



HAL
open science

Désordres métaboliques et conséquences multigénérationnelles liés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens chez un modèle d'amphibien : (*Xenopus tropicalis*)

Christophe Regnault

► **To cite this version:**

Christophe Regnault. Désordres métaboliques et conséquences multigénérationnelles liés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens chez un modèle d'amphibien : (*Xenopus tropicalis*). Ecotoxicologie. Université Grenoble Alpes, 2016. Français. NNT : 2016GREAS030 . tel-02426008

HAL Id: tel-02426008

<https://theses.hal.science/tel-02426008>

Submitted on 1 Jan 2020

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

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Modèles, méthodes et algorithmes en biologie et santé**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Christophe REGNAULT

Thèse dirigée par **Muriel RAVETON** et
codirigée par **Stéphane REYNAUD**

préparée au sein du **Laboratoire d'écologie alpine**
dans l'**École doctorale ingénierie pour la santé, la cognition et l'environnement**

Désordres métaboliques et conséquences multigénérationnelles liés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens chez un modèle d'amphibien (*Xenopus tropicalis*)

Thèse soutenue publiquement le **vendredi 18 mars 2016**,
devant le jury composé de :

M. Patrick PRUNET

Directeur de recherche, INRA, Rennes – Président

M^{me} Magalie BAUDRIMONT-LARUE

Professeure des universités, Université de Bordeaux – Rapporteur

M. Patrick KESTEMONT

Professeur des universités, Université de Namur – Rapporteur

M. Jean-Baptiste FINI

Chargé de recherche, CNRS, Paris – Examineur

M^{me} Muriel RAVETON

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes – Directrice de thèse

M. Stéphane REYNAUD

Maître de conférences, Université Grenoble Alpes – Directeur de thèse



Table des matières

Liste des figures	ix
Liste des tableaux	xi
Liste des sigles et abréviations	xiii
Avant-propos	xv
Remerciements	xvii
1 Introduction générale	1
1.1 Les amphibiens : généralités et diversité	3
1.1.1 Figures du folklore et repères culturels.....	3
1.1.2 Une histoire vieille de 370 millions d'années	5
1.1.3 Des habitudes de vie diversifiées	8
1.1.4 Une morphologie adaptée pour chaque habitude de vie.....	15
1.2 Le déclin massif des populations d'amphibiens	19
1.2.1 Au cœur de la sixième extinction massive	19
1.2.2 Statut global des populations d'amphibiens.....	21
1.2.3 Pourquoi « sauver » les amphibiens ?.....	23
1.2.4 Le déclin : une cause multifactorielle	28
1.3 Les perturbateurs endocriniens	40
1.3.1 Une terminologie récente.....	40
1.3.2 Une remise en cause du principe de Paracelse et de linéarité.....	41
1.3.3 La perturbation endocrine chez les amphibiens.....	42
1.4 Les modèles biologique et chimiques de l'étude	50
1.4.1 Le xénope, grenouille modèle de laboratoire.....	50
1.4.2 Le benzo[<i>a</i>]pyrène.....	53
1.4.3 Le triclosan.....	60
1.5 Les objectifs et la structure de l'étude	67

2 Effets à court terme de l'exposition aux perturbateurs endocriniens	71
2.1 Introduction	73
2.2 Impaired liver function in <i>Xenopus tropicalis</i> exposed to benzo[a]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence	77
2.2.1 Background.....	77
2.2.2 Methods.....	79
2.2.3 Results.....	89
2.2.4 Discussion.....	103
2.2.5 Conclusions.....	108
2.2.6 Abstract	110
2.3 Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in <i>Xenopus tropicalis</i>.	112
2.3.1 Introduction.....	112
2.3.2 Experimental	114
2.3.3 Result and discussion	121
2.3.4 Conclusion	133
2.3.5 Abstract	135
Highlights.....	135
Statement of novelty	136
Acknowledgements	136
2.4 Conclusion	137
3 Effets multigénérationnels de l'exposition aux perturbateurs endocriniens	141
3.1 Objectif de l'étude et approche expérimentale	143
3.2 Méthodologie	145
3.2.1 Maintenance des xénopes	145
3.2.2 Suivi de la croissance des xénopes de la génération F0.....	148
3.2.3 Étude de la transcription des gènes hépatiques des femelles F0.....	149
3.2.4 Analyses phénotypiques des xénopes femelles F0	153
3.2.5 Age à la maturité sexuelle et reproduction des xénopes F0.....	159
3.2.6 Suivi du développement et de la croissance des xénopes F1	161
3.2.7 Validations statistiques	161
3.3 Résultats	162
3.3.1 Mesures des concentrations réelles dans les milieux d'exposition.....	162
3.3.2 Effets sur le développement et la croissance des xénopes F0.....	163
3.3.3 Effets sur le profil transcriptionnel hépatique des femelles F0.....	166
3.3.4 Effets sur certains paramètres physiologiques des femelles F0	179
3.3.5 Effets sur la maturité sexuelle et la reproduction des xénopes F0	184
3.3.1 Effets sur le développement et la croissance des xénopes F1.....	186

3.4	Discussion.....	190
3.4.1	Effets sur la croissance et la métamorphose des têtards exposés.....	190
3.4.2	Effets métaboliques sur les femelles adultes exposés.....	193
3.4.3	Effets sur la reproduction des parents et sur la descendance.....	199
3.5	Conclusion	202
4	Synthèse générale	203
4.1	Rappel des objectifs de la thèse.....	205
4.2	Rappel des principaux résultats	206
4.2.1	Conséquences de l'exposition à court terme.....	206
4.2.2	Conséquences de l'exposition à long terme	207
4.2.3	Expositions court terme <i>versus</i> expositions long terme	207
4.2.4	Conséquences sur le déclin des populations d'amphibiens	209
4.3	Perspectives de la thèse	213
4.3.1	Pour l'étude des conséquences sur la génération exposée F0	213
4.3.2	Pour l'étude des conséquences sur la descendance non exposée F1..	218
4.3.3	Vers une validation des observations sur des espèces de terrain	218
4.4	Conclusion finale	220
5	Références bibliographiques.....	221
	Annexe I : Genes hépatiques différentiellement transcrits chez les femelles exposées au BaP (10 µg.L⁻¹).....	261
	Annexe II : Genes hépatiques sous-transcrits chez les femelles F0 exposées au BaP (50 ng.L⁻¹) – F0.B.....	267
	Annexe III : Genes hépatiques sur-transcrits chez les femelles F0 exposées au BaP (50 ng.L⁻¹) – F0.B.....	271
	Annexe IV : Genes hépatiques sous-transcrits chez les femelles F0 exposées au TCS (50 ng.L⁻¹) – F0.T	275
	Annexe V : Genes hépatiques sur-transcrits chez les femelles F0 exposées au TCS (50 ng.L⁻¹) – F0.T	277
	Annexe VI : Genes hépatiques sous-transcrits chez les femelles F0 exposées au mélange BaP/TCS (50 ng.L⁻¹) – F0.M	279
	Annexe VII : Genes hépatiques sur-transcrits chez les femelles F0 exposées au mélange BaP/TCS (50 ng.L⁻¹) – F0.M	281

Liste des figures

Figure 1.1 : Les grenouilles à travers le monde et les cultures	4
Figure 1.2 : Arbre phylogénétique des familles d'amphibiens	7
Figure 1.3 : Les espèces d'Anura évoqués dans le chapitre 1	11
Figure 1.4 : Les espèces d'Apoda évoqués dans le chapitre 1	13
Figure 1.5 : Les espèces d'Urodela évoqués dans le chapitre 1	13
Figure 1.6 : Cartogramme représentant la distribution mondiale des espèces d' <i>Apoda</i>	15
Figure 1.7 : Cartogramme représentant la distribution mondiale des espèces d' <i>Urodela</i>	17
Figure 1.8 : Cartogramme de surface représentant la distribution mondiale des espèces d' <i>Anura</i>	18
Figure 1.9 : Pourcentage d'espèces d'amphibien menacées par pays	22
Figure 1.10 : La courbe dose-réponse en toxicologie	42
Figure 1.11 : L'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien.....	44
Figure 1.12 : Exemples de malformations développementales.....	44
Figure 1.13 : Exemples de perturbations de la glande thyroïde.....	45
Figure 1.14 : L'axe gonadotrope.....	47
Figure 1.15 : Exemples de démasculinisation/féminisation.....	48
Figure 1.16 : <i>Xenopus tropicalis</i> mâle et femelle.....	51
Figure 1.17 : Organigramme de la structure de l'étude.....	68
Figure 2.1 : Approche expérimentale développée dans la Publication I	74
Figure 2.2 : Approche expérimentale développée dans la Publication II	76
Figure 2.3 : Kinetics B _a P concentrations in water and metabolite concentrations in bile	89
Figure 2.4 : Sequencing and mapping statistics and differential transcription analysis	90
Figure 2.5 : Quantitative real-time PCR validation of mRNAseq data	91
Figure 2.6 : Map overview of significant changes in liver gene transcription	93
Figure 2.7 : Hierarchical clustering of cholesterol biosynthesis genes	95
Figure 2.8 : Kinetics of cholesterol concentration in bile.....	96
Figure 2.9 : Oil red staining for total lipid content measures in the livers	96
Figure 2.10 : Percentage of oil red area in the livers	97
Figure 2.11 : Hierarchical clustering of genes involved in insulin and gluconeogenesis pathways	97
Figure 2.12 : Glycaemia kinetics.....	98
Figure 2.13 : Hierarchical clustering of genes involved in MAPK and apoptosis processes	99
Figure 2.14 : TUNEL staining detecting apoptosis-induced DNA damage in hepatocytes	100
Figure 2.15 : Hematoxylin-eosine-safran (HES) staining of liver sections.....	101
Figure 2.16 : Hierarchical clustering of tight and adherent junction genes.....	102
Figure 2.17 : Histopathological changes in cell-cell contact.....	103

Figure 2.18 : Cellular pathways involved in <i>Xenopus tropicalis</i> hepatocyte responses to BaP	109
Figure 2.19 : Kinetics of BaP and TCS in water and metabolite concentrations in bile	122
Figure 2.20 : Carbohydrate metabolism disturbances induced by BaP and TCS	124
Figure 2.21 : Lipid metabolism disorder induced by BaP and TCS	125
Figure 2.22 : Cell-cell adhesion disturbance induced by BaP and TCS	128
Figure 2.23 : Innate immune system disturbance induced by BaP and TCS	130
Figure 2.24 : Cellularity and viability of splenocytes.....	131
Figure 2.25 : Phagocytic efficiency disorder induced by BaP and TCS.....	132
Figure 2.26 : Transcription of genes involved in sex steroid hormones	133
Figure 2.27 : Metabolic and immune impairments induced by BaP and TCS, a graphical abstract. .	134
Figure 3.1 : Approche expérimentale pour l'étude des effets à long terme et multigénérationnels ...	144
Figure 3.2 : Démarche expérimentale du traitement des données de séquençage sous Galaxy.....	152
Figure 3.3 : Courbe théorique obtenue lors de l'évation de la capacité oxydative mitochondriale ...	158
Figure 3.4 : Les caractères sexuels secondaires chez <i>Xenopus tropicalis</i>	159
Figure 3.5 : Discrimination des œufs non fécondés et des embryons en cours de développement..	160
Figure 3.6 : Nomenclature adoptée pour l'identification des individus des générations F0 et F1.....	162
Figure 3.7 : Têtard malformé de type courbure axiale et têtard sans malformation.....	163
Figure 3.8 : Survie des xénopes F0 au cours de l'exposition aux perturbateurs endocriniens.....	164
Figure 3.9 : Effets des perturbateurs endocriniens sur l'âge des xénopes F0 à la métamorphose.....	165
Figure 3.10 : Transcription différentielle des gènes chez les femelles exposées	168
Figure 3.11 : Modification du rapport hépato-somatique chez les femelles exposées.....	179
Figure 3.12 : Coloration ORO et contenu hépatique en lipides neutres dans le foie des femelles	180
Figure 3.13 : Pourcentage d'huile rouge après coloration ORO dans le foie des femelles.....	180
Figure 3.14 : Glycémie des xénopes femelles témoins et exposées aux perturbateurs endocriniens	181
Figure 3.15 : Réponses au test de tolérance au glucose des femelles	181
Figure 3.16 : Production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les femelles ..	182
Figure 3.17 : Coloration HE et altération de l'organisation histologique du foie des femelles.....	183
Figure 3.18 : Activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) sérique des xénopes femelles	183
Figure 3.19 : Effets sur l'âge de la maturité des mâles et des femelles xénopes F0.....	184
Figure 3.20 : Survie des xénopes de la génération F1	187
Figure 3.21 : Effets sur l'âge des xénopes de la génération F1 à la métamorphose	188
Figure 3.22 : Taille et masse des xénopes de la génération F1 à la métamorphose	189
Figure 4.1 : Bilan des perturbations physiologiques induites par le BaP et le TCS	211
Figure 4.2 : Activité du protéasome hépatique des femelles de la génération F0.....	214
Figure 4.3 : Activité de l'aconitase des femelles de la génération F0.....	215
Figure 4.4 : Aire sous les courbes du test de tolérance au glucose chez <i>Pelophylax kel. esculentus</i>	219

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Statut des populations d'amphibiens d'après la <i>Global Amphibian Assessment</i>	21
Tableau 1.2 : Nombre d'espèces d'amphibien menacées par les principales causes du déclin	29
Tableau 1.3 : Tableau de comparaison <i>Xenopus tropicalis</i> et <i>Xenopus laevis</i>	53
Tableau 1.4 : Caractéristiques physico-chimiques du benzo[a]pyrène	55
Tableau 1.5 : Concentrations en benzo[a]pyrène mesurées dans les eaux douces naturelles	56
Tableau 1.6 : Effets écotoxicologiques du benzo[a]pyrène sur les amphibiens.....	59
Tableau 1.7 : Caractéristiques physico-chimiques du triclosan	62
Tableau 1.8 : Concentrations en triclosan mesurées dans les effluents de stations d'épuration.....	63
Tableau 1.9 : Concentrations en triclosan mesurées dans les eaux douces naturelles	63
Tableau 1.10 : Effets écotoxicologiques du triclosan sur les amphibiens.....	66
Tableau 2.1 : Primer sequences used for RT-qPCR in mRNAseq data validation.	85
Tableau 2.2 : Pathway enrichment study based on genes differentially transcribed.....	94
Tableau 2.3 : Primer sequences used for RT-qPCR	118
Tableau 3.1 : Composition du milieu MMR 0,1X pour le maintien des xénopes	145
Tableau 3.2 : Interprétation des scores de qualité Phred établis lors du séquençage	149
Tableau 3.3 : Paramètres appliqués au nettoyage des séquences brutes par l'outil Trimmomatic	150
Tableau 3.4 : Paramètres appliqués à l'alignement des séquences sur le génome par TopHat 2 ..	151
Tableau 3.5 : Composition du tampon pour l'isolement des mitochondries de xénope	155
Tableau 3.6 : Composition du milieu respiratoire pour la mesure de la capacité oxydative.....	157
Tableau 3.7 : Composition du milieu respiratoire pour la mesure de la production de ROS.....	158
Tableau 3.8 : Évolution des concentrations de polluant dans les milieux contaminés	163
Tableau 3.9 : Malformations du rachis chez les têtards exposés aux perturbateurs endocriniens	164
Tableau 3.10 : Effectifs de xénopes F0 ayant atteint et terminé leur métamorphose	165
Tableau 3.11 : Mesures biométriques sur les xénopes métamorphosés de la génération F0.....	166
Tableau 3.12 : Données du séquençage, du filtrage qualitatif et de l'alignement des séquences ...	167
Tableau 3.13 : Voies métaboliques enrichies entre les femelles F0.Ø et les femelles F0.B.....	170
Tableau 3.14 : Voies métaboliques enrichies entre les femelles F0.Ø et les femelles F0.M	170
Tableau 3.15 : Voies métaboliques enrichies entre les femelles F0.Ø et les femelles F0.T.....	171
Tableau 3.16 : RT et catégorie associée aux gènes issus du transcriptome des femelles F0.B.....	175
Tableau 3.17 : RT et catégorie associée aux gènes issus du transcriptome des femelles F0.T.....	177
Tableau 3.18 : RT et catégorie associée aux gènes issus du transcriptome des femelles F0.M.....	178
Tableau 3.19 : Intensité respiratoire mitochondriale des xénopes femelles	182
Tableau 3.20 : Sex-ratio des populations de xénopes de la génération F0.....	185
Tableau 3.21 : Effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction des xénopes F0.....	186
Tableau 3.22 : Mesures biométriques sur les xénopes métamorphosés de la génération F1	188

Liste des sigles et abréviations

AhR	Récepteur aux hydrocarbures aromatiques
ALAT	Alanine aminotransférase
ALDOA	<i>Aldolase A</i>
BaP	Benzo[<i>a</i>]pyrène
CBT1	<i>Carnitine palmitoyltransferase 1B</i>
CYP	Cytochrome P450
DAVID	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
ED	<i>Endocrine disruptors</i> ; perturbateurs endocriniens
ER	Réticulum endoplasmique
F0.Ø	Individu témoin de la génération parentale 0
F0.B	Individu exposé au benzo[<i>a</i>]pyrène de la génération parentale 0
F0.T	Individu exposé au triclosan de la génération parentale 0
F0.M	Individu exposé au mélange de polluants de la génération parentale 0
F1.Ø	Descendant des individus témoins
F1.B	Descendant des individus exposés au benzo[<i>a</i>]pyrène
F1.T	Descendant des individus exposés au triclosan
F1.M	Descendant des individus exposés au mélange de polluants
FABP1	<i>Fatty acid binding protein 1</i>
FASN	<i>Fatty acid synthase</i>
G6PC	<i>Glucose-6-phosphatase</i>
GCK	<i>Glucokinase</i>
GC-MS	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse
GO	<i>Gene Ontology</i>

HAP	Hydrocarbure aromatique polycyclique
hCG	Hormone chorionique gonadotrope
HE	Hématoxyline-érythrosine
HES	Hématoxyline-éosine-safran
HMGCR	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-CoA Reductase</i>
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IR	Insulino-résistance
IUCN	<i>International Union for Conservation of Nature</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
LSS	<i>Lanosterol synthase</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
mRNAseq	Séquençage massif des ARN messagers
NAFLD	<i>Non alcoholic fatty liver disease</i> ; Stéatopathie non alcoolique
NASH	<i>Non-alcoholic steatohepatitis</i> ; Stéato-hépatite non alcoolique
ORO	<i>Oil red O</i> ; Huile rouge
PCK1	<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1</i>
PPARGC1A	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Espèces réactives de l'oxygène
RT	Ratio de transcription
RT-qPCR	<i>Reverse transcription - quantitative polymerase chain reaction</i>
SEM	<i>Standard error of the mean</i> - Erreur type
SREBP	<i>Sterol regulatory element-binding protein</i>
TCS	Triclosan
TG	Triglycéride
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
UCP	<i>Uncoupling protein</i>

Avant-propos

Cette thèse, déposée à l'École Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement (EDISCE) de l'Université Grenoble-Alpes (UGA), résume les travaux réalisés entre octobre 2012 et septembre 2015 au sein de l'équipe Pollution, Environnement, Écotoxicologie et Écoremédiation (P3E) du Laboratoire d'Écologie Alpine (LECA).

