] G. H. Lu, Y. Ji, H. Z. Zhang, H. Wu, J. Qin, and C. Wang, "Active biomonitoring of complex pollution in Taihu Lake with *Carassius auratus*," *Chemosphere*, vol. 79, no. 5, pp. 588–594, 2010.
- [405] D. a. Devault, M. Gérino, C. Laplanche, F. Julien, P. Winterton, G. Merlina, F. Delmas, P. Lim, J. Miguel Sánchez-Pérez, and E. Pinelli, "Herbicide accumulation and evolution in reservoir sediments," *Sci. Total Environ.*, vol. 407, no. 8, pp. 2659–2665, 2009.
- [406] T. Debenest, "Characterization of the impact of agricultural pollution on benthic diatoms (in French)," Université de Bordeaux, France, 2007.
- [407] Eau-Evolution, "Pesticides in surface waters in 2007 - Water agencies data (in French)," 2007. [Online]. Available: http://eau-evolution.fr/doc/articles.php?lien=eau_carte_qualite_france_riviere_pesticide_micropolluant.
- [408] M. Garmouma, M. J. Teil, M. Blanchard, and M. Chevreuil, "Spatial and temporal variations of herbicide (triazines and phenylureas) concentrations in the catchment basin of the Marne river (France)," *Sci. Total Environ.*, vol. 224, no. 1–3, pp. 93–107, 1998.
- [409] W. a Battaglin, E. T. Furlong, M. R. Burkhardt, and C. J. Peter, "Occurrence of Sulfonylurea , Sulfonamide , Imidazolinone , and other Herbicides in Midwestern Rivers , Reservoirs , and Ground Water , 1998," *Sci Total Env.*, vol. 1, no. 2–3, pp. 1–11, 1998.
- [410] O. Croze, E. Blot, and L. Delmouly, "Evolution de la température de l'eau de la Garonne au cours des 3 dernières décennies (1977-2005)," 2007.
- [411] A. I. Dell, J. A. Bender, K. Branson, I. D. Couzin, G. G. de Polavieja, L. P. J. J. Noldus, A. Pérez-Escudero, P. Perona, A. D. Straw, M. Wikelski, and U. Brose, "Automated image-based tracking and its application in ecology," *Trends Ecol. Evol.*, vol. 29, no. 7, pp. 417–428, 2014.
- [412] "Virtualdub software," 2015. [Online]. Available: <http://www.virtualdub.org/>. [Accessed: 03-Nov-2015].

- [413] A. Cold and V. E. Forbes, "Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*," *Aquat. Toxicol.*, vol. 67, no. 3, pp. 287–299, 2004.
- [414] E. Capkin, I. Altinok, and S. Karahan, "Water quality and fish size affect toxicity of endosulfan, an organochlorine pesticide, to rainbow trout," *Chemosphere*, vol. 64, no. 10, pp. 1793–1800, 2006.
- [415] G. Muenchow, S. Ecology, N. Feb, and G. Muenchow, "Ecological use of failure time analysis.," *Ecology*, vol. 67, no. 1, pp. 246–250, 1986.
- [416] S. Chellappa, F. A. Huntingford, R. H. C. Strang, and R. Y. Thomson, "Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback," *J. Fish Biol.*, vol. 47, no. 5, pp. 775–787, 1995.
- [417] T. W. Moon and I. a. Johnston, "Starvation and the activities of glycolytic and gluconeogenic enzymes in skeletal muscles and liver of the plaice, *Pleuronectes platessa*," *J. Comp. Physiol. ??? B*, vol. 136, no. 1, pp. 31–38, 1980.
- [418] L. Pérez, D. S. Peñaranda, S. Dufour, S. Baloche, a. P. Palstra, G. E. E. J. M. Van Den Thillart, and J. F. Asturiano, "Influence of temperature regime on endocrine parameters and vitellogenesis during experimental maturation of European eel (*Anguilla anguilla*) females," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 174, no. 1, pp. 51–59, 2011.
- [419] A. P. Palstra and G. E. E. J. M. van den Thillart, "Swimming physiology of European silver eels (*Anguilla anguilla* L.): Energetic costs and effects on sexual maturation and reproduction," *Fish Physiol. Biochem.*, vol. 36, no. 3, pp. 297–322, 2010.
- [420] D. E. Kime, "A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction," *Sci. Total Environ.*, vol. 225, no. 1–2, pp. 3–11, 1999.
- [421] W. M. De Coen and C. R. Janssen, "The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing. IV. Cellular Energy Allocation: A new methodology to assess the energy budget of toxicant-stressed *Daphnia* populations," *J. Aquat. Ecosyst. Stress Recover.*, vol. 6, no. 1, pp. 43–55, 1997.
- [422] N. G. C. Ferreira, R. Morgado, M. J. G. Santos, A. M. V. M. Soares, and S. Loureiro, "Biomarkers and energy reserves in the isopod *Porcellionides pruinosus*: The effects of long-term exposure to dimethoate," *Sci. Total Environ.*, vol. 502, pp. 91–102, 2015.
- [423] T. Verslycke, S. D. Roast, J. Widdows, M. B. Jones, and C. R. Janssen, "Cellular energy allocation and scope for growth in the estuarine mysid *Neomysis integer* (Crustacea: Mysidacea) following chlorpyrifos exposure: a method comparison," *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.*, vol. 306, no. 1, pp. 1–16, 2004.
- [424] V. Maes, "Le métabolisme énergétique chez un cyprinidé d'eau douce, le gardon *Rutilus rutilus*: vers le développement de nouveaux biomarqueurs en lien avec la contamination par des produits phytosanitaires," Université de Reims Champagne-Ardenne, 2014.
- [425] S. Babo and P. Vasseur, "In vitro effects of Thiram on liver antioxidant enzyme activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 22, no. 1, pp. 61–68, 1992.
- [426] W. H. Habig, M. J. Pabst, and W. B. Jakoby, "Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation," *J. Biol. Chem.*, vol. 249, no. 22, pp. 7130–7139, 1974.
- [427] C. Y. Lin, H. Wu, R. S. Tjeerdema, and M. R. Viant, "Evaluation of metabolite extraction strategies from tissue samples using NMR metabolomics," *Metabolomics*, vol. 3, no. 1, pp. 55–67, 2007.

- [428] H. Wu, A. D. Southam, A. Hines, and M. R. Viant, "High-throughput tissue extraction protocol for NMR- and MS-based metabolomics," *Anal. Biochem.*, vol. 372, no. 2, pp. 204–212, 2008.
- [429] B. M. Beckwith-Hall, J. T. Brindle, R. H. Barton, M. Coen, E. Holmes, J. K. Nicholson, and H. Antti, "Application of orthogonal signal correction to minimise the effects of physical and biological variation in high resolution ¹H NMR spectra of biofluids," *Analyst*, vol. 127, no. 10, pp. 1283–1288, 2002.
- [430] J. Marchand, L. Quiniou, R. Riso, M.-T. Thebaut, and J. Laroche, "Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast," *Aquat. Toxicol.*, vol. 70, no. 4, pp. 327–343, 2004.
- [431] P. Calow, "Physiological costs of combating chemical toxicants: Ecological implications," *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.*, vol. 100, no. 1–2, pp. 3–6, 1991.
- [432] S. S. Killen, S. Marras, M. R. Ryan, P. Domenici, and D. J. McKenzie, "A relationship between metabolic rate and risk-taking behaviour is revealed during hypoxia in juvenile European sea bass," *Funct. Ecol.*, vol. 26, no. 1, pp. 134–143, 2012.
- [433] C. Grassie, V. A. Braithwaite, J. Nilsson, T. O. Nilsen, H.-C. Teien, S. O. Handeland, S. O. Stefansson, V. Tronci, M. Gorissen, G. Flik, and L. O. E. Ebbesson, "Aluminum exposure impacts brain plasticity and behavior in Atlantic salmon (*Salmo salar*)," *J. Exp. Biol.*, vol. 216, no. 16, pp. 3148–3155, 2013.
- [434] S. D. Melvin and S. P. Wilson, "The utility of behavioral studies for aquatic toxicology testing: A meta-analysis," *Chemosphere*, vol. 93, no. 10, pp. 2217–2223, 2013.
- [435] M. E. Cook and P. a. Moore, "The effects of the herbicide metolachlor on agonistic behavior in the crayfish, *Orconectes rusticus*," *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 55, no. 1, pp. 94–102, 2008.
- [436] G. R. Scott and K. a. Sloman, "The effects of environmental pollutants on complex fish behaviour: Integrating behavioural and physiological indicators of toxicity," *Aquat. Toxicol.*, vol. 68, no. 4, pp. 369–392, 2004.
- [437] H. Shirakawa, S. Yanai, and A. Goto, "Lamprey larvae as ecosystem engineers: physical and geochemical impact on the streambed by their burrowing behavior," *Hydrobiologia*, vol. 701, no. 1, pp. 313–322, 2012.
- [438] B. K. Peoples, R. A. McManamay, D. J. Orth, and E. A. Frimpong, "Nesting habitat use by river chubs in a hydrologically variable Appalachian tailwater," *Ecol. Freshw. Fish*, vol. 23, no. 2, pp. 283–293, 2014.
- [439] E. N. Ieno, M. Solan, P. Batty, and G. J. Pierce, "How biodiversity affects ecosystem functioning: Roles of infaunal species richness, identity and density in the marine benthos," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 311, pp. 263–271, 2006.
- [440] K. Reise, "Sediment mediated species interactions in coastal waters," *J. Sea Res.*, vol. 48, no. 2, pp. 127–141, 2002.
- [441] P. De Vries, "Salmonid influences on rivers: A geomorphic fish tail," *Geomorphology*, vol. 157–158, pp. 66–74, 2012.
- [442] D. R. Montgomery, J. M. Buffington, N. P. Peterson, D. Schuett-Hames, and T. P. Quinn, "Stream-bed scour, egg burial depths, and the influence of salmonid spawning on bed surface mobility and embryo survival," *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 53, no. 5, pp. 1061–1070, 1996.
- [443] S.-J. Fu, L.-Q. Zeng, X.-M. Li, X. Pang, Z.-D. Cao, J.-L. Peng, and Y.-X. Wang, "The behavioural, digestive and metabolic characteristics of fishes with different foraging strategies.," *J. Exp. Biol.*, vol. 212, no. Pt 14, pp. 2296–302, 2009.