Cette thèse a été soutenue par un contrat ministériel d'allocataire de recherche. Les expérimentations ont été subventionnées par un fonds d'intervention de l'UGA, par un Projet Exploratoire Premier Soutien (PEPS, 2012) de l'Institut Écologie Environnement du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS-INEE), par un projet interface du LECA, ainsi que le soutien de l'Institut Fédératif de Recherche en Biologie Environnementale et Systémique (IFR BEeSy). En 2013, un projet soutenu par le Laboratoire d'Excellence (LabEx) OSUG@2020 (ANR10 LABX56, Observatoire des Science de l'Univers de Grenoble) a financé un séjour de trois semaines au Canada (Laval, QC) pour une formation en immunotoxicologie au sein de l'Institut National de la Recherche Scientifique, Institut Armand-Frappier (INRS-IAF). Les expérimentations « long terme » présentées dans ce mémoire ont été conduites dans les locaux pilotes de la société de services en écotoxicologie Rovaltain Research Company (Alixan, France).



Cette thèse a été couplée à une activité complémentaire d'enseignement développée sur l'UFR de chimie et de biologie de l'UGA, dans le cadre du label Recherche et Enseignement Supérieur (RES) organisé par le Collège des Écoles Doctorales de Grenoble. Elle a également été l'occasion de l'encadrement d'une stagiaire de première année de master Ingénierie, Santé et Médicament (ISM) du secteur santé de l'UGA.

Ces travaux ont donné lieu à la rédaction de deux articles publiés, à trois communications par affiches et sept communications orales lors de symposium nationaux (journée scientifique de l'EDISCE 2014 ; congrès BEeSy 2013 ; congrès de la fondation Rovaltain 2014, 2015 ; journées thématiques santé environnement santé des écosystèmes 2015) et internationaux (EcoBIM 2013, 2014, 2015).

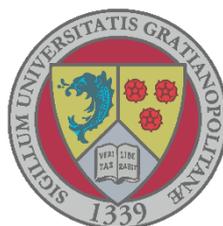
Ce mémoire de thèse se présentera sous la forme d'une thèse sur articles. Néanmoins, dans un souci d'uniformisation de la mise en page sur l'ensemble du document, les articles publiés seront reformatés. Leur contenu ne sera cependant pas été modifié.

Ils seront précédés d'un chapitre introductif de présentation des amphibiens et de leur phylogénie, des services qu'ils rendent dans les écosystèmes et des menaces qui pèsent sur leurs populations et qui sont à l'origine de leur déclin mondial. Cette introduction générale abordera ensuite les perturbateurs endocriniens et leurs effets sur les amphibiens. Enfin, les modèles biologique (*Xenopus tropicalis*) et chimiques (le benzo[a]pyrène et le triclosan) utilisés dans nos études seront présentés au cours de ce chapitre 1.

Les articles, constituant le chapitre 2 de ce mémoire, porteront sur les effets à court terme d'une exposition aux perturbateurs endocriniens benzo[a]pyrène et triclosan sur *Xenopus tropicalis*. Ils seront précédés d'une introduction sur la méthodologie adoptée et suivis d'une synthèse des résultats.

Le chapitre 3, portant sur les effets à long terme du benzo[a]pyrène et du triclosan sur *Xenopus tropicalis* (deux générations) et n'ayant pas encore fait l'objet de la rédaction d'article, sera présenté en français dans un format de thèse plus classique.

Enfin, le chapitre 4 sera une synthèse générale des travaux de thèse et comprendra une discussion générale des résultats, des perspectives de recherches et une conclusion.



Remerciements

Ces années à travailler sur ce projet ont été particulièrement passionnantes et m'ont permis de faire de magnifiques rencontres. Je sais maintenant que la thèse est tout sauf une aventure solitaire. Je n'aurais jamais pu effectuer ce travail doctoral sans l'aide, le soutien et l'amitié des personnes qui, en m'accordant leur temps et leurs connaissances, ont distillé leurs marques dans cette thèse.

En premier lieu je souhaite remercier de tout cœur **Muriel Raveton** et **Stéphane Reynaud**, mes directeurs de thèse. Vous m'avez fait confiance en me donnant l'opportunité d'entreprendre ce doctorat. Plus encore, vous m'avez guidé et accompagné durant toutes ces années. Je vous suis très reconnaissant pour votre disponibilité et le temps que vous m'avez accordé ainsi que pour vos qualités scientifiques et humaines. Stéphane, ton ouverture d'esprit et ta curiosité scientifique m'ont accompagné tout du long, et je garde avec amusement en mémoire tes réparties cinglantes lors des nombreux débats enflammés, scientifiques ou non, que nous avons eu au cours de ces années. Muriel, ta rigueur et ta précision m'ont été du plus grand support et ne sont pas étranger au rendu final de ce long travail. Tes cadrages photographiques improbables certes, mais au rendu de qualité, me permettent de partir avec d'excellents souvenirs des séjours que nous avons tous trois partagés à l'occasion de congrès. Ce sont vos enseignements en licence et en master qui m'ont sensibilisé à l'écotoxicologie et qui m'ont guidé dans cette voie. Vous m'avez également donné l'envie et l'occasion d'enseigner. Ce fut une expérience très enrichissante et vous avez, pour cela aussi, toute ma gratitude !

Je remercie vivement les membres de mon jury, **Magalie Baudrimont-Larue** et **Patrick Kestemont** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de rapporter cette thèse ainsi que **Jean-Baptiste Fini** et **Patrick Prunet** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de l'examiner et de l'évaluer.

Je tiens particulièrement à remercier chaleureusement **Sylvie Veyrenc**. Cela fait plus de cinq années que nous partageons le même bureau. Nos échanges et nos questionnements réguliers autour des expérimentations et de la littérature m'ont énormément apporté. Je dois me résoudre à manquer d'originalité et t'écrire que tu as bel et bien laissé ton empreinte dans mon travail doctoral. Bien que cela n'efface pas tes doutes, je profite également de ce paragraphe pour te féliciter du travail accompli au cours de ton propre projet EPHE.

J'adresse un grand merci à **Isabelle Worms**. Tu avais profondément favorisé mon intégration dans l'équipe lors de mon stage de master 1 et tu m'avais apporté, en plus des connaissances et de nombreux conseils, une confiance en moi que je ne pensais pas trouver. Cela a été pour moi une authentique fierté que de continuer durant cette thèse le projet que tu avais auparavant initié.

Merci aussi à **Sophie Sroda**. Ton arrivée au laboratoire a apporté un brin de folie très appréciable. Grâce à toi j'ai pris conscience de ce qu'est « réellement » l'écotoxicologie. Je te souhaite la réussite dans tes futurs projets professionnels et familiaux.

Je tiens à remercier les collaborateurs extérieurs au LECA rencontrés lors de mes travaux. Je remercie la société de recherche et de services en écotoxicologie et en toxicologie environnementale Rovaltain Research Company et plus particulièrement **Bruno Combourieu**, **Marie-Laure Bayle**, **David Lejon** et **Alexandre Sapin**. Merci pour votre support technique et votre sympathique accueil hebdomadaire durant les deux années du projet "long-terme". Merci à **Patrick Meresse** et **Nelly Bourin** du Centre Universitaire de Biologie Expérimentale (CUBE) pour votre disponibilité et votre soutien technique lors des expérimentations de cytométrie et lors des enseignements pratiques. Merci également à **Cécile Batandier** et **Karine Couturier** du Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale

et Appliquée (LBFA). Votre expertise de la mitochondriologie est à l'origine d'une collaboration des plus stimulantes. Je tiens également à remercier **John Willison** de l'Institut de Biosciences et Biotechnologies (CEA-Grenoble) pour son amabilité lors de notre collaboration pour le dosage des métabolites biliaires. Merci enfin à **Michel Fournier, Pauline Brousseau, Marlène Fortier** et **Laurie Gemme** de l'Institut Armand-Frappier de Laval-Canada pour leur accueil chaleureux et leur formation en immunotoxicologie passionnante.

Je remercie également les autres personnes du LECA qui par leur présence ont participé à la réalisation et à la logistique de mes travaux de thèse. Avant tout merci à **Antinéa Airieau** stagiaire efficace. Je ne m'étais pas rendu compte de la charge de travail que je t'avais confié et pourtant tu as relevé le défi avec talent. J'en profite aussi pour remercier **Marie Usal**, également stagiaire efficace, consciencieuse et sympathique. Merci à toutes les deux, je vous souhaite un brillant avenir sur le plan professionnel et personnel ! Merci à **Olivier Lontin** du service informatique et à **Florence Sagnimorte, Nancy Iacono, Marie Costarigot** et **Delphine Bourlier** du pôle administratif pour votre disponibilité, votre patience et votre amabilité. Merci à **Lucile Sage** pour ta gentillesse et pour tes coups de pouce financiers, à **Thierry Gaude** pour tes bons plans ski, bricolage et recyclage, à **Cindy Arnoldi** pour nos échanges amicaux au détour d'une salle d'expérimentation et à **Christian Miquel** pour ton humour caustique mais avant tout pour avoir pris en charge l'orchestration des travaux de réfection du laboratoire. Enfin, un amical remerciement à **Michel Tissut**, éternel « électro-blatte ». Discuter avec toi dans les couloirs, à proximité de l'imprimante, était à chaque fois une rupture imprévue mais bienvenue, l'occasion d'évoquer le passé et de discuter sur l'avenir.

Je ne peux oublier les amis et collègues qui m'ont accompagné ces dernières années : **Idir Akhouayri, Florian Alberto, Frédéric Boyer, Thibaut Capblancq, Alexia Chandor-Proust, Tristan Cumer, Fred Faucon, Mathieu Faure, Nicolas Legay, Tarfa Mustafa, Charles Pouchon, Sophie Prud'homme, Myriam Régent-Kloeckner, Renaud Stalinski** et **Guillaume Tetreau**. Je vous remercie chaleureusement pour les très bons instants passés à vos côtés, pour les discussions profondes et engagées ou pour les délires les plus absurdes. J'ai aussi une pensée émue pour **Serge Aubert**, un enseignant brillant et extrêmement pédagogue. Je pense notamment à ses sourires et éclats de rire lorsqu'il nous distribuait, non sans fierté, la dernière parution des cahiers illustrés du Lautaret.

Un énorme merci aux courageuses **Françoise Massy** et **Martine Roussel** qui ont accepté et accompli la délicate tâche de la relecture du mémoire de thèse en un temps très limité pendant la trêve des confiseurs.

La dernière partie de ces remerciements est adressée à mes proches. **Anthony Bosson** et **Delphine Rieutort** (félicitations !), **Fanny Donaz, Lauriane Grollier, Virginie Hyvert, Jean-Baptiste Philibert, Orlane Raffin** et **Yannick Régat**, mes amis des premiers jours de l'université qui ont participé d'année en année à mon cheminement jusqu'au doctorat. **Damien Massy** et **Fred Faucon**, trois ans et demi de thèse, trois ans et demi à vos côtés ! Cette collocation à la « *The Big Bang Theory* » fut une superbe expérience qui, je crois, m'a transformé. J'en retiens d'innombrables souvenirs, des très bons mais aussi quelques mélodies entêtantes !

Enfin je finirai par ceux qui comptent le plus à mes yeux. Mes parents qui m'ont permis de faire des études et qui m'ont accompagné et soutenu par leurs encouragements tout au long de ces années. Ils m'ont aussi donné le goût des sciences et de la nature et pour cela je remercie également mes grands-parents. J'ai une pensée toute tendre pour **Emma, Martin** et **Clémence**, que j'ai vu grandir au fil de ces années et qui étaient présents lors de la rédaction des derniers mots de ce mémoire. Je remercie évidemment leurs parents pour leur indéfectible soutien. Enfin j'ai une pensée toute particulière pour l'inattendue de mon aventure doctorale, celle avec qui je partage tant, celle qui m'aura inspiré et soutenu lorsque j'étais au bout du rouleau !

1 Introduction générale

1.1	Les amphibiens : généralités et diversité	3
1.1.1	Figures du folklore et repères culturels.....	3
1.1.2	Une histoire vieille de 370 millions d'années	5
1.1.3	Des modes de vie diversifiés	8
1.1.4	Une morphologie adaptée pour chaque mode de vie.....	15
1.1.4.1	Les <i>Apoda</i> : gymnophiones, cécilies	15
1.1.4.2	Les <i>Urodela</i> : salamandres, tritons, nectures, protées, sirènes	16
1.1.4.3	Les <i>Anura</i> : grenouilles, crapauds.....	17
1.2	Le déclin massif des populations d'amphibiens	19
1.2.1	Au cœur de la sixième extinction massive.....	19
1.2.2	Statut global des populations d'amphibiens.....	21
1.2.3	Pourquoi « sauver » les amphibiens ?.....	23
1.2.3.1	Les services d'approvisionnement	24
1.2.3.2	Les services de régulation.....	26
1.2.3.3	Les services culturels et aménités.....	27
1.2.3.4	Les services de soutien ou d'auto-entretien.....	28
1.2.4	Le déclin : une cause multifactorielle	28
1.2.4.1	Les changements climatiques.....	30
1.2.4.2	La fragmentation et la destruction des habitats.....	30
1.2.4.3	La surexploitation des espèces	32
1.2.4.4	L'introduction d'espèces invasives.....	33
1.2.4.5	L'émergence de pathogènes.....	34
1.2.4.6	La contamination chimique des milieux	36
1.3	Les perturbateurs endocriniens	40
1.3.1	Une terminologie récente.....	40
1.3.2	Une remise en cause du principe de Paracelse et de linéarité	41
1.3.3	La perturbation endocrine chez les amphibiens.....	42
1.3.3.1	Des effets sur le système thyroïdien.....	43
1.3.3.2	Des effets sur la fonction reproductrice	46
1.3.3.3	Des désordres métaboliques ?	49
1.4	Les modèles biologique et chimiques de l'étude	50
1.4.1	Le xénope, grenouille modèle de laboratoire.....	50
1.4.2	Le benzo[<i>a</i>]pyrène.....	53
1.4.2.1	Origine et devenir du benzo[<i>a</i>]pyrène dans l'environnement	54
1.4.2.2	Écotoxicité du benzo[<i>a</i>]pyrène sur les amphibiens.....	56
1.4.3	Le triclosan.....	60
1.4.3.1	Origine et devenir du triclosan dans l'environnement.....	60
1.4.3.2	Écotoxicité du triclosan sur les amphibiens.....	64
1.5	Les objectifs et la structure de l'étude	67

1.1 Les amphibiens : généralités et diversité

1.1.1 Figures du folklore et repères culturels

Les allusions aux amphibiens sont présentes dans de nombreuses civilisations à travers les âges et à travers le monde. Vénérés ou honnis, les amphibiens jouent donc un rôle important dans la culture de nombreuses sociétés humaines. Ils ont notamment influencé, mille ans avant notre ère, l'art et les cultures mésoaméricaines pour lesquelles ils étaient couramment associés aux pluies et à la fertilité (Wassén, 1934; Amador, 2015). Pour les aztèques, la déesse Tlaltecuhli (Figure 1.1.A), qualifiée à la fois de génitrice et de dévoreuse de vie, prenait l'aspect d'un crapaud anthropomorphe (Hocking et Babbitt, 2014). Ce lien était aussi établi en Égypte ancienne où la déesse Héqet (Figure 1.1.B), anthropomorphe à tête de grenouille, était également associée à la fertilité et à la natalité (Yurdakök, 2010). Tout aussi bienfaiteur, l'esprit grenouille Ch'ing-wa sheng de la Chine ancienne apportait la prospérité commerciale et la guérison des maladies (Baldrian-Hussein, 1986). Cette association se rencontre encore de nos jours dans le folklore chinois à travers Chan Chu (Figure 1.1.C), le crapaud votif à trois pattes qui assurerait lui aussi prospérité et bonne fortune en protégeant les richesses, et en augmentant les revenus (Ang et Low, 2012). De nombreuses découvertes archéologiques (amulettes, statuettes, lampes, ...) datant des périodes hellénistiques et romaines et représentant des grenouilles ou des crapauds en contexte sépulcral ont été retrouvées (Figure 1.1.D). Si les amulettes avaient un rôle apotropaïque, autrement dit un rôle de protection pour le défunt ou les vivants, l'ensemble de ces objets rituels semble être lié à la symbolique générale du corps en mutation à travers la mort, du passage du Styx, voire de la résurrection (Kerner, 2014). En revanche, la symbolique des amphibiens n'a pas toujours été associée à des bénédictions. Les grenouilles sont notamment associées à l'une des dix plaies d'Égypte évoquées dans le livre de l'Exode de l'Ancien Testament (Figure 1.1.E) ainsi qu'aux esprits impurs du livre de l'Apocalypse du Nouveau Testament (Exod. 7:28-29, 8:01-09; Apoc. 16:13, Association épiscopale liturgique pour les pays francophones). Durant le Moyen-Âge, les grenouilles sont tantôt valorisées et associées à la pluie, à la fécondité, à l'androgynie (dans sa définition gnostique), à la résurrection et à l'immortalité, tantôt rejetées avec horreur pour leur intelligence avec les

mythes infernaux, la pratique de la magie et de la sorcellerie (Figure 1.1.F ; James-Raoul et Thomasset, 2002; Hocking et Babbitt, 2014).

Ces exemples ne sont qu'une infime partie du corpus de références au symbolisme associé aux amphibiens. Leur omniprésence dans la mythologie de tant de civilisations s'explique en partie par la présence de ce groupe taxonomique sur tous les continents antérieurement au développement des sociétés humaines.



Figure 1.1 : Les grenouilles à travers le monde et les cultures. **A.** Le monolithe de Tlaltecuhctli, 14 m², est la plus grande sculpture monolithique aztèque retrouvée à ce jour, il date du xv^e siècle (photographie Citlaltec). **B.** Bas-relief du mammisi du temple d'Isis à Philæ représentant Héqet munie d'une croix ankh, symbole de la vie (photographie Ramosé). **C.** Statuette de Chan Chu, le crapaud à trois pattes assis sur un tas d'argent traditionnel chinois, avec une pièce de monnaie dans sa gueule (photographie Tristanb). **D.** Lampe à huile figurant une grenouille, poterie romaine du I^{er} ou II^e siècle (*Royal Athena Galleries*, New-York). **E.** Enluminure juive espagnole de la haggadah de Rylands datant du xiv^e siècle et illustrant Aaron accompagné de Moïse, étendant son bâton sur l'eau d'où s'échappent d'innombrables grenouilles sur Pharaon. **F.** Gravure illustrant une sorcière et ses esprits familiers (chat et grenouilles) tirée d'une publication traitant du procès des sorcières Elizabeth Stile, Mère Dutten, Mère Devell et Mère Margaret à Windsor en 1579.

1.1.2 Une histoire vieille de 370 millions d'années

Le terme amphibien provient du grec ancien ἀμφίβιος, *amphibios* signifiant littéralement « qui vit dans deux éléments ». Les premiers animaux tétrapodes à pouvoir être qualifiés d'amphibiens, au sens littéral, non-cladistique, sont de la famille des *Ichthyostegidae* (Pierce *et al.*, 2012). Ils auraient vécu il y a 420 à 360 millions d'années (Ma), soit pendant la période du Dévonien supérieur (Figure 1.2). Aujourd'hui considérés comme des poissons tétrapodes, ils étaient adaptés à la vie hors de l'eau, de façon intermittente, comme peuvent l'être de nos jours les *Oxudercinae*, une sous-famille de poissons amphibies (Polgar *et al.*, 2013; Mednikov, 2014). L'apparition des amphibiens véritables, au sens cladistique, daterait de 370 ou 365 Ma, soit durant la transition entre les périodes Dévonien supérieur et Carbonifère précoce (ou Mississippien inférieur) de l'ère Paléozoïque (San Mauro *et al.*, 2005; Anderson, 2011).