- [444] S. Péan, T. Daouk, C. Vignet, L. Lyphout, D. Leguay, V. Loizeau, M. L. Bégout, and X. Cousin, "Long-term dietary-exposure to non-coplanar PCBs induces behavioral disruptions in adult zebrafish and their offspring," *Neurotoxicol. Teratol.*, vol. 39, no. 0, pp. 45–56, 2013.
- [445] D. G. M. Wood-Gush and K. Vestergaard, "Exploratory behavior and the welfare of intensively kept animals," *J. Agric. Ethics*, vol. 2, no. 2, pp. 161–169, 1989.
- [446] J. L. T. Pestana, A. Ré, A. J. A. Nogueira, and A. M. V. M. Soares, "Effects of Cadmium and Zinc on the feeding behaviour of two freshwater crustaceans: *Atyaephyra desmarestii* (Decapoda) and *Echinogammarus meridionalis* (Amphipoda).," *Chemosphere*, vol. 68, no. 8, pp. 1556–62, 2007.
- [447] A. Alonso, H. J. De Lange, and E. T. H. M. Peeters, "Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor.," *Chemosphere*, vol. 75, no. 3, pp. 341–6, 2009.
- [448] L. Spanò, C. R. Tyler, R. van Aerle, P. Devos, S. N. . Mandiki, F. Silvestre, J.-P. Thomé, and P. Kestemont, "Effects of atrazine on sex steroid dynamics, plasma vitellogenin concentration and gonad development in adult goldfish (*Carassius auratus*)," *Aquat. Toxicol.*, vol. 66, no. 4, pp. 369–379, 2004.
- [449] G. Claireaux, D. M. Webber, J.-P. Lagardère, and S. R. Kerr, "Influence of water temperature and oxygenation on the aerobic metabolic scope of Atlantic cod (*Gadus morhua*)," *J. Sea Res.*, vol. 44, no. 3–4, pp. 257–265, 2000.
- [450] S. Como, C. Lefrancois, E. Maggi, F. Antognarelli, and C. Dupuy, "Behavioral responses of juvenile golden gray mullet *Liza aurata* to changes in coastal temperatures and consequences for benthic food resources," *J. Sea Res.*, vol. 92, pp. 66–73, 2013.
- [451] X. Pang, Z. D. Cao, and S. J. Fu, "The effects of temperature on metabolic interaction between digestion and locomotion in juveniles of three cyprinid fish (*Carassius auratus*, *Cyprinus carpio* and *Spinibarbus sinensis*)," *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.*, vol. 159, no. 3, pp. 253–260, 2011.
- [452] Q. P. Fitzgibbon, A. Strawbridge, and R. S. Seymour, "Metabolic scope, swimming performance and the effects of hypoxia in the mulloway, *Argyrosomus japonicus* (Pisces: Sciaenidae)," *Aquaculture*, vol. 270, no. 1, pp. 358–368, 2007.
- [453] M. Tedengren, B. Olsson, O. Reimer, D. C. Brown, and B. P. Bradley, "Heat pretreatment increases cadmium resistance and HSP 70 levels in Baltic Sea mussels," *Aquat. Toxicol.*, vol. 48, no. 1, pp. 1–12, 2000.
- [454] M. Karim, S. Puiseux-Dao, and M. Ederly, "Toxins and stress in fish: Proteomic analyses and response network," *Toxicol.*, vol. 57, no. 7–8, pp. 959–969, 2011.
- [455] C. J. Martyniuk and N. D. Denslow, "Towards functional genomics in fish using quantitative proteomics.," *Gen. Comp. Endocrinol.*, vol. 164, no. 2–3, pp. 135–141, 2009.
- [456] V. J. Nesatyy and M. J.-F. Suter, "Proteomics for the analysis of environmental stress responses in organisms.," *Environ. Sci. Technol.*, vol. 41, no. 20, pp. 6891–6900, 2007.
- [457] F. Silvestre, V. Gillardin, and J. Dorts, "Proteomics to assess the role of phenotypic plasticity in aquatic organisms exposed to pollution and global warming," *Integr. Comp. Biol.*, vol. 52, no. 5, pp. 681–694, 2012.
- [458] J. Parrington and K. Coward, "Use of emerging genomic and proteomic technologies in fish physiology," *Aquat. Living Resour.*, vol. 15, no. 3, pp. 193–196, 2002.

- [459] B. Domon and S. Broder, "Implications of New Proteomics Strategies for Biology and Medicine," *J. Proteome Res.*, vol. 3, no. 2, pp. 253–260, 2004.
- [460] M. J. Aardema and J. T. MacGregor, "Toxicology and genetic toxicology in the new era of “toxicogenomics”: impact of “-omics” technologies," *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, vol. 499, no. 1, pp. 13–25, 2002.
- [461] B. a Wetmore and B. A. Merrick, "Toxicoproteomics: proteomics applied to toxicology and pathology.," *Toxicol. Pathol.*, vol. 32, no. 6, pp. 619–642, 2004.
- [462] K. Fujisawa, S. Terai, Y. Hirose, T. Takami, N. Yamamoto, and I. Sakaida, "Senescence marker protein 30 (SMP30)/regucalcin (RGN) expression decreases with aging, acute liver injuries and tumors in zebrafish," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 414, no. 2, pp. 331–336, 2011.
- [463] M. V. Martinov, V. M. Vitvitsky, R. Banerjee, and F. I. Ataullakhanov, "The logic of the hepatic methionine metabolic cycle," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1804, no. 1, pp. 89–96, 2010.
- [464] L. Chen, Y. Zeng, H. Yang, T. D. Lee, S. W. French, F. J. Corrales, E. R. García-Trevijano, M. a. Avila, J. M. Mato, and S. C. Lu, "Impaired liver regeneration in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A.," *FASEB J.*, vol. 18, no. 7, pp. 914–916, 2004.
- [465] M. Frau, F. Feo, and R. M. Pascale, "Pleiotropic effects of methionine adenosyltransferases deregulation as determinants of liver cancer progression and prognosis," *J. Hepatol.*, vol. 59, no. 4, pp. 830–841, 2013.
- [466] H. A. Krebs, "The regulation of the release of ketone bodies by the liver," *Adv. Enzyme Regul.*, vol. 4, pp. 339–353, 1966.
- [467] J. C. Newman and E. Verdin, "Ketone bodies as signaling metabolites.," *Trends Endocrinol. Metab.*, vol. 25, no. 1, pp. 42–52, 2014.
- [468] J. L. Soengas and M. Aldegunde, "Energy metabolism of fish brain," *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 131, no. 3, pp. 271–296, 2002.
- [469] D.-S. Chen and K. M. Chan, "Changes in the protein expression profiles of the Hepa-T1 cell line when exposed to Cu²⁺," *Aquat. Toxicol.*, vol. 94, no. 3, pp. 163–176, 2009.
- [470] K. L. Schalinske and A. L. Smazal, "Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker.," *Adv. Nutr.*, vol. 3, no. 6, pp. 755–762, 2012.
- [471] M. A. Tischfield, G. Y. Cederquist, M. L. Gupta, and E. C. Engle, "Phenotypic spectrum of the tubulin-related disorders and functional implications of disease-causing mutations.," *Curr. Opin. Genet. Dev.*, vol. 21, no. 3, pp. 286–294, 2011.
- [472] Q. Sun, Y. Wang, Y. Zhang, F. Liu, X. Cheng, N. Hou, X. Zhao, and X. Yang, "Expression profiling reveals dysregulation of cellular cytoskeletal genes in HBx-induced hepatocarcinogenesis," *Cancer Biol. Ther.*, vol. 6, no. 5, pp. 668–674, 2007.
- [473] L. Castro-Sánchez, N. Agra, C. Llorente Izquierdo, O. Motiño, M. Casado, L. Boscá, and P. Martín-Sanz, "Regulation of 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase expression in hepatocellular carcinoma," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 45, no. 11, pp. 2501–2511, 2013.
- [474] J. Woodcock, C. Coolen, K. Goodwin, D. Baek, R. Bittman, M. Samuel, S. Pitson, and A. Lopez, "Destabilisation of