La classe des amphibiens (anciennement nommés batraciens) ou *Amphibia*, forme un groupe diversifié de vertébrés tétrapodes dont les trois ordres encore présents sur Terre (*Anura*, *Urodela* et *Apoda*) correspondent à des morphologies et de modes de vie très distincts. Ces trois ordres sont intégrés dans la sous-classe des amphibiens actuels ou *Lissamphibia*. Leur phylogénie est encore très discutée (San Mauro, 2010; Sigurdson et Green, 2011). La controverse est basée sur des études morphologiques qui ont souvent été entravées par l'ambiguïté d'interprétation de l'état de certains caractères (ancestral *versus* dérivé : phénomène de polarisation de caractère), ainsi que par l'existence de processus de convergence adaptative (San Mauro, 2010). Au cours des dernières années, l'utilisation de marqueurs moléculaires et de méthodes de reconstruction phylogénétique ont permis de résoudre certaines controverses, et ont suggéré de nouvelles hypothèses concernant l'évolution de ce groupe de vertébrés (Frost *et al.*, 2006). *Lissamphibia* correspond à l'association de (i) l'ordre des cécilies (*Apoda*) avec ceux de leurs fossiles relatifs (qui forment ainsi le clade *Gymnophiona*) mais également (ii) *Batrachia*, le super-ordre des batraciens (dans sa nouvelle définition), qui inclut l'ordre des grenouilles et crapauds (*Anura*) et l'ordre des salamandres et tritons (*Urodela*) ainsi que leurs fossiles (qui forment respectivement les clades *Salienta* et *Caudata*) (Figure 1.2 ; Frost *et al.*, 2006; Frost, 2015). La séparation entre le clade *Gymnophiona* et le super-ordre *Batrachia* daterait de -367 Ma et la séparation entre les clades *Salienta* et *Caudata* de -357 Ma, au cours de l'ère Paléozoïque (-540 à -250 Ma) (San Mauro *et*

al., 2005). La paléogéographie de cette ère correspond à la formation du supercontinent Pangée par la collision des supercontinents Laurussia et Protogondwana (Murphy *et al.*, 2009). Autrement dit, l'origine ainsi que la diversification initiale des cécilies, salamandres et grenouilles serait antérieure à la fragmentation de la Pangée (datant de -175 Ma à nos jours) et expliquerait leur radiation évolutive et l'actuelle répartition mondiale des amphibiens ainsi que leur quasi-omniprésence, précédemment évoquée, sur le globe et dans de nombreuses mythologies à travers les âges (San Mauro *et al.*, 2005).

Suite à ces près de 370 millions d'années d'évolution, il est actuellement dénombré plus de 7 450 espèces d'amphibiens dont 88 % d'*Anura*, 9 % de *Caudata* et 3 % de *Gymnophiona* (AmphibiaWeb, 2015). Ce nombre est régulièrement mis à jour au fur et à mesure des découvertes et des disparitions. Remarquons qu'il a beaucoup augmenté ces dernières années. En effet près de 4 470 espèces (60 % des espèces actuellement connues) ont été nouvellement décrites ces trente dernières années dont près de 650 (9 %) ces cinq dernières années (Lannoo, 2005; Pyron et Wiens, 2011; AmphibiaWeb, 2015). Cette diversité nouvellement découverte comprend des dizaines de nouvelles espèces de genres connus dans les régions tropicales peu étudiées telle que Madagascar (Vieites *et al.*, 2009), mais également de genres connus (Feinberg *et al.*, 2014) voire de nouveaux genres dans des régions pourtant relativement bien explorées tel que l'est des États-Unis (Camp *et al.*, 2009).

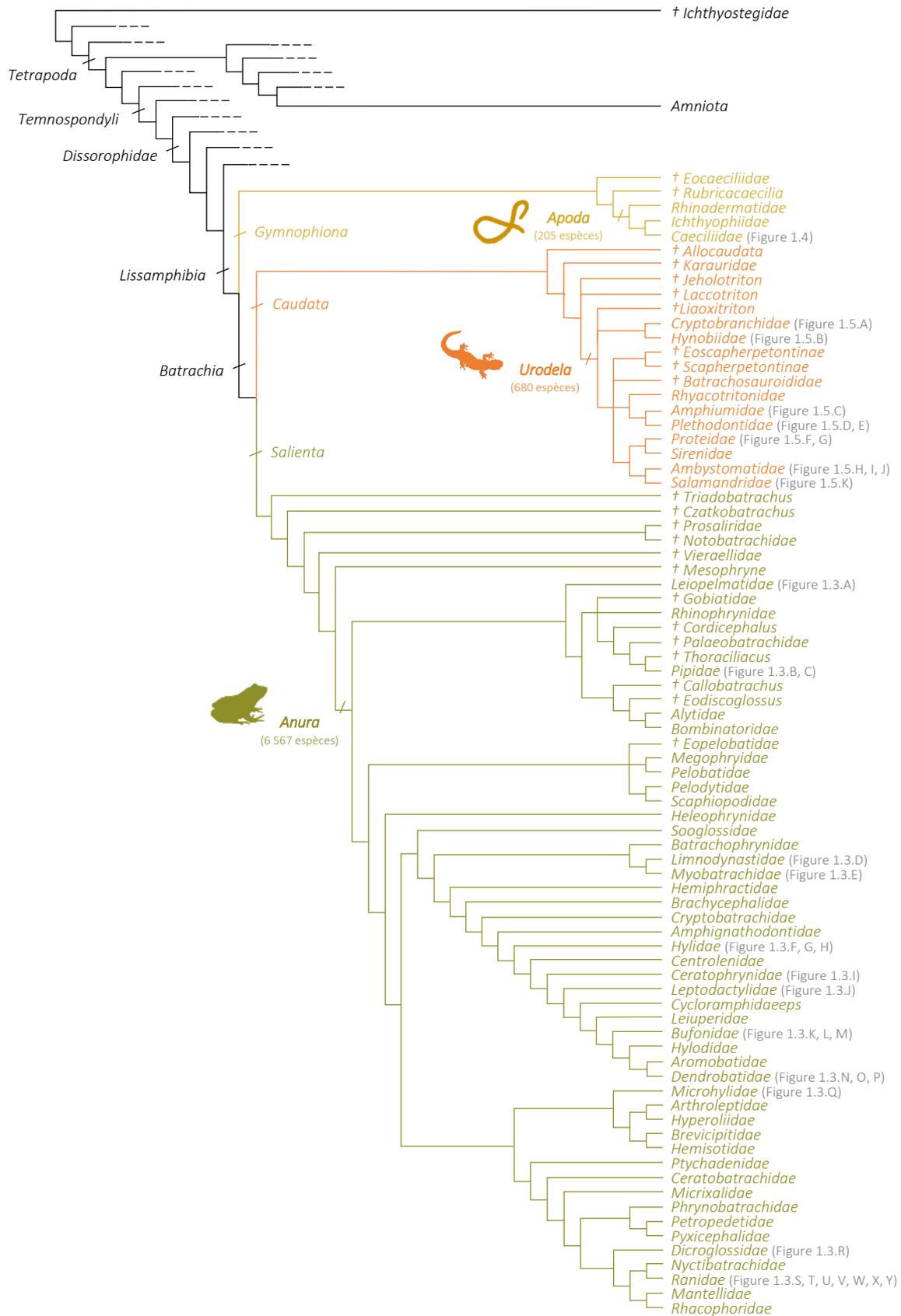


Figure 1.2 : Arbre phylogénétique des familles d'amphibiens (en couleur) illustrant leurs relations entre elles et avec les Ichthyostegidae et les amniotes. Modifié d'après Frost *et al.* (2006). Les familles précédés d'une croix sont des familles éteintes.

1.1.3 Des habitudes de vie diversifiées

La longue histoire évolutive des amphibiens a entraîné une importante diversification des morphologies et des modes de vie des espèces issues des trois ordres représentés. Il est par conséquent très difficile d'aborder les amphibiens dans leur généralité tant leur diversité est grande.

Si la majorité des amphibiens sont ovulipares (les femelles pondent des œufs et leur fécondation par les mâles est externe), de nombreuses espèces ont mis au point des stratégies variées. C'est le cas de la grenouille *Ascaphus truei* (Figure 1.3.A) qui possède une queue vestigiale, organe pénétrant permettant une fertilisation interne des œufs (Wake, 2015). En outre, les cas de fertilisation interne couplé à de la viviparité sont légion parmi les cécilies (comme *Typhlonectes compressicauda*, Figure 1.4.D) dont les larves se développent alors dans l'oviducte maternel hypertrophié et s'en nourrissent (Wilkinson *et al.*, 2008; Wake, 2015).

Le terme grec *ἀμφίβιος*, *amphibios*, faisant référence aux deux milieux de vie des amphibiens, n'est pas sans rappeler les deux principaux stades de leur cycle de vie. La grande majorité d'entre eux commencent en effet leur vie par un stade larvaire aquatique suivi d'une métamorphose en forme adulte définitive. Ce n'est en revanche pas le cas des espèces néoténiques comme le necture tacheté *Necturus maculosus* (Figure 1.5.G) qui ne se métamorphose pas et présente un morphotype larvaire (avec notamment des branchies externes) tout en ayant la capacité de se reproduire (Safi *et al.*, 1997). La grenouille *Eleutherodactylus planirostris* (Figure 1.3.J) quant à elle, court-circuite le stade têtard libre puisque les œufs sont pondus sur le sol et les individus ont dès l'éclosion un morphotype d'adulte (Christy *et al.*, 2007; Wake, 2015).

Les amphibiens sont ectothermes poïkilothermes : ils sont incapables de produire leur propre chaleur corporelle et leur température varie avec celle de leur milieu. Leurs habitats s'étendent toutefois des régions tempérées aux déserts, des régions de hautes montagnes aux forêts tropicales. Très perméable aux gaz respiratoires, la peau des amphibiens leur permet une respiration de type trans-tégumentaire. Elle permet également un passage rapide de l'eau, une fonction qui les empêcherait de vivre dans de l'eau salée ou d'être actifs dans un environnement sec. Toutefois, quelques rares espèces, en particulier *Fejervarya cancrivora* (Figure 1.3.R) sont capables de tolérer l'eau salée. Cette grenouille, dite

« crabier » du fait de son régime alimentaire composé de crabe, peut survivre dans l'eau saumâtre en augmentant son urémie et en maintenant ainsi un bon équilibre osmotique (Ren *et al.*, 2009). La grenouille *Lithobates sylvaticus* (Figure 1.3.T) est quant à elle un exemple d'adaptation au gel. En ce cas, l'augmentation de l'urémie et de la glycémie agissent comme cryoprotection, limitant la formation de glace dans le corps et permettant à cette grenouille de survivre à une température corporelle de -16 °C (Costanzo *et al.*, 2015).



Figure 1.3 : Les espèces d'Anura évoqués dans le chapitre 1. A. *Ascaphus truei* (R. B. Douglas) ; B. *Limnodynastes peronii* (E. Vanderduys) ; C. *Rheobatrachus silus* (M. J. Tyler) ; D. *Xenopus laevis* (S. J. Tonge) ; E. *Xenopus tropicalis* (C. Regnault) ; F. *Litoria caerulea* (T. Charlton) ; G. *Xenohyla truncata* (M. Moffett) ; H. *Agalychnis callidryas* (T. Pierson) ; I. *Ceratophrys cranwelli* (F. Teigler) ; J. *Eleutherodactylus planirostris* (M. Niemiller) ; K. *Bufo japonicus* (P. Janzen) ; L. *Rhinella amoroensis* (I. de la Riva) ; M. *Rhinella marina* (G. M. Rosa) ; N. *Phyllobates terribilis* (H. Wallays) ; O. *Epipedobates tricolor* (M. Dobiey) ; P. *Dendrobates tinctorius* (J. White) ; Q. *Paedophryne amauensis* (E. N. Rittmeyer) ; R. *Fejervarya cancrivora* (A. Todd) ; S. *Conraua goliath* (D. Heuclin) ; T. *Lithobates sylvaticus* (J. White) ; U. *Lithobates catesbeianus* (J. White) ; V. *Lithobates sphenoccephalus* (M. Niemiller) ; W. *Lithobates pipiens* (T. Pierson) ; X. *Rana boylei* (R. Schell) ; Y. *Lithobates clamitans* (T. Pierson). Figure réalisée avec l'accord des auteurs des photographies non sous licence libre. Les noms des photographes sont entre parenthèses. Chaque espèce est accompagnée de son état de conservation d'après l'union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) : EX, éteinte ; EN, en danger ; NT, quasi-menacée ; LC, préoccupation mineure ; DD, données insuffisantes).



Figure 1.4 : Les espèces d'*Apoda* évoqués dans le chapitre 1. **A.** *Microcaecilia iwokramae* (M. Wilkinson) ; **B.** *Atretochoana eiselti* (J. T. Coragem) ; **C.** *Boulengerula taitana* (Milvus) ; **D.** *Typhlonectes compressicauda* (D. B. Fenolio). Figure réalisée avec l'accord des auteurs des photographies non sous licence libre. Les noms des photographes sont entre parenthèses. Chaque espèce est accompagnée de son état de conservation d'après l'union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) : EN, en danger ; LC, préoccupation mineure ; DD, données insuffisantes).



Figure 1.5 : Les espèces d'*Urodela* évoqués dans le chapitre 1. **A.** *Andrias davidianus* (T. Papenfuss) ; **B.** *Hynobius nigrescens* (H. Wallays) ; **C.** *Amphiuma tridactylum* (B. Moon) ; **D.** *Thorius arboreus* (S. M. Rovito) ; **E.** *Ensatina eschscholtzii* (T. Pierson) ; **F.** *Proteus anguinus* (B. Jalzic) ; **G.** *Necturus maculosus* (T. Pierson) ; **H.** *Ambystoma tigrinum* (P. Ryan) ; **I.** *Ambystoma mexicanum* (J. P. Clare) ; **J.** *Ambystoma barbouri* (T. Pierson) ; **K.** *Cynops pyrrhogaster* (H. Wallays). Figure réalisée avec l'accord des auteurs des photographies non sous licence libre. Les noms des photographes sont entre parenthèses. Chaque espèce est accompagnée de son état de conservation d'après l'union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) : CR, en danger critique d'extinction ; EN, en danger ; VU, vulnérable ; NT, quasi-menacée ; LC, préoccupation mineure).

1.1.4 Une morphologie adaptée pour chaque habitude de vie

Cette importante diversité des modes et des milieux de vie des amphibiens s'accompagne également d'une forte hétérogénéité de morphologie entre et au sein des trois ordres *Apoda*, *Urodela* et *Anura*.

1.1.4.1 Les *Apoda* : gymnophiones, cécilies

Apoda (du grec *podos*, pied précédé du préfixe privatif *a-*) est sans aucun doute le moins connu des ordres d'amphibiens. Les 205 espèces connues vivent dans la plupart des régions tropicales du monde, à l'exception de Madagascar et de la région papoue-australienne (Figure 1.6 ; Koo *et al.*, 2013; IUCN, 2015).

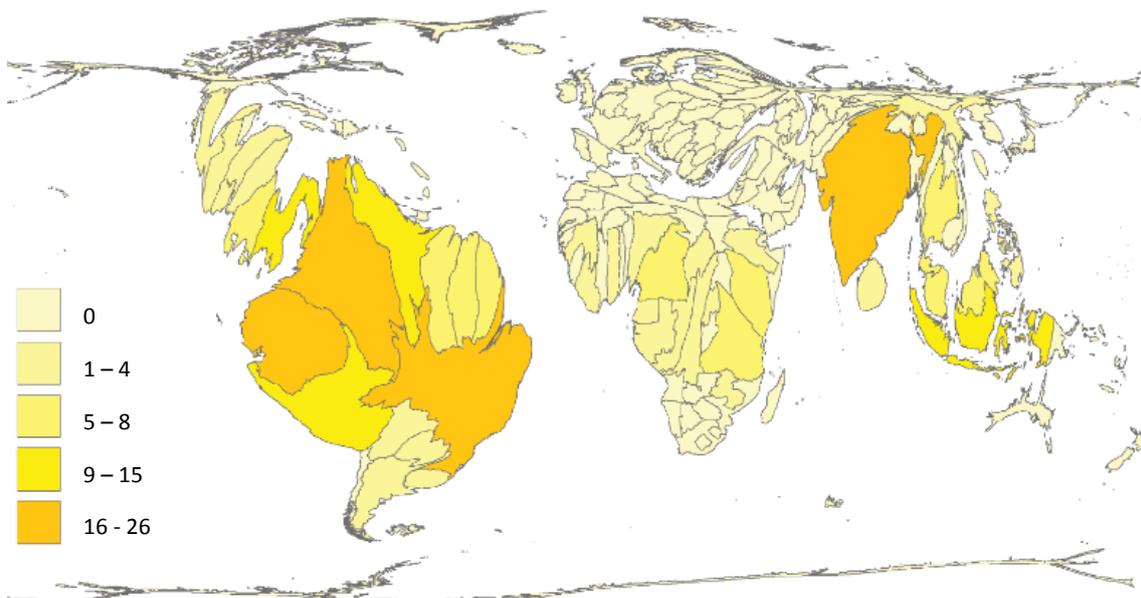


Figure 1.6 : Cartogramme de surface représentant la distribution mondiale des espèces d'*Apoda*. La forme de chaque pays est délibérément déformée en proportion du nombre d'espèces d'amphibiens par surface de pays (au km²). Source : Koo *et al.* (2013).

Les cécilies ont un corps vermiforme : cylindrique, allongé, apode et annelé (San Mauro, 2010). Amphibiens fousseurs du sol ou de la litière, leur vision est archaïque et

limitée au simple discernement de l'intensité lumineuse. En revanche, leur tête est pourvue d'un court tentacule en guise d'organe sensoriel tactile et olfactif (Sharma *et al.*, 2011).

La taille des gymnophiones adultes est variable selon les espèces : *Microcaecilia ivokramae* (Figure 1.4.A) mesure rarement plus d'une dizaine de centimètres alors que *Atretochoana eiselti* (Figure 1.4.B) peut atteindre le mètre (Hoogmoed *et al.*, 2011).

1.1.4.2 Les *Urodela* : salamandres, tritons, nectures, protées, sirènes

Les 680 espèces d'*Urodela* (du grec *ourá*, queue et *délos*, visible) ont une aire de répartition moins restreinte que les cécilies. Elles sont en revanche largement absentes de l'hémisphère sud puisque leur limite australe comprend la moitié nord de l'Amérique du sud, la côte nord de l'Afrique et le sud de la Chine continentale (Figure 1.7 ; IUCN, 2015).

Les urodèles présentent généralement un corps de tétrapode primitif caractérisé par un corps élancé, des jambes courtes et une longue queue aplatie verticalement. Il existe cependant de nombreuses variations. Ces dernières sont en accord avec l'habitat et le mode de vie des espèces d'urodèle qui peuvent être complètement terrestres telles *Hynobius nigrescens* (Figure 1.5.B) ou *Ambystoma tigrinum* (Figure 1.5.H), semi-aquatiques telles *Cynops pyrrhogaster* (Figure 1.5.K) voire complètement aquatiques (Omura *et al.*, 2014). C'est le cas des espèces du genre *Amphiuma* (Figure 1.5.C), qui possèdent alors des membres résiduels non développés leur donnant un aspect similaire à une anguille (Vitt et Caldwell, 2013). Chez l'espèce cavernicole *Proteus anguinus* (Figure 1.5.F), également très aquatique, ce sont les yeux qui sont vestigiaux. Cette espèce arbore en outre une peau anormalement dépigmentée en raison de l'obscurité (Pezdiric *et al.*, 2011).