- dimeric 14-3-3 proteins as a novel approach to anti-cancer therapeutics,” *Oncotarget*, vol. 6, no. 16. pp. 14522–14536, 2015.
- [475] C.-H. Lee, W.-B. Ou, A. Mariño-Enriquez, M. Zhu, M. Mayeda, Y. Wang, X. Guo, A. L. Brunner, F. Amant, C. A. French, R. B. West, J. N. McAlpine, C. B. Gilks, M. B. Yaffe, L. M. Prentice, A. McPherson, S. J. M. Jones, M. A. Marra, S. P. Shah, M. van de Rijn, D. G. Huntsman, P. Dal Cin, M. Debiec-Rychter, M. R. Nucci, and J. A. Fletcher, “14-3-3 fusion oncogenes in high-grade endometrial stromal sarcoma,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 3, pp. 929–934, 2012.
- [476] M. G. Backlund, J. R. Mann, V. R. Holla, F. G. Buchanan, H.-H. Tai, E. S. Musiek, G. L. Milne, S. Katkuri, and R. N. DuBois, “15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase is down-regulated in colorectal cancer,” *J. Biol. Chem.*, vol. 280, no. 5, pp. 3217–3223, 2005.
- [477] A. K. Freeman and D. K. Morrison, “14-3-3 Proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, no. 7, pp. 681–587, 2011.
- [478] M. Li, J. Wang, Z. Lu, D. Wei, M. Yang, and L. Kong, “NMR-based metabolomics approach to study the toxicity of lambda-cyhalothrin to goldfish (*Carassius auratus*),” *Aquat. Toxicol.*, vol. 146, pp. 82–92, 2014.
- [479] F. J. Fernandez-Gomez, M. F. Galindo, M. Gómez-Lázaro, V. J. Yuste, J. X. Comella, N. Aguirre, and J. Jordán, “Malonate induces cell death via mitochondrial potential collapse and delayed swelling through an ROS-dependent pathway,” *Br. J. Pharmacol.*, vol. 144, no. 4, pp. 528–537, 2005.
- [480] G. D. Sherwood, J. B. Rasmussen, D. J. Rowan, J. Brodeur, and A. Hontela, “Bioenergetic costs of heavy metal exposure in yellow perch (*Perca flavescens*): in situ estimates with a radiotracer (¹³⁷Cs) technique,” *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, vol. 57, no. 2, pp. 441–450, 2000.
- [481] H. Arnold, H.-J. Pluta, and T. Braunbeck, “Simultaneous exposure of fish to endosulfan and disulfoton in vivo: ultrastructural, stereological and biochemical reactions in hepatocytes of male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*),” *Aquat. Toxicol.*, vol. 33, no. 1, pp. 17–43, 1995.
- [482] F. A. Guardiola, P. González-Párraga, J. Meseguer, A. Cuesta, and M. A. Esteban, “Modulatory effects of deltamethrin-exposure on the immune status, metabolism and oxidative stress in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.),” *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 36, no. 1, pp. 120–129, 2014.
- [483] C. Bacchetta, A. Rossi, A. Ale, M. Campana, M. J. Parma, and J. Cazenave, “Combined toxicological effects of pesticides: A fish multi-biomarker approach,” *Ecol. Indic.*, vol. 36, pp. 532–538, 2014.
- [484] S. Biagiante-Risbourg and J. Bastide, “Hepatic perturbations induced by a herbicide (atrazine) in juvenile grey mullet *Liza ramada* (Mugilidae, Teleostei): an ultrastructural study,” *Aquat. Toxicol.*, vol. 31, no. 3, pp. 217–229, 1995.
- [485] L. Faggiano, D. de Zwart, E. García-Berthou, S. Lek, and M. Gevrey, “Patterning ecological risk of pesticide contamination at the river basin scale,” *Sci. Total Environ.*, vol. 408, no. 11, pp. 2319–2326, 2010.
- [486] A. Fagotti, I. Di Rosa, F. Simoncelli, R. K. Pipe, F. Panara, and R. Pascolini, “The effects of copper on actin and fibronectin Organization in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes,” *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 20, no. 6, pp. 383–391, 1996.
- [487] E. Salas-Leiton, B. Cánovas-Conesa, R. Zerolo, J. López-Barea, J. P. Cañavate, and J. Alhama, “Proteomics of juvenile senegal sole (*Solea senegalensis*) affected by gas bubble disease in hyperoxygenated ponds,” *Mar. Biotechnol. (NY)*, vol. 11, no. 4, pp. 473–87, 2009.
- [488] K. Zatloukal, C. Stumptner, M. Lehner, H. Denk, H. Baribault, L. G. Eshkind, and W. W. Franke, “Cytokeratin 8 protects

- from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies.," *Am. J. Pathol.*, vol. 156, no. 4, pp. 1263–1274, 2000.
- [489] J. F. Reichard and A. Puga, "Effects of arsenic exposure on DNA methylation and epigenetic gene regulation," *Epigenom.*, vol. 2, no. 1, pp. 87–104, 2010.
- [490] J. R. Weidman, D. C. Dolinoy, S. K. Murphy, and R. L. Jirtle, "Cancer Susceptibility: Epigenetic Manifestation of Environmental Exposures," *Cancer J.*, vol. 13, no. 1, pp. 9–16, 2007.
- [491] Y. Xie, J. Liu, L. Benbrahim-Tallaa, J. M. Ward, D. Logsdon, B. a. Diwan, and M. P. Waalkes, "Aberrant DNA methylation and gene expression in livers of newborn mice transplacentally exposed to a hepatocarcinogenic dose of inorganic arsenic," *Toxicology*, vol. 236, no. 1–2, pp. 7–15, 2007.
- [492] M. Esteller, "Relevance of DNA methylation in the management of cancer," *Lancet Oncol.*, vol. 4, no. 6, pp. 351–358, 2003.
- [493] C. O. Abernathy, Y. P. Liu, D. Longfellow, H. V. Aposhian, B. Beck, B. Fowler, R. Goyer, R. Menzer, T. Rossman, C. Thompson, and M. Waalkes, "Arsenic: health effects, mechanisms of actions, and research issues.," *Environ. Health Perspect.*, vol. 107, no. 7, pp. 593–597, 1999.
- [494] C. X. Zhong and M. J. Mass, "Both hypomethylation and hypermethylation of DNA associated with arsenite exposure in cultures of human cells identified by methylation-sensitive arbitrarily-primed PCR," *Toxicol. Lett.*, vol. 122, no. 3, pp. 223–234, 2001.
- [495] G. Liang, C. E. Salem, M. C. Yu, H. D. Nguyen, F. A. Gonzales, T. T. Nguyen, P. W. Nichols, and P. a Jones, "DNA methylation differences associated with tumor tissues identified by genome scanning analysis.," *Genomics*, vol. 53, no. 3, pp. 260–268, 1998.
- [496] J. H. Kamstra, P. Aleström, J. M. Kooter, and J. Legler, "Zebrafish as a model to study the role of DNA methylation in environmental toxicology.," *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, vol. 22, no. 21, pp. 16262–16276, 2014.
- [497] D. Li, C. Lu, J. Wang, W. Hu, Z. Cao, D. Sun, H. Xia, and X. Ma, "Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.," *Aquat. Toxicol.*, vol. 91, no. 3, pp. 229–37, 2009.
- [498] X. Fang, C. Thornton, B. E. Scheffler, and K. L. Willett, "Benzo[a]pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development.," *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 36, no. 1, pp. 40–50, 2013.
- [499] G. Lannig, A. S. Cherkasov, and I. M. Sokolova, "Temperature-dependent effects of cadmium on mitochondrial and whole-organism bioenergetics of oysters (*Crassostrea virginica*)," *Mar. Environ. Res.*, vol. 62, no. SUPPL. 1, pp. 79–82, 2006.
- [500] Y. Feng and P. Martin, "Imaging innate immune responses at tumour initiation: new insights from fish and flies.," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 15, no. 9, pp. 556–62, 2015.
- [501] M. Konantz, T. B. Balci, U. F. Hartwig, G. Dellaire, M. C. André, J. N. Berman, and C. Lengerke, "Zebrafish xenografts as a tool for in vivo studies on human cancer.," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1266, pp. 124–37, 2012.
- [502] A.-M. Cleten-Jansen, "Zebrafish models for studying bone cancers: mutants, transgenic fish and embryos," in *Bone cancer: primary bone cancers and bone metastases*, D. Heymann, Ed. Elsevier, 2014, pp. 365–370.
- [503] G. J. Weber, M. S. Sepúlveda, S. M. Peterson, S. S. Lewis, and J. L. Freeman, "Transcriptome alterations following developmental atrazine exposure in zebrafish are associated with disruption of neuroendocrine and reproductive

system function, cell cycle, and carcinogenesis.," *Toxicol. Sci.*, vol. 132, no. 2, pp. 458–66, 2013.