La taille des urodèles est également soumise à une forte variabilité selon les espèces. La plus petite espèce d'urodèle au monde, *Thorius arboreus* (Figure 1.5.D), est une salamandre arboricole mexicaine de moins de deux centimètres (Hanken et Wake, 1994). Inversement, avec son mètre quatre-vingts, la salamandre géante de Chine *Andrias davidianus* (Figure 1.5.A) est non seulement la plus grosse salamandre mais également le plus grand amphibien vivant au monde (Geng *et al.*, 2015).

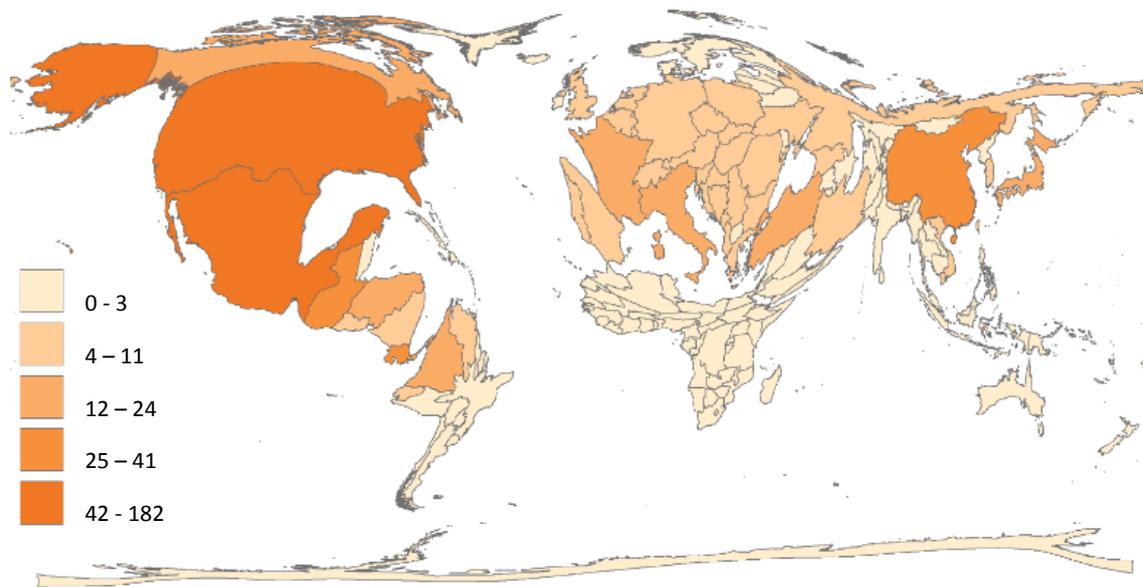


Figure 1.7 : Cartogramme de surface représentant la distribution mondiale des espèces d'*Urodela*. La forme de chaque pays est délibérément déformée en proportion du nombre d'espèces d'amphibiens par surface de pays (au km²). Source : Koo *et al.* (2013).

1.1.4.3 Les *Anura* : grenouilles, crapauds

Les *Anura* (du grec *ourá*, queue précédé du préfixe privatif *an-*) et leurs 6 567 espèces forment le plus grand ordre d'amphibiens. Leur répartition géographique est très large puisqu'ils sont présents sur tous les grands continents, mais absents de l'Antarctique et de nombreuses îles océaniques (Figure 1.8 ; IUCN, 2015).

La majorité des anoures ont un tronc court, large et dépourvu d'appendice caudal, une tête plate et des membres postérieurs sensiblement plus longs que les pattes avant (San Mauro, 2010). Ce différentiel de longueur des pattes selon l'axe longitudinal de l'animal est généralement associé au saut mais il permet également la natation, la marche, la course et l'escalade. Il existe un lien fort entre la forme du corps des grenouilles et leur écologie (Pough, 2007). Les grenouilles arboricoles ont généralement de plus longues pattes et certaines espèces comme *Litoria caerulea* (Figure 1.3.F) ont développé des orteils adhésifs pour simplifier leur locomotion verticale (Endlein *et al.*, 2013). Au contraire, un corps trapu avec des pattes relativement courtes est généralement la caractéristique des grenouilles terrestres (comme de nombreux vrais crapauds, *Bufo* *sp.*) qui sautent peu et se déplacent en marchant (Zug, 1985).

Dans le langage courant, une distinction est fréquemment réalisée entre le terme grenouille et crapaud. Cette dichotomie est alors basée sur des critères morphologiques (peau rugueuse des crapauds) ou sur le type d'habitat affecté par l'espèce. Ainsi le terme grenouille serait associé à des espèces aquatiques à semi-aquatiques et le terme crapaud serait réservé aux espèces terrestres. Cette classification n'a aucune justification taxonomique puisque tous les membres de l'ordre *Anura* sont des grenouilles et seuls les membres de la famille *Bufonidae* (Figure 1.3.K) sont à considérer comme "vrais crapauds" (Pough, 2007). Ainsi le *Bufonidae Rhinella amoroensis* (Figure 1.3.L) est un crapaud semi-aquatique (Harvey et Smith, 1993).

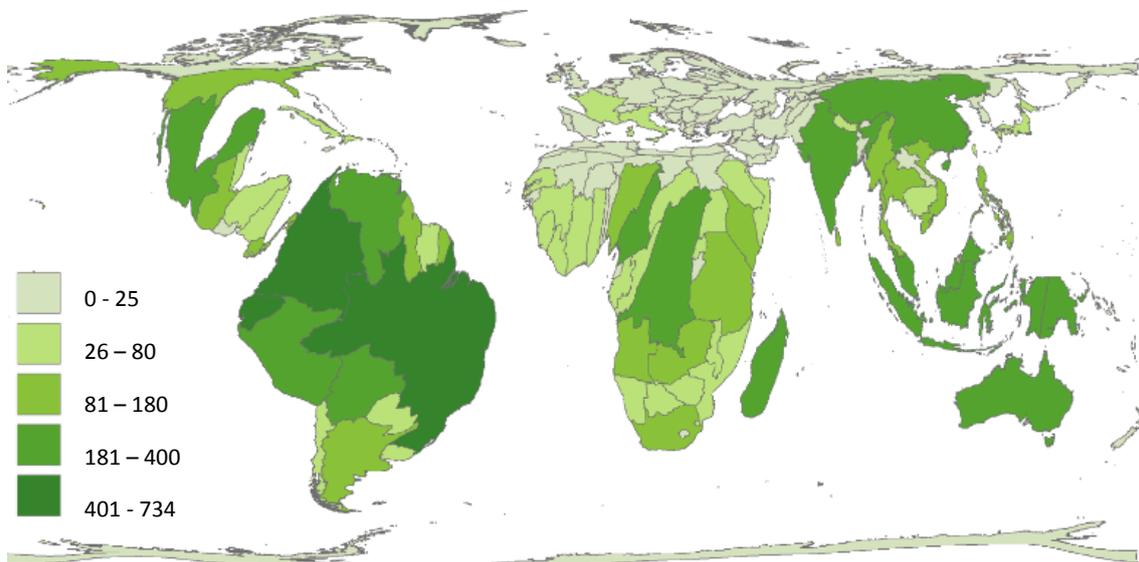


Figure 1.8 : Cartogramme de surface représentant la distribution mondiale des espèces d'*Anura*. La forme de chaque pays est délibérément déformée en proportion du nombre d'espèces d'amphibiens par surface de pays (au km²). Source : Koo *et al.* (2013).

À l'instar des deux ordres précédemment évoqués, la diversité de formes au sein des anoures s'accompagne d'une diversité de taille. La plus grande grenouille de la planète, la grenouille goliath *Conraua goliath* (Figure 1.3.S) du Cameroun, mesure une trentaine de centimètres (Negroni et Farina, 1993). En revanche *Paedophryne amauensis* (Figure 1.3.Q), originaire de Papouasie-Nouvelle-Guinée, est à la fois la plus petite grenouille mais aussi le plus petit vertébré au monde puisqu'elle mesure moins de huit millimètres à l'âge adulte (Rittmeyer *et al.*, 2012).

1.2 Le déclin massif des populations d'amphibiens

Malgré l'adaptation manifeste des amphibiens à leurs milieux de vie, de nombreuses espèces existantes sont actuellement sous la menace extrême de pressions telles que le changement climatique global, la destruction de leur habitat, l'introduction d'espèces invasives, l'émergence de maladies infectieuses et la pollution des milieux par des contaminants chimiques. La disparition au cours des dernières décennies d'une grande diversité d'amphibiens est couramment dénommée « déclin massif des populations d'amphibiens ».

1.2.1 Au cœur de la sixième extinction massive

Les paléontologues définissent les extinctions massives comme des événements brefs à l'échelle géologique au cours desquels la Terre perd plus de trois-quarts des espèces animales ou végétales existantes. Il est généralement admis qu'au cours de son histoire, la Terre a déjà traversé cinq grandes extinctions de biodiversité, aussi connues sous le nom de crises biologiques (Barnosky *et al.*, 2011).

La première crise est survenue entre l'Ordovicien et le Silurien (-440 Ma) à la suite d'une probable glaciation et de profonds changements du niveau des océans. Cette crise aurait marqué la disparition de 85 % de la biodiversité (Wake et Vredenburg, 2008; Barnosky *et al.*, 2011). L'extinction suivante date du Dévonien supérieur (-360 Ma) durant laquelle de multiples épisodes glaciaires associés à une anoxie des océans seraient la cause de la perte de 75 % des espèces. Pour rappel, les premiers amphibiens ont amorcé leur colonisation des terres émergées à cette période et ont, par conséquent, survécu à cet événement (Wake et Vredenburg, 2008). La plus massive des crises biologiques a été celle du Permien-Trias (-250 Ma). Plus de 95 % des espèces auraient disparu pour de multiples causes : activité volcanique, réchauffement climatique, anoxie et acidification des océans, augmentation de la concentration en dioxyde de carbone et en sulfure d'hydrogène dans l'eau et l'atmosphère (Barnosky *et al.*, 2011). Les *Apoda*, *Urodela* et *Anura* font partie des rares vertébrés terrestres à avoir survécu à cette crise. Il y a approximativement -200 Ma survint la quatrième extinction de masse, la crise du Trias-Jurassique qui aboutit à la disparition de 80 % des espèces dont les derniers grands amphibiens. En revanche, des représentants des trois ordres des

amphibiens actuels ont survécu. Les causes évoquées sont une intense activité volcanique associée à un réchauffement climatique global (Barnosky *et al.*, 2011). La dernière crise achevée est la célèbre extinction du Crétacé-Tertiaire (-65 Ma) dont la conséquence la plus notoire est sans doute la disparition des dinosaures. En tout, 75 % des espèces ont disparu durant cet événement. Les causes sont encore discutées. Il pourrait s'agir d'une association entre une importante activité volcanique et l'impact d'une météorite qui aurait provoqué une chute rapide de la température atmosphérique et une augmentation de la température des eaux profondes. La grande majorité des familles et genres d'amphibiens de l'époque survécurent à ce cataclysme (Wake et Vredenburg, 2008; Barnosky *et al.*, 2011).

Au total, sur les quatre milliards d'espèces estimées comme ayant évolué sur la Terre au cours des 3,5 derniers milliards d'années, environ 99 % auraient disparu (Barnosky *et al.*, 2011). La liste des espèces disparues est en constante augmentation puisque de nombreuses études récentes confirment que la Terre est en train de subir sa sixième extinction de masse, l'extinction de l'Holocène amorcée il y a une dizaine de milliers d'années (Wake et Vredenburg, 2008; Barnosky *et al.*, 2011; Pievani, 2014; Ceballos *et al.*, 2015; Conde *et al.*, 2015). Comme lors des précédents événements, le climat pourrait être une des causes. En revanche, de manière inédite, l'Homme aurait produit directement ou indirectement les conditions de cette crise par ses multiples activités et leurs répercussions sur les biotopes partout dans le monde (Wake et Vredenburg, 2008). Outre ces causes, le rythme des disparitions serait également inédit. La quantification de ce taux est largement discutée mais une étude très récente suggère que le taux moyen d'extinction d'espèces de vertébrés au siècle dernier est 114 fois supérieur à ce qu'il aurait été dans le passé, même en tenant compte des estimations les plus optimistes en matière d'extinction actuelle et de taux d'extinctions passés de référence (Ceballos *et al.*, 2015). D'après cette même étude, le nombre total d'espèces de poissons, de reptiles, d'oiseaux, de mammifères ou de l'ensemble des vertébrés qui se sont éteints au XX^e siècle aurait pris environ 2 000 à 6 000 ans à disparaître en appliquant les taux d'extinction passés de référence. Les amphibiens, quant à eux, auraient mis 10 000 ans, suggérant ainsi un rythme d'extinction récent plus élevé que les autres vertébrés.

Ainsi, alors que les amphibiens ont été capables de survivre à l'ensemble des crises biologiques qu'ils ont connues, ils se révèlent paradoxalement vulnérables aux menaces environnementales actuelles.

1.2.2 Statut global des populations d'amphibiens

La prise de conscience et l'intérêt du monde scientifique pour le déclin massif des populations d'amphibiens ont été amorcés dans les années 80 et particulièrement en 1989 lors du premier congrès mondial d'herpétologie (Stuart *et al.*, 2004). En 2001, l'Union internationale pour la conservation de la nature (IUCN) a entrepris la première évaluation globale de l'état de conservation de toutes les espèces d'amphibiens connues. Cette initiative, connue sous le nom *Global Amphibian Assessment*, a été achevée en 2004. Cette évaluation a décrit un état de conservation global des espèces d'amphibiens très préoccupant : 43,2 % des espèces voyaient leurs populations décroître alors que seulement 0,5 % d'entre elles bénéficiaient d'un accroissement de leurs populations. Les espèces restantes se partageaient en 27,2 % de populations stables et 29,1 % pour lesquelles le manque de données ne permettait pas de statuer sur l'évolution des populations (Stuart *et al.*, 2004). En outre, 32,5 % des espèces d'amphibiens étaient d'ores et déjà classées comme vulnérables, en danger ou en danger critique d'extinction. Le niveau de menace était par conséquent plus important que pour les oiseaux ou les mammifères (respectivement 12 % et 23 % d'espèces menacées) (Stuart *et al.*, 2004; Hoffmann *et al.*, 2010).

Les données de la *Global Amphibian Assessment* ont été réévaluées en 2008 et le Tableau 1.1 présente une comparaison du nombre total d'espèces dans chaque catégorie de la liste rouge de l'IUCN estimé pour 1980 et observé en 2004 et 2007.

Tableau 1.1 : Statut des populations d'amphibiens entre 1980 et 2007 d'après la *Global Amphibian Assessment*

Catégorie IUCN	Nombre d'espèces			Variation (%)	
	1980	2004	2007	1980-2004	2004-2007
EX	25	34	34	36,0	0,0
EW	0	1	1	n/a	0,0
CR	231	427	441	84,8	3,3
EN	807	761	737	- 5,7	- 3,2
VU	734	668	630	- 9,0	- 5,7
NT	322	359	369	11,5	2,8
LC	2 322	2 199	2 277	- 5,3	3,5
DD	1 302	1 294	1 426	- 0,6	10,2

EX, éteinte ; EW, éteinte à l'état sauvage ; CR, en danger critique d'extinction ; EN, en danger ; VU, vulnérable ; NT, quasi-menacée ; LC, préoccupation mineure ; DD, données insuffisantes. Modifié d'après Sparling *et al.* (2010b). Sources : Stuart *et al.* (2004) et IUCN (2008).

Cette comparaison souligne une augmentation de presque 85 % du nombre d'espèces en danger critique d'extinction entre 1980 et 2004. Cette augmentation notable s'explique par un déplacement des espèces depuis des catégories moins menacées. Ceci s'illustre par la baisse du nombre d'espèces en danger et vulnérable durant le même laps de temps. Dans une moindre mesure, les mêmes types de déplacement se produisent entre 2004 et 2007. L'augmentation de plus de 10 % du nombre d'espèces de la catégorie DD, données insuffisantes, témoigne des espèces nouvellement ajoutées à la base de données et pour lesquelles il est encore impossible d'évaluer le risque d'extinction en fonction de leur distribution ou de l'état de leur population (Stuart *et al.*, 2004; Sparling *et al.*, 2010b).

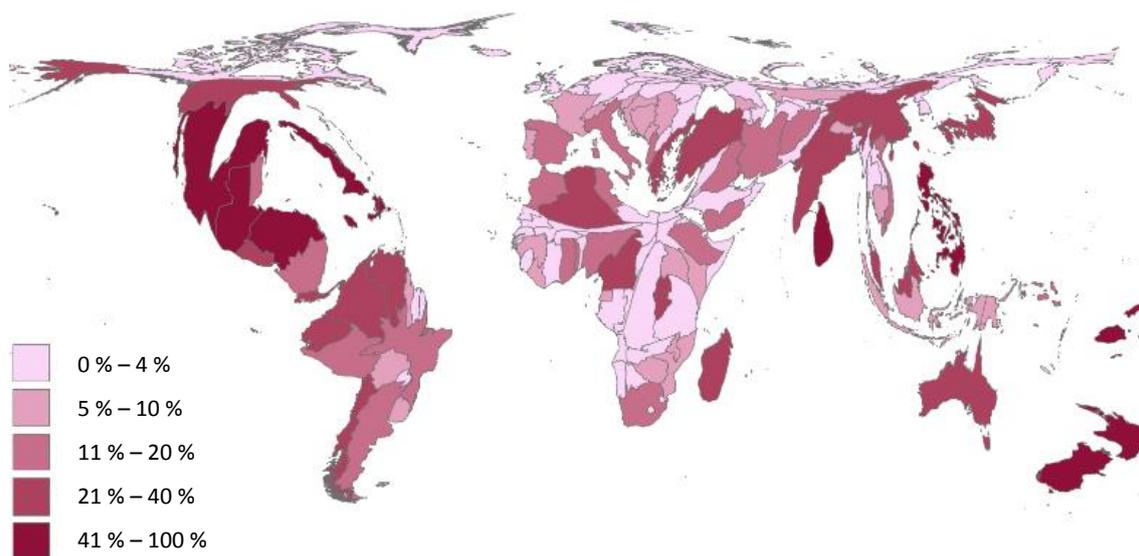


Figure 1.9 : Pourcentage d'espèces d'amphibiens menacées par pays. Représentation en cartogramme de surface basée sur les données de l'IUCN. Sont considérées les espèces ayant les statuts de conservation de l'IUCN : CR, en danger critique d'extinction ; EN, en danger et VU, vulnérable. Source : Koo *et al.* (2013).

La Figure 1.9 montre les pays où la menace qui pèse sur les amphibiens est la plus importante. Une très nette anamorphose est visible en Amérique centrale et dans les Caraïbes. Près de 55 %, 86 % et 93 % des espèces indigènes sont respectivement menacées au Guatemala, en République Dominicaine et à Haïti. Sur le continent eurasiatique une anamorphose dans le bassin méditerranéen semble se dessiner. Cette déformation concerne par la Grèce et la Turquie, présentant respectivement 23 % et 35 % d'espèces menacées. La dernière anamorphose concerne l'Asie du sud-est avec la Malaisie, l'Inde, les Philippines et le Sri Lanka, avec respectivement 23 %, 28 %, 49 % et 70 % d'espèces d'amphibiens menacées (Koo *et al.*, 2013; AmphibiaWeb, 2015).