- [504] D. W. Gammon, C. N. Aldous, W. C. Carr, J. R. Sanborn, and K. F. Pfeifer, "A risk assessment of atrazine use in California: human health and ecological aspects.," *Pest Manag. Sci.*, vol. 61, no. 4, pp. 331–55, 2005.
- [505] T. Ratcliff, "Untraited sewerage pours into a river in Bangkok, Thailand."
- [506] I. Walsh, "Fishing Farm, Jian De, Hangzhou, Shanghai." Flickr, 2009.
- [507] M. Karatay, "African fish eagle just caught a cat fish in Lake Baringo, Kenya." 2006.
- [508] Sergio Aquindo, "Poisson au masque à gaz."
- [509] R. Sanders and E. Kirby, "Stress puts double whammy on reproductive system," *UC Berkeley News*, 2009.
- [510] M. Cannas, "Effets des polychlorobiphényles et de l'hypoxie sur l'énergétique, les performances cardiaques et le comportement anti-prédateur chez les juvéniles de sole commune (*Solea solea*)," Université de La Rochelle, La Rochelle, France, 2011.
- [511] E. Stokstad and G. Grullon, "Infographic: Pesticide Planet," *Science (80-.)*, vol. 341, no. 6147, pp. 730–731, 2013.
- [512] Ministère de l'Ecologie du Développement Durable et de l'Ecologie, "Questions / Réponses sur les pesticides." [Online]. Available: <http://www.developpement-durable.gouv.fr/-Questions-Reponses-sur-les,3225-.html>. [Accessed: 22-Sep-2015].
- [513] A. Beaufort, "Modélisation physique de la température des cours d'eau à l'échelle régionale : Application au bassin versant de la Loire," Université François Rabelais de Tours, 2015.
- [514] FRPPMA, "Analyse du régime thermique des cours d'eau des bassins versants du Sornin et de la Grosne (Département du Rhône)," 2013.
- [515] IPCC, *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Geneva, Switzerland, Switzerland: IPCC, 2014.
- [516] E. A. Hemmingsen and E. L. Douglas, "Respiratory and circulatory responses in a hemoglobin-free fish, *Chaenocephalus aceratus*, to changes in temperature and oxygen tension," *Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.*, vol. 43, no. 4, pp. 1031–1043, 1972.
- [517] D. A. Righton, K. H. Andersen, F. Neat, V. Thorsteinsson, P. Steingrund, H. Svedäng, K. Michalsen, H. H. Hinrichsen, V. Bendall, S. Neuenfeldt, P. Wright, P. Jonsson, G. Huse, J. Van Der Kooij, H. Mosegaard, K. Hüsey, and J. Metcalfe, "Thermal niche of Atlantic cod *Gadus morhua*: Limits, tolerance and optima," *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 420, pp. 1–13, 2010.
- [518] J. M. Elliott, "Some aspects of thermal stress on freshwater teleosts," in *Stress and fish*, A. D. Pickering, Ed. Academic Press, 1981, pp. 209–245.
- [519] Bjwebb, "Common goldfish." 2006.
- [520] T. Hawk, "Laws of Nature." 2006.

- [521] B. Kua, "Goldfish." 2008.
- [522] Kenpei, "Carassius auratus." Wikimedia, 2008.
- [523] WebPage, "Brian's Aquarium Care." [Online]. Available: <http://briansaquariumcare.com/goldfishmyths.html>.
- [524] AFP, "Le japon crée un poisson rouge transparent," *Le Figaro*, 31-Dec-2009.
- [525] NouvelObs, "Carte de france." [Online]. Available: <http://referentiel.nouvelobs.com/file/7196897.jpg>.
- [526] Sénat, "Carte de Midi-Pyrénées," *Sénat*. [Online]. Available: <http://www.senat.fr/rap/l14-160/l14-1603.html>.
- [527] D. Taillefer, "La Garonne."
- [528] Agreste, "Carte de l'agriculture en région Midi-Pyrénées." [Online]. Available: <http://agreste.agriculture.gouv.fr/en-region/midi-pyrenees/>.
- [529] M. Bouhifd, T. Hartung, H. T. Hogberg, A. Kleensang, and L. Zhao, "Review: Toxicometabolomics," *J. Appl. Toxicol.*, vol. 33, no. 12, pp. 1365–1383, 2013.