1.2.3 Pourquoi « sauver » les amphibiens ?

Il est en société une question récurrente lorsque le déclin des populations d'amphibiens est évoqué : « Pourquoi faut-il sauver les amphibiens ? ». Les corollaires découlant naturellement de cette interrogation sont les suivants : « Que nous apportent les amphibiens ? » « Pourquoi méritent-ils notre attention ? » et « Quelles sont les conséquences du déclin de leurs populations ? ». D'une manière générale, ce type de questionnement est applicable à tous les groupes taxonomiques menacés, pas seulement aux amphibiens. D'ailleurs, de nombreuses études se sont intéressées aux facteurs influant sur les montants des financements des projets de préservation de la biodiversité. Les choix des financeurs sont principalement motivés par la connaissance d'une diminution importante de la taille des populations d'espèces menacées, par la proximité taxonomique des espèces avec *Homo sapiens*, mais aussi par le charisme qui leur est associé, l'empathie ou l'attractivité qu'elles dégagent, ainsi que par les bénéfices et services anthropocentriques qu'elles véhiculent (Loomis et White, 1996; Martín-López *et al.*, 2008; Martín-Forés *et al.*, 2013).

Derrière ces notions de charisme, d'empathie et d'attractivité se cachent des variables physiques telles que la longueur, la masse de l'animal et la taille des yeux (Martín-López *et al.*, 2008). En effet, les espèces favorisées seraient plutôt grandes avec un rapport masse / longueur important mais surtout un rapport taille des yeux / taille totale élevé (Martín-Forés *et al.*, 2013). Ce dernier paramètre favoriserait plus particulièrement les oiseaux ainsi que les primates au détriment des reptiles ou d'autres mammifères comme les rongeurs (Howland *et al.*, 2004).

Les amphibiens sont très éloignés taxonomiquement d'*Homo sapiens* et leurs tailles oculaires sont tellement variables qu'aucune conclusion générale ne peut être tirée au sujet de leurs tailles relatives (Figures 1.2, 1.3, 1.4 et 1.5). L'intérêt de nos sociétés pour la conservation des amphibiens viendra donc du constat d'un important déclin des populations mais aussi d'une réflexion sur la perte de ces espèces à la lumière des bénéfices apportés par les amphibiens à l'être humain. L'effondrement des populations d'amphibiens pourrait en effet entraîner la perte plus large de leurs services écosystémiques, une préoccupation qui n'a reçu pour l'heure que trop peu d'attention (Hocking et Babbitt, 2014).

Les services écosystémiques (ou services écologiques) regroupent les bienfaits que l'homme retire directement ou indirectement de la nature. Ces services comprennent les services d'approvisionnement, les services de régulation, les services culturels et les services de soutien. Nous allons les détailler ci concernant les amphibiens.

1.2.3.1 Les services d'approvisionnement

Les services d'approvisionnement regroupent les produits obtenus directement d'un écosystème comme la nourriture, l'eau douce, les ressources médicales ou énergétiques, etc.

Intuitivement, le service d'approvisionnement prioritairement évoqué dans le cas des amphibiens est la consommation de cuisses de grenouilles. La *Global Amphibian Assessment*, indique qu'à travers le monde, environ 220 espèces d'amphibiens sont utilisées à des fins alimentaires (IUCN, 2008). Les principaux pays importateurs de cuisses de grenouilles sont la France, les États-Unis, la Belgique et le Luxembourg. Parmi les pays exportateurs, l'Indonésie est le principal, suivi de la Chine, de la Belgique et du Luxembourg, ces deux derniers pays étant des points de réexpédition (Warkentin *et al.*, 2009). En réalité, non seulement les cuisses mais aussi d'autres parties du corps des grenouilles et des salamandres sont consommées par de nombreuses cultures. En guise d'illustration, dans son livre de cuisine intitulé *The Culinary Hepetologist*, Linner (2005) inclus 26 recettes à base de salamandres et 193 recettes à base de grenouilles telles que l'axolotl à la tomate, l'amphiume à la poulette, le crumble de cuisses de crapauds ou encore le velouté de grenouilles à la sicilienne (Liner, 2005). En 2001, l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture estimait une consommation annuelle mondiale de 4 716 tonnes de cuisses de grenouilles (Collins *et al.*, 2009). Par ailleurs, les élevages sont très minoritaires dans ce marché et plus de 85 % des amphibiens consommés proviendraient du milieu sauvage, au détriment des espèces concernées (Warkentin *et al.*, 2009).

En plus de servir de ressource alimentaire, les amphibiens sont couramment utilisés pour des usages médicaux. Ainsi, d'après la *Global Amphibian Assessment*, plus de 73 espèces posséderaient une valeur médicinale (IUCN, 2008). Les amphibiens sont notamment ingrédients des médecines populaires à travers le monde telle la non anecdotique médecine traditionnelle chinoise. Ils sont alors utilisés contre une variété de maux allant de simples verrues et autres maladies cutanées à des tumeurs, en passant par l'asthme ou des maladies

cardiaques (Hocking et Babbitt, 2014). Pour des raisons écologiques aussi diverses que l'accouplement, le marquage de leur territoire, leur défense vis à vis des prédateurs ou leur lutte contre les infections, les amphibiens produisent un large éventail de molécules. En témoigne les puissants alcaloïdes stéroïdiens batrachotoxines sécrétés par la peau de *Phylllobates terribilis* (Figure 1.3.N) et utilisés par les chasseurs indiens du nord de l'Amérique du Sud comme enduit toxique pour les pointes de leurs flèches (Mebs *et al.*, 2014). Ainsi, l'identification des alcaloïdes sécrétés par les amphibiens ont apporté à la médecine moderne un potentiel pharmacologique largement exploité. À titre d'exemple l'alcaloïde épibatidine, sécrété par *Epipedobates tricolor* (Figure 1.3.O), possède une activité analgésique non opiacée 200 fois plus puissante que la morphine (Oliveira Filho et Omori, 2015).

Outre les alcaloïdes, les amphibiens sécrètent de nombreux peptides antimicrobiens pour leur défense contre les pathogènes (Rollins-Smith, 2009). Une étude récente a permis d'identifier trois de ces peptides antimicrobiens qui inhiberaient l'infection et le transfert dans les lymphocytes T humains du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (VanCompernelle *et al.*, 2005). Enfin, certains processus biologiques mis en place par quelques espèces d'amphibiens font l'objet de nombreuses études tant la compréhension de leurs mécanismes pourrait apporter des avancées médicales conséquentes. Ainsi, la compréhension des mécanismes inhérents à la régénération de leurs membres comme leur queue pourrait être utilisée pour mobiliser les cellules souches humaines afin de palier notre relativement faible capacité de réparation des organes lésés ou endommagés (Tseng *et al.*, 2010). Les amphibiens pourraient également apporter de nouvelles perspectives médicales à travers l'étude de leurs modes de vie. C'est notamment le cas des deux espèces du genre *Rheobatrachus* (Figure 1.3.C), découvertes en 1973 en Australie. Leur caractéristique notable était l'interruption de leur production de sucs gastriques par la production de prostaglandine E2 permettant après ingestion dans leur estomac, l'incubation des œufs et des juvéniles (de la Lande *et al.*, 1984). Ce type de mécanisme est autant de perspectives qui pourraient soulager de nombreux patients atteints de sévères reflux gastriques et des ulcérations associées (Calvet et Gomollón, 2005). Ironiquement, les espèces du genre *Rheobatrachus* n'ont plus été observées depuis 1981 et ont été dès lors considérées comme éteintes, soit moins de dix ans après leur découverte (Cohen, 2001).

1.2.3.2 Les services de régulation

Les services de régulation des écosystèmes comprennent les services obtenus à partir des processus de régulation climatique, de purification de l'eau, de régulation des maladies, de protection contre les catastrophes naturelles, la réduction de la pollution, etc.

L'influence des amphibiens sur les services de régulation s'appréhende par leur rôle contre la transmission de certaines maladies. Certaines études ont démontré que plus la diversité des amphibiens est grande dans un écosystème, plus ce dernier est protégé contre les maladies y compris celles affectant les êtres humains (Mohneke et Rödel, 2009; Kiesecker, 2010; Johnson *et al.*, 2013). Par exemple, à travers la prédation ou la compétition, ils régulent les populations de moustiques ou de mouches vecteurs de maladies humaines (Brodman et Dorton, 2006; Rubbo *et al.*, 2011; Blaustein *et al.*, 2014). S'il est vrai que les poissons sont de biens meilleurs prédateurs de moustiques, les amphibiens permettent cependant le contrôle des populations de moustiques dans les zones humides éphémères où les poissons sont absents (Brodman et Dorton, 2006; Rubbo *et al.*, 2011; Blaustein *et al.*, 2014).

Les amphibiens participent également à la régulation de la qualité de l'eau. Au stade larvaire, les amphibiens sont généralement d'excellents filtreurs. Le taux maximal de filtration des têtards de *Xenopus laevis* (Figure 1.3.D) peut atteindre 26 mL d'eau par gramme par minute (Viertel, 1992; Altig *et al.*, 2007). Cette grande capacité d'épuration participerait à une meilleure qualité de l'eau à travers la régulation de la biomasse algale ou encore l'élimination de bactéries (Ranvestel *et al.*, 2004; Mohneke et Rödel, 2009).

Enfin, quelques rares espèces participent à la dispersion des graines de végétaux. C'est notamment le cas de la grenouille brésilienne *Xenohyla truncata* (Figure 1.3.G) et de son régime alimentaire en partie composé de fruits dont elle disperse les graines par défécation (da Silva et de Britto-Pereira, 2006). Les observations ont pu montrer qu'elle améliorerait leur taux de germination grâce aux habitats humides qu'elle fréquente (Hocking et Babbitt, 2014).

1.2.3.3 Les services culturels et aménités

Les services culturels apportent à l'Homme un bénéfice non matériel par la réflexion, la récréation ou l'esthétisme (aménité).

Une liste non exhaustive des valeurs religieuses et spirituelles véhiculées par les amphibiens a déjà été présentée en guise d'introduction de ce mémoire de thèse. Cependant, et de manière plus contemporaine, les amphibiens sont partie intégrante de notre culture. Ce dès le plus jeune âge, puisque les grenouilles sont couramment intégrées dans le bestiaire des comptes, comptines et des livres pour enfants (Hocking et Babbitt, 2014; Arfé, 2015). La littérature fait souvent référence aux amphibiens comme en témoigne les célèbres fables de La Fontaine de 1668 : « La grenouille qui se veut faire aussi grosse que le bœuf » livre I, fable 3 ; « Deux taureaux et une grenouille » II, f. 4 ; « Le lièvre et les grenouilles » II, f. 14 ; « Les grenouilles qui demandent un roi » III, f. 4 ; « La grenouille et le rat » IV, f. 2 ; « Le soleil et les grenouilles » VI, f. 12. Les grenouilles n'échappent pas non plus au 4^{ème} art, la musique (avec par exemple la chanson *Peace Frog* des *Doors*, 1970 ; ou le célèbre clip de Tony Klinger pour la chanson *Love Is All* composée par Roger Glover de *Deep Purple* et interprétée par Ronnie James Dio de *Black Sabbath*, 1974). Les amphibiens sont également très représentatifs du paysage audiovisuel à travers les dessins animés (p. ex. *Michigan J. Frog* des *Looney Tunes* ; 1955), les séries (p. ex. *Kermit la grenouille* du *Muppet Show* ; 1955), ou de nombreuses publicités (p. ex. les céréales *Smacks* de la marque *Kellogg's* qui adoptent une grenouille pour mascotte). Ils sont enfin des figures récurrentes du monde vidéo-ludique que ce soit sur ordinateur (p. ex. *Zuma* par *PopCap Games*, 2003), sur console (p. ex. *Kero Kero Keroppi* par *Nintendo*, 1991 ; l'évolution *Grenouille/Croâporal/Amphinobi*, créature de départ de la sixième et dernière version du très populaire jeu *Pokémon* par *Nintendo*, 2013) ou sur smartphone (p. ex. *Pocket Frogs* par *Nimblebit*, 2010 ; *Slyde the frog* par *Skynworks Interactive*, 2011).

L'ensemble des exemples précédemment évoqués concernent les *Anura*. Ceci pourrait sans doute s'expliquer par le fait que, dans notre imaginaire, les grenouilles sont plus simplement associées à une large palette de couleurs que les salamandres ou les méconnues cécilies. Cependant, à l'instar des *Anura*, de nombreuses espèces de *Urodela* arborent de vives couleurs pour stimuler leur reproduction ou pour avertir les potentiels prédateurs de leur toxicité. Cette stratégie adaptative, aussi connue sous le nom d'aposématisme, est notamment

utilisée par les tritons *Ensatina eschscholtzii* (Figure 1.5.E) qui camouflent leur ventre orangé jusqu'à ce qu'un danger de prédation survienne (Kuchta et Reeder, 2005). Par cette beauté et cette diversité, les amphibiens participent à une aménité environnementale inestimable pour l'Homme.

1.2.3.4 Les services de soutien ou d'auto-entretien

Les services dits de soutien sont nécessaires à la production des trois services évoqués précédemment. En conséquence, leur perturbation n'impacte l'Homme qu'indirectement ou sur le long terme.

Les têtards ont souvent été qualifiés de consommateurs primaires herbivores et détritivores. En vérité, comme les larves de salamandre, ils sont vraisemblablement omnivores et plusieurs comportements de prédation, de cannibalisme ou de nécrophagie sont rapportés dans la littérature (Altig *et al.*, 2007; Hocking et Babbitt, 2014). Par conséquent, les amphibiens, à la fois proies et prédateurs, structurent grandement les chaînes trophiques des zones humides et participent alors aux transferts de biomasse d'un niveau trophique au niveau supérieur. Leur mode de vie terrestre et aquatique fait des amphibiens une source majeure de nourriture pour des prédateurs aussi variés que des espèces de poissons, de serpents, d'autres amphibiens, d'oiseaux ou de mammifères (Hocking et Babbitt, 2014). Enfin, par le biais de la métamorphose, les amphibiens créent un lien dans le transfert d'éléments nutritifs du milieu aquatique au milieu terrestre (Gibbons *et al.*, 2006). Ainsi, au sein d'un écosystème donné, l'altération de la structure des populations d'amphibiens pourrait perturber les communautés algales, les populations d'invertébrés, les dynamiques de prédation, les transferts de matière organique et les cycles des éléments nutritifs (Ranvestel *et al.*, 2004; Gibbons *et al.*, 2006; Whiles *et al.*, 2006; Mohnke et Rödel, 2009; Hocking et Babbitt, 2014).

1.2.4 Le déclin : une cause multifactorielle

Il est admis que de nombreuses espèces d'amphibiens, parce qu'elles s'inscrivent dans de petites aires de répartition géographique ou évoluent dans des régions tropicales peu sujettes aux variations thermiques, sont particulièrement adaptées à leur habitat et d'autant

plus sensibles aux nouveaux changements et aux nouvelles pressions qui s’y exercent (Wake et Vredenburg, 2008). Dans ses perspectives mondiales de la biodiversité de 2010 puis de 2014, la convention sur la diversité biologique de l’Organisation des Nations-Unies définissait cinq causes directes de l’appauvrissement de la biodiversité pouvant se conjuguer et exacerber leurs impacts : les changements climatiques, la perte et la dégradation des habitats, l’introduction d’espèces exotiques invasives, l’apport excessif en nutriments et autres formes de pollution, la surexploitation et l’utilisation non durable de la biodiversité (Secrétariat de la Convention sur la diversité biologique, 2010, 2014). En ce qui concerne les amphibiens et leur déclin, la surexploitation n’est pas toujours considérée comme une préoccupation à l’échelle mondiale puisqu’elle concernerait principalement l’est et le sud-est asiatique (Stuart *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2010). En revanche l’augmentation des infections fongiques, virales ou parasitaires est une cause majeure couramment considérée et étudiée (Gendron *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2010; Blaustein *et al.*, 2011). Le tableau 1.2 résume les menaces associées pour toutes les espèces de la dernière mise à jour de la base *Global Amphibian Assessment* de l’IUCN (IUCN, 2008; Sparling *et al.*, 2010b).

Tableau 1.2 : Nombre d’espèces d’amphibien de chaque catégorie de la liste rouge de l’IUCN menacées par les principales causes du déclin des populations.

Menace	Nombre d’espèces menacées par catégorie de l’IUCN					
	CR	EN	VU	NT	LC	DD
Perte d’habitat	145	308	211	130	457	194
Espèces invasives	62	91	68	55	149	57
Surexploitation	30	43	48	35	104	21
Maladie	200	125	79	32	54	50
Pollution	168	213	197	110	401	110
Non identifiée	3	7	18	25	867	96

CR, en danger critique d’extinction ; EN, en danger ; VU, vulnérable ; NT, quasi-menacée ; LC, préoccupation mineure ; DD, données insuffisantes. Traduit d’après Sparling *et al.* (2010b) ; source IUCN (2008).

Si la perte d’habitat semble représenter la principale menace pour la majorité des catégories, ce n’est pas le cas des espèces en danger critique d’extinction (CR) qui semblent principalement menacées par les maladies et la pollution. L’ensemble de ces autres facteurs sont tout de même des menaces non négligeables pour la biodiversité des amphibiens. Les récents travaux les concernant sont discutés distinctement dans les rubriques suivantes.

1.2.4.1 Les changements climatiques

Parmi les divers facteurs proposés comme causes du déclin des populations d'amphibiens, les changements climatiques mondiaux ont reçu relativement peu d'attention (Carey et Alexander, 2003). Il est admis que les changements de températures et de précipitations pourraient affecter directement la survie, la croissance et la reproduction des amphibiens (Blaustein *et al.*, 2010). Mais les réponses face à ces changements globaux dépendent fortement des régions étudiées. En Caroline du sud, par exemple, une étude basée sur 35 ans de collecte de données suggère un lien entre le déclin des populations de grenouilles et une baisse significative des précipitations sur la même période. En revanche, une seconde étude se basant sur une période aussi longue au Costa Rica, associe la perte de richesse spécifique en amphibiens avec la diminution locale de la quantité de litière, elle-même liée aux changements climatiques (Whitfield *et al.*, 2007). Ceci reflète un élément classiquement retrouvé dans la littérature : la majorité des effets liés aux changements climatiques proviennent d'interactions entre les conditions environnementales modifiées et d'autres facteurs comme les incendies, l'émergence de nouveaux pathogènes, l'introduction d'espèces invasives, les contaminants chimiques... (Burrowes *et al.*, 2004; Bosch *et al.*, 2007; Woodhams, Alford, *et al.*, 2008; Alford, 2010; Blaustein *et al.*, 2010; Saenz *et al.*, 2013; Penman *et al.*, 2015).

En Europe, les modèles prédictifs de distribution des amphibiens jusqu'en 2050 montrent une propension à l'expansion des espèces grâce à la colonisation des actuelles régions nordiques (Araújo *et al.*, 2006). Cependant la capacité des espèces à faire face au réchauffement climatique pourrait être compromise par la diminution de la disponibilité en eau ou par les perturbations anthropiques telle que la fragmentation des habitats qui limite fortement la capacité de dispersion des amphibiens (Araújo *et al.*, 2006; Dolgener *et al.*, 2014).

1.2.4.2 La fragmentation et la destruction des habitats

Contrairement au facteur précédemment évoqué, l'effet de la destruction des habitats est aussi clair que direct. Lorsqu'une zone importante d'un habitat naturel est convertie en zone agricole ou résidentielle ou plus largement anthropisée, les espèces présentes sont fortement affectées (Alford, 2010). Ainsi la destruction de la végétation du Queensland en

Australie expliquerait le déclin de nombreuses populations de vertébrés, y compris de grenouilles, tout comme l'exploitation de mines en Inde expliquerait la réduction de moitié de la richesse spécifique en amphibiens (Krishnamurthy et Hussain, 2004; Woinarski *et al.*, 2006). D'après les données de la *Global Amphibian Assessment*, la perte d'habitat serait la cause principale du déclin des populations d'amphibiens, excepté pour les espèces en danger critique d'extinction (Tableau 1.2 ; IUCN, 2008).

Sans aboutir à la destruction des habitats, leur fragmentation peut être également dévastatrice (Becker *et al.*, 2007; Alford, 2010). En effet, suivant les espèces et les populations considérées, les milieux de vie et les zones de pontes ne sont pas forcément adjacents. Partout dans le monde, de nombreux exemples illustrent un accroissement de la mortalité causée par la construction des routes qui traversent et fractionnent les habitats naturels des amphibiens (Elzanowski *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2012; Cosentino *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2015). Au Brésil, le détournement des flux hydriques pour l'agriculture ou l'industrie aurait créé des zones sèches, appauvries en végétation, déconnectées des zones humides et serait responsable d'une baisse significative de la richesse spécifique en amphibiens (Becker *et al.*, 2007). Plus généralement, les espèces ayant une forte dispersion spatiale seraient les plus impactées, à court terme, par une fragmentation des habitats. Néanmoins les espèces ayant des capacités de dispersion limitées seraient tout autant susceptibles d'être mises en péril par la perte d'habitat et la fragmentation sur des périodes de temps plus longues (Cushman, 2006).

Enfin, le changement de qualité de l'habitat est également à associer à ces facteurs de déclin. L'hydropériode en est un exemple très étudié car fortement lié aux lieux de ponte et de développement des larves. Il s'agit de la période de temps pendant laquelle une zone humide est recouverte d'eau, un paramètre dont les changements ont pu être corrélés au déclin de certaines populations (Daszak *et al.*, 2005; Palis *et al.*, 2006). Les modifications de l'hydropériode peuvent découler de l'utilisation des terres avoisinantes ou de l'extraction des eaux souterraines (Gray et Smith, 2005; Guzy *et al.*, 2006). Les effets sur les populations d'amphibiens sont exacerbés par la modification globale de la qualité de l'eau, elle-même liée à de nombreux facteurs abiotiques (pH, conductivité, température, contaminants chimiques) ou biotiques (espèces invasives) (Brodman *et al.*, 2003; Babbitt *et al.*, 2006; Alford, 2010).

1.2.4.3 La surexploitation des espèces

D'après les données de la *Global Amphibian Assessment*, 5 % à 10 % des espèces de chaque catégorie de l'IUCN sont menacées par la surexploitation (Tableau 1.2 ; IUCN, 2008). Comme évoqué avec les services écosystémiques de production, les amphibiens sont principalement exploités à des fins alimentaires et dans une moindre mesure à des fins médicinales. En revanche, à l'instar de nombreuses espèces de poissons et de reptiles, les amphibiens sont soumis au conséquent marché de l'animal de compagnie. Contrairement aux récurrentes captures sauvages de têtards par des enfants dans les zones humides avoisinantes, le marché des nouveaux animaux de compagnie est mondialisé. La collecte de données sur ces échanges est particulièrement difficile. Ce ne serait pas forcément un marché en plein essor puisqu'en 2001, plus de 7,5 millions de reptiles et d'amphibiens avaient été importés aux États-Unis alors qu'en 2008 l'importation avait diminuée de 35 % (Herrel et van der Meijden, 2014). En revanche localement, dans les zones de captures, les implications peuvent être dévastatrices, d'autant plus que ce marché est couramment associé à des comportements de captures illégales d'espèces protégées (Natusch et Lyons, 2012). Il pourrait s'agir de l'une des plus grosses menaces pour les populations de Madagascar (Andreone *et al.*, 2006).

À noter cependant que l'élevage, bien que marginal il y a quelques années, se démocratise de plus en plus (Herrel et van der Meijden, 2014). Il est populairement admis dans les communautés aquariophile et terrariophile que les élevages produisent des individus en meilleure santé, peu ou pas toxiques (cas des *Dendrobates* venimeuses à l'état sauvage), plus adaptés à la vie et à l'alimentation en terrarium et avec des phénotypes (en général la couleur) mieux fixés par plusieurs générations de sélection (Merminod, 2000). Ainsi certaines des espèces les plus populaires en terrariophilie telles la grenouille cornue *Ceratophrys cranwelli* (Figure 1.3.I), ou les grenouilles arboricoles comme la grenouille aux yeux rouges *Agalychnis callidryas* (Figure 1.3.H) et les nombreuses espèces de grenouilles venimeuses *Dendrobates* (Figure 1.3.P) proviennent principalement d'élevages amateurs ou professionnels (Cox *et al.*, 2008). Ironiquement, l'axolotl *Ambystoma mexicanum* (Figure 1.5.I) serait plus commun en élevage qu'il l'est dans la nature (Cox *et al.*, 2008).

Outre l'impact de ce marché mondialisé sur les populations sauvages, l'exportation d'amphibiens faciliterait la dispersion géographique de nombreux pathogènes ou d'espèces invasives (Fisher *et al.*, 2012; Gilbert *et al.*, 2012; Peel *et al.*, 2012).

1.2.4.4 L'introduction d'espèces invasives

Les amphibiens, larves ou adultes sont vulnérables à un large éventail de prédateurs indigènes (Babbitt et Meshaka, 2000; Tarr et Babbitt, 2002; Lips *et al.*, 2005; Fitzpatrick *et al.*, 2009). En outre, parmi l'ensemble des prédateurs d'amphibiens, sont aussi présentes des espèces exotiques invasives. La terminologie liée à cette notion est sujette à discussion (Colautti et MacIsaac, 2004). Il est admis qu'une espèce invasive est une espèce introduite, parfois intentionnellement, dans un milieu donné, donc par définition non indigène, et qui a une forte propension à la propagation, causant par la même de nombreux dommages à l'environnement dans ses composantes biotiques et abiotiques. En ce qui concerne le déclin des populations d'amphibiens, la littérature s'est principalement concentrée sur les espèces de poissons et d'amphibiens invasives dans les milieux aquatiques.

Dans de nombreux pays, des poissons non-indigènes ont été largement introduits dans des habitats naturels qui en étaient dépourvus, pour la pêche sportive ou dans les bassins de jardin pour l'agrément (Knapp et Matthews, 2000; Pilliod et Peterson, 2001; Leu *et al.*, 2009; Pilliod *et al.*, 2010). Non sans conséquences pour les populations d'amphibiens, leurs impacts s'observent dans différentes régions nord et sud-américaines, européennes et australiennes (Pilliod et Peterson, 2001; Ortubay *et al.*, 2006; Reynolds, 2009; Alford, 2010; Peeler *et al.*, 2011). Ils apparaissent même comme l'un des facteurs premiers de déclin des grenouilles de la Sierra Nevada en Californie (Knapp et Matthews, 2000; Knapp *et al.*, 2007).

Les perturbations engendrées par les espèces invasives d'amphibiens sont également très étudiées. En particulier la grenouille-taureau (ou ouaouaron) *Lithobates catesbeianus* (Figure 1.3.U) a été introduite intentionnellement dans de nombreux pays du monde pour son élevage à des fins alimentaires mais également comme agent de lutte biologique ou comme espèce ornementale (Laufer *et al.*, 2008). En milieu naturel, la grenouille-taureau est un prédateur vorace de larves et d'adultes d'amphibiens, largement impliqué dans le déclin de nombreuses populations par prédation, compétition ou modification de l'habitat (Pearl *et al.*, 2004; Laufer *et al.*, 2008).

En revanche peu d'études concernent les effets des autres prédateurs aquatiques invasifs ou des espèces terrestres invasives sur les populations d'amphibiens. Cependant le vison d'Amérique et des espèces de serpents d'eau, de centipèdes, d'écrevisses ou de plantes invasives sembleraient aussi être impliquées dans le déclin de plusieurs populations (Ahola *et al.*, 2006; Anthony *et al.*, 2007; Bucciarelli *et al.*, 2014; Nunes *et al.*, 2014; Rose et Todd, 2014).

Une fois encore, ce facteur du déclin n'est pas totalement indépendant des autres. Outre la prédation directe des œufs, des larves ou des adultes, les espèces exotiques invasives sont parfois des réservoirs et des vecteurs de pathogènes que les amphibiens autochtones ne savent pas combattre (Bai *et al.*, 2010; Peeler *et al.*, 2011; Bucciarelli *et al.*, 2014). Par ailleurs, l'invasion d'un milieu par des espèces exotiques prédatrices semble également accroître l'impact des contaminants chimiques, déstabilisant toujours plus des populations déjà menacées (Relyea, 2003; Relyea *et al.*, 2005; Boone *et al.*, 2007; Davidson et Knapp, 2007; Relyea, 2012).

1.2.4.5 L'émergence de pathogènes

Les maladies infectieuses sont l'une des principales menaces pour la biodiversité mondiale (Daszak *et al.*, 2000; Fisher *et al.*, 2012; McCallum, 2012). Une étude portant sur les années 1940 à 2004 suggérait une amplification de leurs incidences et de leurs impacts au cours des décennies (Jones *et al.*, 2008). La grande majorité des agents pathogènes infectent plusieurs espèces hôtes dites réservoirs qui hébergent et transmettent les pathogènes sans forcément déclarer la maladie infectieuse (Woolhouse *et al.*, 2001). L'incidence de la maladie est liée à la transmission de l'agent pathogène d'une espèce réservoir à une espèce sensible, potentialisant ainsi la persistance de la maladie au sein d'un écosystème de même que les effets dévastateurs qui en découlent (Keesing *et al.*, 2010; McCallum, 2012; Ostfeld et Keesing, 2012; Engering *et al.*, 2013). La *Global Amphibian Assessment* identifie les maladies infectieuses comme la principale menace pour les espèces d'amphibiens en danger critique d'extinction (Tableau 1.2 ; IUCN, 2008). Deux infections semblent particulièrement impliquées dans les populations d'amphibiens : les virus du type ranavirus et le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis*.

Les ranavirus sont relativement proches des virus de poissons et certains sont d'ailleurs transmissibles d'une classe à l'autre, augmentant ainsi le nombre d'espèces

réservoirs et les potentiels modes de transmission (Ahne *et al.*, 1997). De nombreux cas de mortalité *in natura* de grenouilles et de salamandres dus aux ranavirus sont rapportés dans la littérature (Brunner *et al.*, 2004; Collins *et al.*, 2004; Fox *et al.*, 2006; Harp et Petranka, 2006). L'infection par les ranavirus se caractérise par des œdèmes, des hémorragies, et une nécrose des muscles squelettiques, des tissus lymphoïdes, hématopoïétiques, du foie, de la rate, et des tubules rénaux (Miller *et al.*, 2007). Si les cas d'épidémie ou de mortalité de masse existent, l'impact des ranavirus est généralement local et ces virus ne semblent être une menace majeure et persistante pour aucune espèce (Brunner *et al.*, 2004). Cependant il a été montré expérimentalement une possible transmission de l'infection entre un sédiment contaminé et des têtards, suggérant le potentiel danger de l'eau de transport des poissons et des amphibiens exotiques et du marché des nouveaux animaux de compagnie (Harp et Petranka, 2006). Par ailleurs la présence de contaminants chimiques dans le milieu, comme l'atrazine, est susceptible de modifier la dynamique de la maladie et de favoriser les épidémies chez la salamandre tigrée *Ambystoma tigrinum* (Forson et Storfer, 2006).

La chytridiomycose est une épizootie dont le lien avec le déclin des amphibiens n'a été découvert que très récemment (Berger *et al.*, 1998). Elle est désormais constatée partout dans le monde, à la fois sur les continents mais également sur certaines îles (Beard et O'Neill, 2005; Díaz *et al.*, 2007; Longcore *et al.*, 2007; Woodhams, Kilburn, *et al.*, 2008; Kielgast *et al.*, 2010; Swei *et al.*, 2011; Bal *et al.*, 2014). Son agent infectieux, le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis*, contamine par l'intermédiaire d'un nombre important d'espèces hôtes comprenant des larves ou des adultes, d'espèces résistantes ou sensibles à la chytridiomycose (Daszak *et al.*, 2004; De Castro et Bolker, 2005; Woodhams et Alford, 2005). Ces espèces résistantes favorisent la propagation de la maladie en constituant des réservoirs, expliquant ainsi sa persistance dans les milieux et son rôle dans l'extinction de nombreuses populations (Van Rooij *et al.*, 2012; Gervasi *et al.*, 2013). *Batrachochytrium dendrobatidis* est une moisissure qui décompose les parties kératinisées de la peau des amphibiens (Piotrowski *et al.*, 2004). Chez le têtard il est seulement présent au niveau du champ buccal, en revanche chez l'adulte la totalité de la peau est kératinisée (Swei *et al.*, 2011). C'est pourquoi les têtards infectés ne semblent pas présenter de symptômes morbides, la mortalité de masse apparaissant au moment de la métamorphose (Daszak *et al.*, 2004; Rachowicz *et al.*, 2006). Les signes fonctionnels ou symptômes liés aux adultes infectés et sensibles sont très variés (anorexie, léthargie, décoloration et desquamation importante de la peau, divers ulcères

systémiques, ...) (Berger *et al.*, 1999). La prévalence de la chytridiomycose demeure mal connue. En revanche de nombreux cas d'extinction de populations ont été constatés (Bosch *et al.*, 2001; Bradley *et al.*, 2002; Muths *et al.*, 2003; Lips *et al.*, 2004). Outre la sensibilité inhérente à chaque espèce, de nombreux facteurs (pH, température, infections multiples, ...) conduisent à une variabilité de sensibilité à l'échelle des populations (Bosch *et al.*, 2001; Alford, 2010; Bradley *et al.*, 2015). C'est notamment le cas des contaminants chimiques. Plusieurs herbicides sont susceptibles d'affecter le système immunitaire des amphibiens (Christin *et al.*, 2004; Langerveld *et al.*, 2009). Cependant, plusieurs études montrent une atténuation de l'action de *Batrachochytrium dendrobatidis* chez des amphibiens exposés au glyphosate (Gahl *et al.*, 2011; Hanlon et Parris, 2014). Dans ce cas, cela suggère que l'herbicide affecte principalement l'agent pathogène avant le système immunitaire de l'hôte et illustre la complexité de l'étude des stress multiples.

1.2.4.6 La contamination chimique des milieux

Les amphibiens, en raison de leur mode de vie complexe alliant un cycle à la fois aquatique et terrestre et une peau très perméable aux xénobiotiques, sont considérés par de nombreux auteurs comme des espèces plus sensibles aux changements environnementaux que d'autres (Halliday, 2000; Norris, 2007; Quaranta *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2010). Cependant l'idée de qualifier la grenouille d'espèce indicatrice de l'état de santé des zones humides, à la manière des canaris dans les mines de charbon, a été remise en question par une récente étude qui tend à démontrer que les amphibiens ne sont pas plus sensibles que d'autres taxons (Kerby *et al.*, 2010). Cette étude est elle-même discutable puisqu'elle regroupe majoritairement des données de toxicité directe issues d'expositions aux pesticides. De plus, sur les douze taxons considérés, dix concernent des espèces d'invertébrés, cibles intentionnellement privilégiées desdits pesticides (Hayes *et al.*, 2010).

Toutefois bien que leur sensibilité soit discutée, les amphibiens sont en contact avec une multitude de contaminants chimiques. En effet, parmi les écosystèmes d'eau douce, les zones humides sont des milieux complexes souvent exposés aux stress chimiques (Zhang *et al.*, 2010). Zones de récupération et d'accumulation de nombreux xénobiotiques, elles présentent une contamination faible, mais chronique par un large éventail de molécules. Plusieurs études ont soulevé un lien entre des contaminants chimiques transportés par les vents

ou les eaux de surface et des déclinés de populations de grenouilles et de salamandres (Reeder *et al.*, 2005; Bank *et al.*, 2006; Davidson et Knapp, 2007). *In natura*, cette relation a surtout été étudiée en lien avec l'agriculture et l'usage des pesticides (Davidson *et al.*, 2001, 2002; Sparling *et al.*, 2001; Davidson, 2004). Plus généralement, parmi les études écotoxicologiques sur les amphibiens, les classes de contaminants les plus étudiées sont les pesticides non chlorés tels les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoides. Viennent ensuite les métaux, polluants inorganiques ayant aussi une possible origine agricole, puis les polychlorobiphényles et enfin les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et les pesticides organochlorés (Sparling *et al.*, 2010a).

L'effet des polluants sur les amphibiens peut être abordé selon quatre mécanismes non indépendants que sont : la toxicité directe, les effets sub-létaux sur la physiologie ou le comportement, les effets combinés avec d'autres facteurs et enfin les effets indirects à travers la chaîne trophique (Relyea, 2008).

La toxicité directe des contaminants est la plus élémentaire à appréhender. Pourtant elle ne semble jouer qu'un rôle mineur dans le déclin des populations d'amphibiens. En effet, la mortalité observée expérimentalement survient généralement pour des doses d'exposition supérieures à celles couramment retrouvées dans les milieux naturels (Boone et Semlitsch, 2001). Exception faite de certaines molécules, notamment l'herbicide commercial Roundup pour lequel une mortalité larvaire supérieure à 70% a été obtenue à des concentrations mesurées dans la nature (Relyea *et al.*, 2005). La toxicité directe est généralement caractérisée par l'identification d'une concentration létale de polluant qui induit la mortalité de 50 % d'une population (CL_{50}). Ces valeurs seuils standardisées sont commodes pour des analyses comparatives de toxicité entre plusieurs molécules ou plusieurs taxons mais sont particulièrement limitées lors de l'extrapolation des résultats aux organismes dans la nature. Elles ne permettent pas de comprendre les perturbations engendrées par les polluants sur le développement, le comportement ou la physiologie des animaux (Fleeger *et al.*, 2003; Relyea et Hoverman, 2006). Des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental induisent en revanche une grande variété d'effets sub-létaux. Ainsi, des doses de l'insecticide carbamate carbaryl supérieures à celles retrouvées dans l'environnement sont nécessaires pour induire une mortalité des larves de grenouille *Lithobates sphenoccephalus* (Figure 1.3.V). Cependant de plus faibles doses font apparaître d'importantes malformations non létales à la métamorphose (Bridges, 1999, 2000). Une partie considérable de la littérature est consacrée

aux effets des polluants sur les stades têtard et larvaire. Ainsi, il a été montré que de nombreux polluants avaient pour effet de retarder la métamorphose et le développement des amphibiens. Le métal lourd cadmium, l'herbicide commercial Roundup ou le perchlorate, utilisé comme agent propulseur de missiles, en sont de bons exemples (Goleman *et al.*, 2002; Cauble et Wagner, 2005; Gross *et al.*, 2009). L'atrazine retarde également le développement des têtards de *Xenopus laevis* (Freeman *et al.*, 2005). Peu coûteux et simple d'utilisation, l'atrazine a été l'herbicide le plus largement utilisé dans le monde. Depuis 2003 son usage est interdit en France (INERIS, 2007; Lehman et Williams, 2010). Son importante utilisation à travers le monde ainsi que ses récentes interdictions font de l'atrazine l'une, si ce n'est la molécule la plus étudiée sur les amphibiens. Outre les retards de développement, l'atrazine augmente l'activité motrice des larves de salamandre *Ambystoma barbouri* (Figure 1.5.J) par un effet direct sur le système nerveux (Rohr *et al.*, 2003). Cet herbicide perturbe également fortement le système reproducteur. Il provoque une diminution du volume des gonades et un hermaphrodisme chez les larves de *Xenopus laevis* exposées, ainsi qu'une oogenèse testiculaire chez les larves de *Ranidae* exposées (Tavera-Mendoza *et al.*, 2002a, 2002b; Orton *et al.*, 2006; Hayes *et al.*, 2006a). L'atrazine a aussi été associée à des malformations sexuelles observées sur des amphibiens adultes dans l'environnement (Hayes *et al.*, 2002, 2003). Les effets de l'atrazine sont également perceptibles sur le système immunitaire. Chez la grenouille léopard *Lithobates pipiens* (Figure 1.3.W) adulte exposée, l'herbicide augmente en effet le recrutement des globules blancs et diminue leur activité phagocytaire (Brodkin *et al.*, 2007). Plus généralement les polluants peuvent grandement altérer le système immunitaire, à la manière des pesticides agricoles qui affaiblissent les réponses de prolifération lymphocytaire chez *Xenopus laevis* et *Lithobates pipiens* (Christin *et al.*, 2003, 2004) ou qui réduisent les peptides défensifs de la peau de *Rana boylei* (Figure 1.3.X ; Davidson *et al.*, 2007) ou encore du cadmium qui réduit la cellularité splénique chez *Rhinella marina* (Figure 1.3.M ; Linzey *et al.*, 2003).