Note: les photographies utilisées sont sous licence Common Creative autorisant la libre utilisation.



RÉSUMÉ/ABSTRACT

RESUME

Les changements climatiques et l'émission de polluants dans l'environnement sont susceptibles d'entraîner des effets croisés sur les communautés et le fonctionnement des écosystèmes. Les changements de température sont notamment susceptibles de modifier le comportement et la toxicité des polluants, et de sensibiliser les organismes aux stress chimiques. Inversement, l'exposition à des polluants peut diminuer la tolérance thermique des espèces ectothermes comme les poissons. Dans ce contexte, nous avons étudié la réponse d'une espèce modèle de poissons en toxicologie aquatique, le Carassin doré (*Carassius auratus*), soumis à des stress chimique et thermique individuels et combinés. Pour cela, le carassin doré a été exposé à un cocktail d'herbicides et de fongicides à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental à deux températures pendant 96h ou 16 jours. Les réponses ont été observées de l'échelle moléculaire à l'échelle individuelle par des approches omiques (protéomique et métabolomique), biochimiques (cortisol, biomarqueurs de stress oxydant et allocation cellulaire énergétique), indicielles (indices somatiques et de condition) et comportementales (remaniement sédimentaire, activité, exploration et comportement alimentaire). Les résultats montrent que l'exposition des poissons aux stress chimique et thermique individuels entraîne une réponse générale de stress impliquant des compensations biochimiques, énergétiques, physiologiques et comportementales. L'absence d'effets sur la santé générale des carassins suggère la mise en place d'une réponse de stress efficace et adaptée, bien que l'hypoactivité observée chez les poissons exposés aux cocktails de pesticides soit susceptible d'entraîner une diminution de leurs performances et de leur fitness. A l'inverse, les carassins exposés aux stress chimique et thermique combinés montrent une inhibition de la réponse générale de stress, avec des effets antagonistes sur la sécrétion de cortisol, l'induction de certains systèmes de défense antioxydants et la compensation énergétique. Des effets plus importants sont en revanche observés au niveau comportemental ainsi qu'une diminution significative de la condition générale des poissons. Ces résultats montrent que l'augmentation de la température sensibilise les poissons à la contamination de l'eau par les pesticides. L'inhibition de la réponse de stress chez des poissons exposés à des mélanges complexes de pesticides dans un écosystème soumis à de multiples contraintes pose de nombreuses questions pour la conservation des espèces dans l'environnement.

Mots-clés : Herbicides, Fongicides, Changements climatiques, Réponse de stress, *Carassius auratus*, Etude multi-échelles.

ABSTRACT

Crossed-effects between climate change and chemical pollutions were identified on community structure and ecosystem functioning. Temperature rising affect the toxic properties of pollutants and the sensitiveness of organisms to chemicals stress. Inversely, chemical exposure may decrease the thermal tolerance of ectothermic species, as fish. In this context, we studied the response of a biological model in aquatic toxicology, the goldfish (*Carassius auratus*), to individual and combined chemical and thermal stresses. In this aim, we exposed the goldfish to environmental relevant concentrations of herbicide and fungicide mixtures at two temperatures for 96 hours or 16 days. The fish responses were assessed from the molecular level to individual endpoints, including omic approaches (proteomic and metabolomic), biochemical analyses (cortisol, antioxidant defenses, cellular energy allocation), indexes (somatic and condition factors) and behavioral assays (sediment reworking, activity, exploration and feeding). Our results showed that individual chemical or thermal stresses induced a general stress response including biochemical, metabolic, physiological and behavioral compensations. The absence of deleterious effect on the global condition of fish suggested the implementation of an efficient and adaptive stress response, while the hypoactivity of fish exposed to pesticide mixtures could entrain a decreased performance and fitness into the wild. At the opposite, the combined chemical and thermal stresses induced reciprocal inactivation of the stress response, with antagonism effect on cortisol secretion, antioxidant defense induction and metabolic compensation. However, increased effect on behavioral traits and decreased global condition of fish were observed. Our study showed that temperature rising sensitized fish to pesticide exposure. Finally, inhibited stress response in fish exposed to pesticide cocktails raises concerns about species conservation an ecosystem under multiple pressures.

Key words: Herbicides, Fungicides, Climate Change, Stress response, *Carassius auratus*, Multi-level study.