Cette grande diversité de perturbations liée aux contaminants chimiques peut avoir des conséquences dramatiques en combinaison avec d'autres facteurs de stress. Par exemple, la croissance des têtards de grenouilles australiennes *Limnodynastes peronii* (Figure 1.3.B) est davantage affectée par l'insecticide endosulfan lorsque la température augmente (Broomhall, 2004). De plus, ce même insecticide altère leur comportement d'évitement des prédateurs (Broomhall, 2004). Réciproquement, il a été montré que certains pesticides comme le carabaryl ou le Roundup sont plus toxiques sur des têtards si ces derniers sont en présence de prédateurs

ou de signaux de prédation (Relyea et Mills, 2001; Relyea, 2003, 2004). En outre, un autre herbicide, l'amtrol, inhibe lui aussi le comportement d'évitement des signaux de prédation chez les têtards de grenouilles rousses et de crapauds communs. Curieusement leur survie n'est pas modifiée expérimentalement puisque l'amtrol altère également le comportement de prédation des larves de salamandre tachetée (Mandrillon et Saglio, 2006, 2007). Compte-tenu de l'implication de ces comportements prédateurs dans la structuration des chaînes trophiques et sur le transfert d'éléments nutritifs du milieu aquatique au milieu terrestre, les contaminants chimiques perturbent fortement les services écosystémiques d'auto-entretien. Enfin, en perturbant le système immunitaire des amphibiens, les xénobiotiques favorisent leur infection par les pathogènes. Cela a été démontré avec le Roundup qui augmente la sensibilité à l'infection au trématode chez *Lithobates clamitans* (Figure 1.3.Y) et l'atrazine qui augmente le taux d'infection par les trématodes chez *Lithobates sylvaticus* ou par les ranavirus chez *Ambystoma tigrinum* (Kiesecker, 2002; Forson et Storfer, 2006; Rohr *et al.*, 2008).

Pour finir, les conséquences des contaminants chimiques sur les amphibiens peuvent être évaluées par leurs effets indirects, notamment à travers la chaîne trophique. Le cas le mieux décrit est celui de l'atrazine qui réduit dans le milieu la concentration du périphyton, un mélange de bactéries, de champignons et d'algues dont se nourrissent les larves d'amphibiens (Boone et James, 2003). L'affaiblissement du périphyton pousserait les larves à être plus actives, en quête de nourriture et les exposerait d'autant plus à la prédation (Rohr *et al.*, 2003; Rohr et Crumrine, 2005).

Les perturbations engendrées par les contaminants chimiques sont donc très variées suivant les polluants, les taxons et la complexité du milieu considéré. En outre, pour une molécule et une espèce données, les perturbations sont multiples et touchent des fonctions aussi complexes que vitales telles celles du système nerveux, du système immunitaire, du système reproducteur, ou encore le métabolisme de façon générale. C'est pourquoi, à l'instar du très décrit herbicide atrazine, de nombreux contaminants chimiques retrouvés dans l'environnement peuvent être considérés comme des perturbateurs des systèmes hormonaux également nommés « perturbateurs endocriniens » (Hayes *et al.*, 2010).

1.3 Les perturbateurs endocriniens

La communication chimique est à la base de tous les échanges d'informations au sein des organismes, des interactions organisme-organisme et organisme-environnement. Relativement tôt dans l'évolution, trois principaux systèmes de communication se sont développés chez les animaux (excepté les éponges) : le système nerveux, le système immunitaire et le système endocrinien (Kloas, 2002). Un système endocrinien est composé des organes impliqués dans la synthèse, la sécrétion, le transport, la dégradation et plus généralement dans le fonctionnement des hormones et des récepteurs associés. Lesdites fonctions sont aussi variées que primordiales : développement, régulation osmotique, métabolisme, reproduction, comportement, ... (Norris et Carr, 2013).

Les contaminants chimiques rejetés dans l'environnement par l'être humain peuvent altérer les mécanismes normaux de régulation physiologique en mimant ou en inhibant l'action de ces régulateurs naturels (Hotchkiss *et al.*, 2008; Vandenberg *et al.*, 2012). La perturbation de la régulation endocrine par les contaminants environnementaux et bien d'autres molécules, est alors appelée « perturbation endocrinienne » et les contaminants « perturbateurs endocriniens ». Les perturbateurs endocriniens incluent quelques composés naturels d'origine végétale (phyto-œstrogènes) ou fongique (myco-œstrogènes) ainsi qu'une grande variété de composés chimiques de synthèse tels des pesticides, des médicaments, des plastifiants, des sous-produits de l'industrie, ... (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009).

1.3.1 Une terminologie récente

L'expression anglophone « *endocrine disruptor* », traduite en français par perturbateur endocrinien, est évoquée pour la première fois par Théo Colborn en 1991 lors de la conférence de Wingspread dans le Wisconsin (Colborn et Clement, 1992). Dès lors, une succession de nombreuses définitions a permis de préciser la notion. Ainsi en 1995, l'USEPA, l'Agence de Protection Environnementale des États-Unis, définissait les perturbateurs endocriniens comme étant des agents exogènes pouvant interférer dans la synthèse, la sécrétion, le transport, l'interaction, l'activité ou l'élimination des hormones naturelles qui sont impliquées dans le maintien de l'homéostasie, de la reproduction, du développement ou du comportement (Kavlock *et al.*, 1996). Cette définition a été reformulée en 2002 puis mise

à jour en 2012 par l’OMS, l’Organisation Mondiale de la Santé : « un perturbateur endocrinien est une substance ou un mélange exogène altérant les fonctions du système endocrinien et induisant donc des effets nocifs sur la santé d’un organisme intact, de ses descendants ou (sous-)populations » (OMS, 2002, 2012).

1.3.2 Une remise en cause du principe de Paracelse et de linéarité

Paracelse, médecin suisse du XVI^e siècle, et communément considéré comme un père fondateur de la toxicologie, est notamment associé à la fameuse maxime « toutes les choses sont poison, et rien n’est sans poison ; seule la dose détermine ce qui n’est pas un poison ». Ainsi, durant plusieurs siècles, il était considéré que la réponse d’un organisme à un composé chimique était décrite par une fonction numérique monotone plus ou moins linéaire. Une fonction monotone est une fonction numérique invariable quant à son sens de variation, autrement dit une fonction qui reste toujours soit croissante ou soit décroissante. Encore de nos jours en toxicologie et en écotoxicologie, l’innocuité d’une substance chimique est usuellement fixée à la dose à laquelle il n’est plus retrouvé les effets observés à des doses supérieures. À cette dose sans effet observable (NOEL, de l’anglais *no observed effect level*) sont appliqués des facteurs de sécurité tenant compte des différences observées lors de l’extrapolation de données provenant d’études expérimentales, le plus souvent conduites chez l’animal, par rapport à une situation d’exposition réelle chez l’homme (Figure 1.10.A). En conséquence les réglementations en matière de toxicologie sont principalement basées sur des seuils (à la manière de la CL₅₀ évoquée en 1.2.4.6, ou de la CE₅₀, la concentration efficace médiane pour laquelle 50 % de la population présente une réponse).

Pourtant, après presque 25 ans de recherches sur les perturbateurs endocriniens, de nombreuses études ont mis en évidence que l’utilisation de fortes doses de contaminants souffre d’un manque de réalisme quant à l’évaluation de l’innocuité d’une molécule (Vandenberg *et al.*, 2012). En effet, outre les usuelles courbes dose-réponse monotones, les perturbateurs endocriniens décrivent occasionnellement des courbes dose-réponse non-monotones généralement en forme de U (avec les réponses maximales de l’effet mesuré observées à des doses faibles et des doses élevées) ou en forme de U inversé (avec les réponses maximales observées à des doses intermédiaires) (Vandenberg *et al.*, 2012). Ce mécanisme est nommé hormèse en toxicologie (Mattson, 2008). Il a notamment été illustré

par de faibles concentrations d'atrazine qui accélèrent le taux de développement et la métamorphose de têtard de *Rhinella arenarum* dans une relation dose-réponse non-monotone en forme de U (Brodeur *et al.*, 2013). Ce phénomène est également retrouvé d'une certaine manière avec *Lithobates sylvaticus* chez qui une exposition précoce à de faibles concentrations de carbaryl induit une tolérance accrue à d'autres pesticides selon un modèle non linéaire (Hua *et al.*, 2014). Par conséquent, l'extrapolation des effets à faibles doses de contaminant à partir des valeurs seuils obtenues avec de fortes concentrations est difficilement applicable dans le cas des perturbateurs endocriniens qui s'inscrivent dans un paradigme différent de celui de Paracelse (Figure 1.10.B).

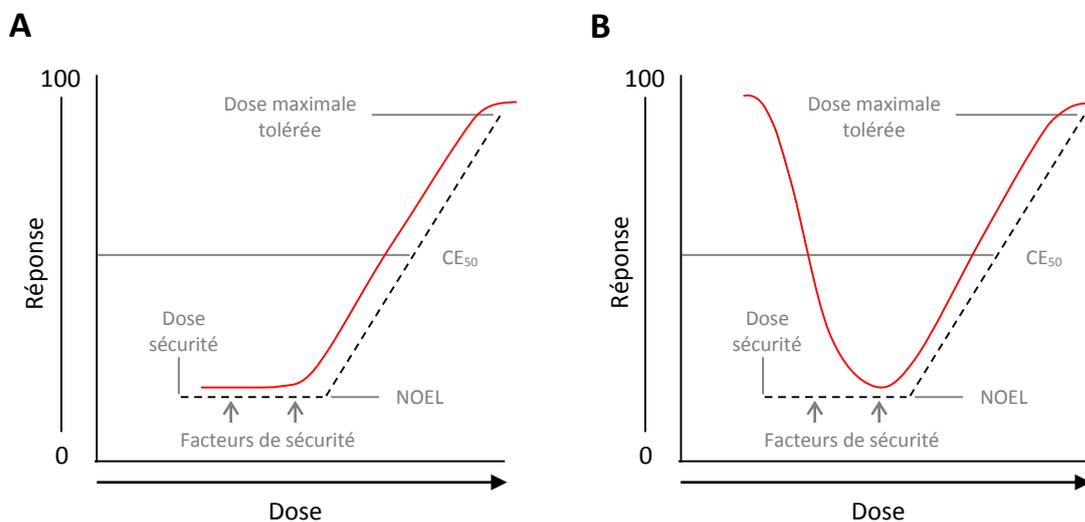


Figure 1.10 : La courbe dose-réponse en toxicologie. A. Cas d'une courbe dose-réponse monotone non-linéaire. Des doses élevées sont testées pour obtenir la dose maximale tolérée, et la dose sans effet observable (NOEL). Plusieurs facteurs de sécurité sont ensuite appliqués pour calculer la dose de référence, soit la dose à laquelle les expositions sont présumées sans danger. **B. Cas d'une courbe dose-réponse non-monotone.** Lorsque les contaminants chimiques ou les hormones sont impliqués dans des phénomènes d'hormèse, les effets indésirables peuvent être observés au niveau ou en dessous de la dose de référence. Il est donc nécessaire de tester directement cette dose référence. Modifié d'après Vandenberg *et al.* (2012).

1.3.3 La perturbation endocrinienne chez les amphibiens

Les perturbateurs endocriniens, comme la grande majorité des contaminants chimiques de l'environnement, sont largement présents dans les eaux de surface. Ils sont effectivement retrouvés dans de nombreuses zones humides à travers le monde (Chapman, 2003; Xue *et al.*, 2008; Norris et Burgin, 2010; Díaz-Torres *et al.*, 2013). Comme les

amphibiens ont la peau très perméable et restent généralement dans les habitats aquatiques au cours de leur développement, phase critique d'un point de vue hormonal, ils sont des cibles potentielles des perturbateurs endocriniens (Hayes *et al.*, 2002; Quaranta *et al.*, 2009). Cependant, les connaissances scientifiques concernant les conséquences de l'exposition des amphibiens aux perturbateurs endocriniens sont relativement limitées par rapport à d'autres vertébrés comme les poissons (Kloas *et al.*, 2009). Le mode d'action de ces contaminants a été principalement étudié du point de vue de leurs effets sur le système thyroïdien et la fonction reproductrice des amphibiens.

1.3.3.1 Des effets sur le système thyroïdien

Chez les vertébrés, le phénomène de métamorphose ne concerne que les lamproies, quelques poissons téléostéens et la très grande majorité des amphibiens (Dufour et Rousseau, 2007; Silva *et al.*, 2013). Elle a donc été étudiée surtout chez les amphibiens, chez lesquels cette métamorphose est une phase de profonds changements, tels que l'apparition et la différenciation des membres, la résorption de la queue ou la réorganisation du système gastro-intestinal. Ces événements sont principalement sous le contrôle des hormones thyroïdiennes et de l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien (Kloas *et al.*, 2009).

L'hypothalamus sécrète l'hormone thyrotrope (TRH) qui stimule la synthèse et la libération de thyrostimuline (TSH) par l'adénohypophyse. À noter cependant que chez les amphibiens au stade larvaire, c'est la corticolibérine (CRH) qui joue le rôle de la TRH. À son tour la TSH stimule la synthèse et la sécrétion des hormones thyroïdiennes thyroxine T_4 et triiodothyronine T_3 (Figure 1.11). La première est une prohormone inactive mais avec une durée de vie plus longue. Elles agissent par un rétrocontrôle négatif sur les sécrétions de TRH/CRH et de TSH (Fort *et al.*, 2007; Denver, 2013). En outre, les hormones thyroïdiennes sont usuellement définies comme stimulatrices du métabolisme de base. Ainsi, chez les amphibiens elles jouent un rôle clé au cours du développement, de la croissance et de la métamorphose comme la résorption des organes larvaires ou encore l'organogenèse et le développement du système immunitaire de l'adulte (Fort *et al.*, 2007; Denver, 2013).

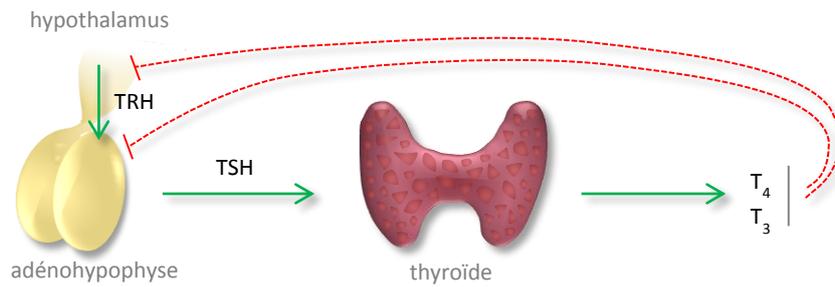


Figure 1.11 : L'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien. Cet axe contrôle le développement, la croissance et la métamorphose des amphibiens. Les flèches vertes illustrent les sécrétions d'hormones : l'hormone thyrotrope (TRH) est sécrétée par l'hypothalamus, l'adénohypophyse produit la thyrostimuline (TSH) et la thyroïde produit les hormones thyroïdiennes thyroxine (T4) et triiodothyronine (T3). Les lignes rouges pointillées illustrent les rétrocontrôles des hormones thyroïdiennes sur la production de TRH, et de TSH.

Ainsi plusieurs tests ont été mis en place sur amphibiens, principalement afin d'évaluer le plus précisément et avec la meilleure robustesse possible la perturbation du système thyroïdien par diverses molécules. Ces tests ont majoritairement été développés sur *Xenopus* car cette espèce, facile à élever, est utilisée en laboratoire depuis les années trente, les différentes étapes de son développement embryologique et larvaire sont très bien référencées et son génome est séquencé. Ces tests sont basés sur divers niveaux méthodologiques tels que la morphologie et les stades de développement durant la métamorphose (Figure 1.12 ; Opitz *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2010), l'histologie de la glande thyroïde (Figure 1.13 ; Opitz, Hartmann, *et al.*, 2006) ou la transcription des gènes sous le contrôle du système thyroïdien (Turque *et al.*, 2005; Opitz, Lutz, *et al.*, 2006).

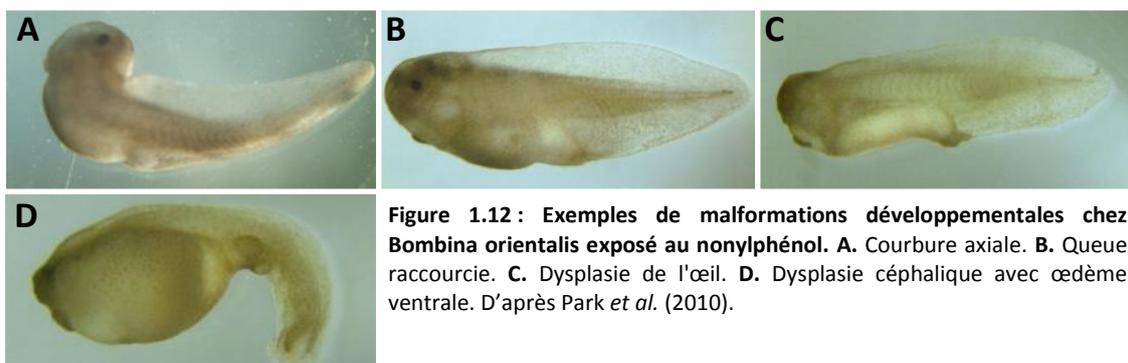


Figure 1.12 : Exemples de malformations développementales chez *Bombina orientalis* exposé au nonylphénol. A. Courbure axiale. B. Queue raccourcie. C. Dysplasie de l'œil. D. Dysplasie céphalique avec œdème ventrale. D'après Park *et al.* (2010).

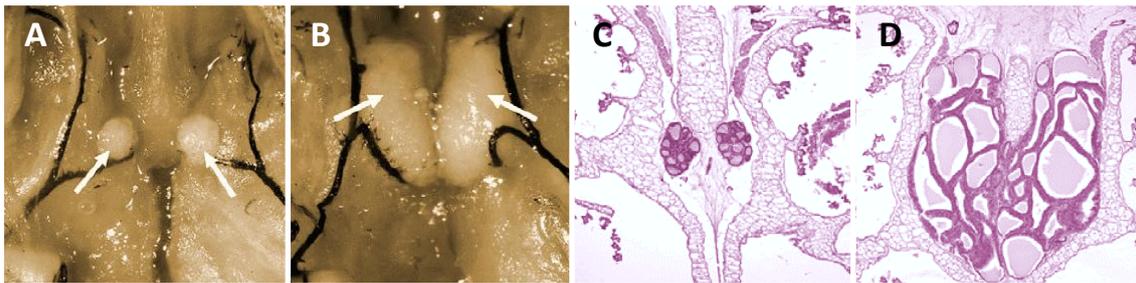


Figure 1.13 : Exemples de perturbations morphologique (A et B) et histologique (C et D) de la glande thyroïde chez *X. laevis* exposé à l'éthylène thiourée. Par rapport au témoin solvant (A), le traitement avec 25 mg.L-1 d'éthylène thiourée (B) provoque une augmentation marquée de la taille de la thyroïde. Cet accroissement est également observé lors de l'examen histologique des coupes de thyroïdes de têtards témoins (C) et de têtards traités à l'éthylène thiourée (D). D'après Opitz *et al.* (2006).

Les perturbateurs endocriniens agissent comme stimulateur ou inhibiteur du système thyroïdien des larves d'amphibiens. Lorsqu'ils ont un effet stimulateur ou un effet mimétique des hormones thyroïdiennes, les perturbateurs endocriniens accélèrent la métamorphose et conduisent à des juvéniles plus petits avec un succès reproducteur amoindri (Kloas *et al.*, 2009). À titre d'exemple, l'herbicide organochloré acétochlore accélère la métamorphose de *Xenopus laevis* (Crump *et al.*, 2002). Autre exemple, le bactéricide organochloré triclosan mime l'action des hormones thyroïdiennes, entraînant une sur-transcription des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans les cellules de *Xenopus laevis* (Veldhoen *et al.*, 2006). En revanche, une baisse du niveau d'hormones thyroïdiennes peut conduire à un retard voire une inhibition complète de la métamorphose. C'est notamment le cas des tributylétains, utilisés comme pesticides antifoulings, qui retardent la métamorphose de *Xenopus laevis* (Shi *et al.*, 2014) ou du perchlorate et des plastifiants comme le bisphénol A et le tétrabromobisphénol A qui sont deux antagonistes de l'hormone T3 et qui inhibent la métamorphose chez *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis* (Figure 1.3.E ; Tietge *et al.*, 2005; Jagnytsch *et al.*, 2006; Kashiwagi *et al.*, 2008). Le progestatif lévonorgestrel arrête quant à lui le développement des têtards de *Xenopus laevis* en cours de métamorphose par un mode d'action qui n'a pas encore été élucidé. En effet, aucun changement dans l'expression de gènes clés de l'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien n'a été détecté. Par ailleurs l'évaluation histopathologique des coupes de la glande thyroïde n'a révélé aucun signe typique de l'hypothyroïdie, mais plutôt une apparente inactivité de la thyroïde (Lorenz *et al.*, 2011).

1.3.3.2 Des effets sur la fonction reproductrice

Derrière la notion d'effet sur la fonction reproductrice se dissimulent deux éléments : le maintien de la fonction reproductrice chez l'adulte d'une part, et la différenciation sexuelle chez les juvéniles d'autre part. Chez les amphibiens, c'est majoritairement ce deuxième élément qui a été étudié (Kloas *et al.*, 2009).

À l'instar de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien pour la métamorphose, c'est l'axe gonadotrope qui joue un rôle clé dans la régulation de la différenciation sexuelle et de la reproduction (Figure 1.14). L'hypothalamus sécrète la gonadolibérine (GnRH) qui stimule la sécrétion par l'adénohypophyse de deux gonadotrophines : l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH). En agissant sur les gonades, FSH et LH conduisent à la synthèse et la libération des hormones stéroïdiennes sexuelles : les androgènes et les œstrogènes (Figure 1.14 ; Urbatzka *et al.*, 2006; Kloas *et al.*, 2009). L'œstrogène 17β -œstradiol est retrouvé chez tous les amphibiens et plus largement chez tous les vertébrés. La testostérone et l'androstanolone sont les principaux androgènes synthétisés par les *Anura*, tout comme chez les vertébrés supérieurs. En revanche, les *Urodela* produisent la 11-kétotestostérone comme androgène actif. Par conséquent les modes d'action des perturbateurs endocriniens de type androgéniques ou anti-androgéniques chez les *Anura* semblent plus proches des modes d'action décrits chez l'Homme que ceux décrits chez les *Urodela* (Kloas *et al.*, 2009). Les œstrogènes et les androgènes sont à la base des principaux modes d'action décrits lors d'une perturbation de l'axe gonadotrope par les perturbateurs endocriniens, à savoir : œstrogénique, anti-œstrogénique, androgénique et anti-androgénique.

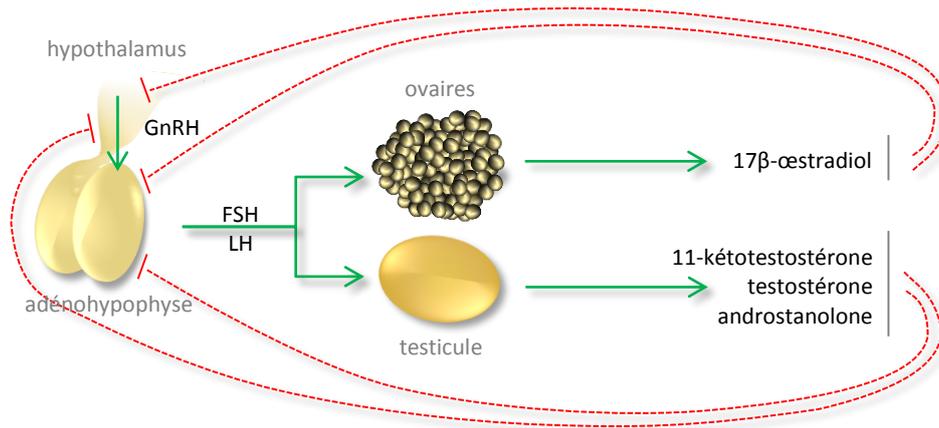


Figure 1.14 : L'axe gonadotrope. Cet axe contrôle le développement et la reproduction des amphibiens. Les flèches vertes illustrent les sécrétions d'hormones : la gonadolibérine (GnRH) est sécrétée par certains neurones hypothalamiques, l'adénohypophyse produit l'hormone lutéinisante (LH) et l'hormone folliculo-stimulante (FSH), et les gonades produisent l'œstrogène (17β-œstradiol) et les androgènes (testostérone, androstanolone et 11-kétotestostérone). Les lignes rouges pointillées illustrent les rétrocontrôles de l'œstrogène et des androgènes sur la production de GnRH, de FSH et de LH.

Les effets des perturbateurs endocriniens sont perceptibles dans l'expression des gonadotrophines. Il a été démontré une baisse de la LH plasmatique chez les grenouilles vertes exposées au composé œstrogénique nonylphénol, molécule utilisée dans l'industrie pour ses propriétés tensioactives (Mosconi *et al.*, 2002). De même, une diminution de la transcription du gène de la LH a été observée dans le cerveau de *Xenopus laevis* mâles et femelles exposés au composé œstrogénique modèle et contraceptif de synthèse éthinyloestradiol, ou dans celui de *Xenopus laevis* mâles exposés au composé androgénique modèle méthylldihydrotestostérone. En revanche l'exposition au tamoxifène, un composé anti-œstrogénique modèle couramment utilisé dans le traitement des cancers du sein non-hormonodépendants, augmente la transcription de LH et FSH chez les femelles *Xenopus laevis* exposées (Urbatzka *et al.*, 2006). Ce type d'effets opposés est aussi retrouvé dans les niveaux plasmatiques d'hormones stéroïdiennes sexuelles. En effet, l'éthinyloestradiol (œstrogénique) diminue le niveau plasmatique de 17β-œstradiol et de testostérone chez les femelles et les mâles *Xenopus laevis* alors que le tamoxifène (anti-œstrogénique) augmente la concentration plasmatique en 17β-œstradiol chez les femelles (Urbatzka *et al.*, 2007). En outre, des perturbations ont été également remarquées à l'échelle histologique. L'exposition de femelles *Xenopus laevis* au méthylldihydrotestostérone (androgénique) ou au tamoxifène (anti-œstrogénique) induit une légère dégénérescence des ovocytes (atrésie folliculaire) ainsi qu'une spermatogenèse ovarienne. Inversement, l'exposition de mâles *Xenopus laevis* à

l'éthinylestradiol (œstrogénique) s'accompagne d'une réduction du diamètre moyen des tubes séminifères et d'un effondrement de la spermatogenèse (Cevasco *et al.*, 2008). D'autres conséquences de nature comportementale, telle l'inhibition du chant nuptial des *Xenopus laevis* mâles exposés au composé anti-androgénique modèle flutamide, utilisé dans le traitement du cancer de la prostate, l'illustre (Behrends *et al.*, 2010). Enfin, les conséquences peuvent être populationnelles : chez *Xenopus laevis*, l'éthinylestradiol et l'acétate de cyrotérone, respectivement œstrogénique et anti-androgénique, induisaient une féminisation des juvéniles et le méthylldihydrotestostérone, androgénique, induisait leur masculinisation (Bögi *et al.*, 2002). Des phénomènes de féminisation parfois complètes, ont aussi été observés en laboratoire suite à l'exposition de *Xenopus laevis* à des herbicides ou des polychlorobiphényles (Figure 1.15 ; Qin *et al.*, 2007; Hayes *et al.*, 2011).

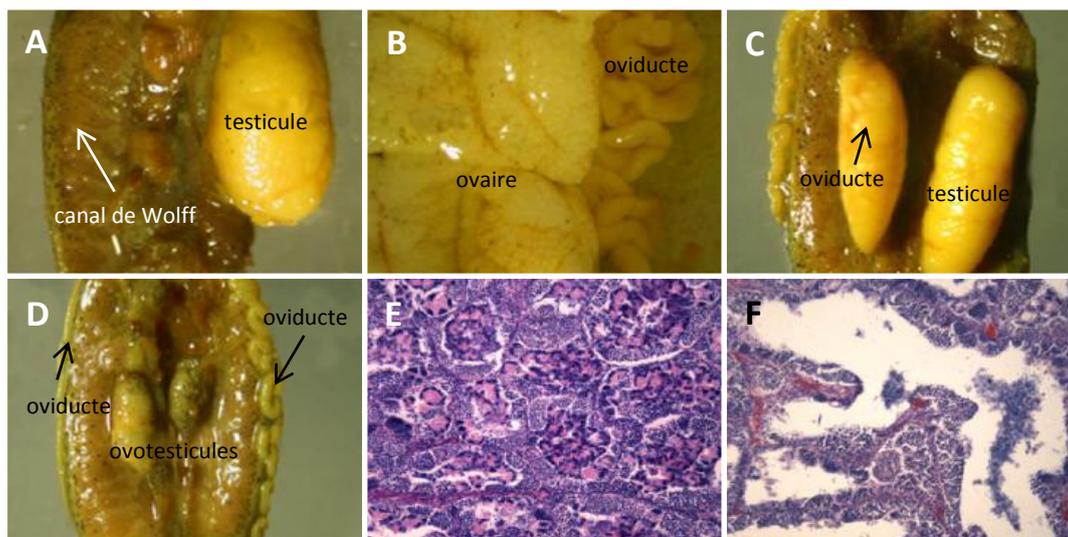


Figure 1.15 : Exemples morphologiques (A, B, C, D) et histologiques (E et F) de démasculinisation/féminisation chez *X. laevis*. A,B,C,D. Développement d'oviducte et d'ovotesticules chez *X. laevis* mâles exposés aux polychlorobiphényles, d'après Qin *et al.* (2007). A. Gonade de mâle témoin. B. Gonade de femelle témoin. C. Gonade de mâle exposé au PCB3, présence anormale d'oviducte. D. Gonade de mâle exposé à l'Aroclor 1254, présence anormal d'oviducte et d'ovotesticules. Le développement d'oviducte et d'ovotesticule souligne un phénomène de féminisation des mâles exposés. E,F. Lésion histologique des testicules chez *X. laevis* mâle exposé à l'atrazine, d'après Hayes *et al.* (2011). E. Les tubes séminifères des mâles témoins sont remplis de spermatozoïdes matures. F. Les tubes séminifères chez les mâles exposés à l'atrazine durant leur développement n'ont pas des spermatozoïdes matures et sont presque vides, avec seulement spermatoctes secondaires, signe d'une démasculinisation avancée.

Ces données collectées en laboratoire ont montré qu'un large éventail de composés chimiques a la capacité de modifier les systèmes hormonaux et d'affecter le développement et la fonction reproductrice chez les amphibiens, notamment les *Anura*. En revanche la plupart d'entre-elles ont été obtenues dans des études utilisant des concentrations supérieures à celles couramment trouvées dans les milieux naturels. Exception faite de quelques études portant sur les polychlorobiphényles, le perchlorate et l'atrazine et leurs effets sur *Lithobates pipiens* et *Xenopus laevis* (Hayes *et al.*, 2006b; Orton et Tyler, 2015). Ces contaminants induiraient une démasculinisation/féminisation des gonades de grenouilles mâles et une féminisation du sex-ratio (Hayes *et al.*, 2002, 2011; Orton et Tyler, 2015).

1.3.3.3 Des désordres métaboliques ?

En 2008, la société savante internationale d'endocrinologie, *The Endocrine Society*, a réuni un groupe d'experts pour réaliser un état de l'art des effets hormonaux liés aux perturbateurs endocriniens environnementaux sur l'Homme et définir de nouvelles pistes de recherche dans le domaine (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Ce travail a été mis à jour et complété en 2015 intégrant les nouveaux enjeux de la recherche sur les perturbateurs endocriniens environnementaux (Gore *et al.*, 2015). Outre les perturbations des systèmes endocriniens thyroïdien et reproducteur, cette nouvelle édition met un accent particulier sur les désordres métaboliques. En effet, une préoccupation récente suggère que certains perturbateurs endocriniens auraient une action obésogène ou diabétogène (Gore *et al.*, 2015). Cette préoccupation est étayée par les récentes études *in vitro* et *in vivo* chez l'animal qui montrent un dérèglement de l'homéostasie du glucose et des lipides, mais également par des récentes études épidémiologiques associant une augmentation de la prévalence de l'obésité, du diabète et des maladies cardio-vasculaires en lien avec les perturbateurs endocriniens (Chevalier, 2014; Chevalier et Fénichel, 2015; Gore *et al.*, 2015; Legler *et al.*, 2015).

En ce qui concerne les grenouilles, bien que partageant malgré tout de nombreuses similitudes hormonales avec les vertébrés supérieurs, ce phénomène n'a pour le moment pas reçu l'attention de la communauté scientifique. Notre travail de thèse est par cet aspect tout à fait novateur.

1.4 Les modèles biologique et chimiques de l'étude

La plupart des études sur les contaminants chimiques se sont focalisées sur la toxicité directe ou sur les effets développementaux conduisant à une mauvaise survie ou la mort des amphibiens. Cependant, une partie de ces contaminants, les perturbateurs endocriniens, peuvent aussi provoquer des défaillances des systèmes développementaux et reproductifs à des doses sub-létales (Kloas *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2010). Il est décrit que ces perturbations participent alors au déclin des populations d'amphibiens par un effondrement du recrutement (qui caractérise, sur un pas de temps défini, le repeuplement d'une population par les juvéniles). En revanche, si les perturbateurs endocriniens sont majoritairement étudiés pour leur capacité à perturber la fonction sexuelle, aucune étude ne s'est intéressée à leurs effets sur la fonction métabolique chez l'amphibien. Il s'agit néanmoins d'un système physiologique central et par ailleurs lié à la reproduction via la synthèse des précurseurs des hormones stéroïdiennes ou plus généralement via l'allocation d'énergie à la fonction reproductive. En conséquence, l'action des perturbateurs endocriniens dans le déclin des populations d'amphibien et le rôle des fonctions sexuelles et métaboliques dans la perturbation de leur reproduction restent méconnus.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'actions des perturbateurs endocriniens sur les amphibiens nous avons choisi la grenouille modèle de laboratoire *Xenopus tropicalis* et nous avons sélectionné deux molécules contaminantes d'origine urbaine et couramment retrouvées dans les milieux aquatiques : le benzo[*a*]pyrène et le triclosan.

1.4.1 Le xénope, grenouille modèle de laboratoire

Xenopus tropicalis est une espèce d'amphibien de la famille des *Pipidae* endémique du centre ouest africain, du Sénégal au Cameroun (Figure 1.1 ; IUCN, 2015). Le nom de genre *Xenopus* provient du grec et signifie littéralement « pied inhabituel » (ξενος, *xenos*, étrange et πους, *pous*, pied). Ces grenouilles sont en effet caractérisées par des pattes postérieures très musculeuses avec une large palmure et des griffes cornées à l'extrémité des trois doigts internes (Figure 1.16). Cette dernière disposition anatomique leur vaut l'appellation vernaculaire de « grenouilles griffues ». Excellents nageurs, les xénopes sont fortement inféodés au milieu aquatique et ne remontent à la surface que pour respirer (AmphibiaWeb, 2015). Ce mode de vie aquatique favorise donc largement leur élevage en laboratoire puisque contrairement à la plupart

des autres espèces d'amphibiens qui nécessitent l'aménagement d'aquaterrarium, les xénopes se satisfont d'un aquarium (Delarue et Arnoult, 2004).

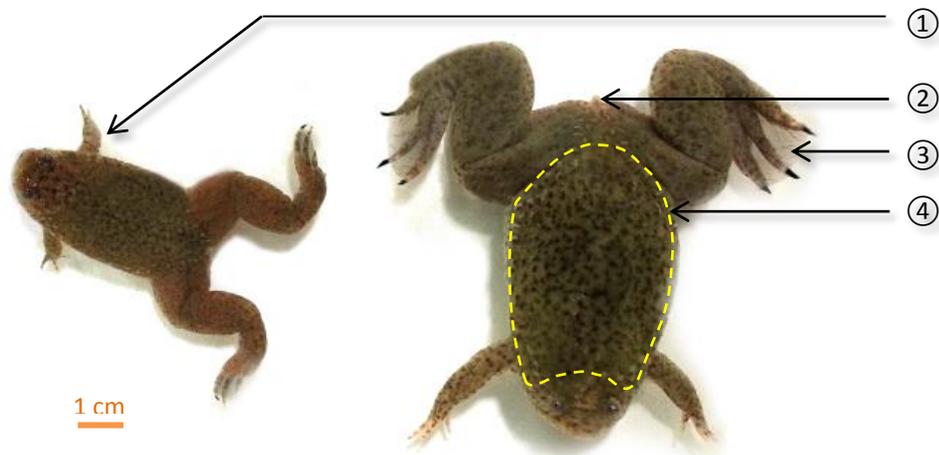


Figure 1.16 : *Xenopus tropicalis* mâle et femelle (de gauche à droite). ①, emplacement callosité nuptiale (non visible) ; ②, papilles cloacales turgescentes ; ③, membre inférieur palmé et griffu ; ④, ligne latérale ; en jaune, délimitation des sacs lymphatiques dorsaux (photographie C. Regnault).

Les xénopes ont été largement utilisés comme test de grossesse (test de Hogben) dès la fin des années trente (Hogben, 1930; Bergerard et Lamotte, 1949). Ce test consistait en l'injection d'urine de femme dans les ovaires de xénopes femelles. Ces dernières sont sensibles à l'hormone chorionique gonadotrope humaine (hCG) produite au cours de la grossesse de la femme (Hogben, 1930). Ainsi, une ponte de xénope survenait 24h après l'injection si la femme testée était enceinte. Cette technique avait entre autre l'avantage de ne pas sacrifier l'animal et pouvait être conduite à nouveau sur le même animal après quelques mois de repos.

L'utilisation de l'hCG a été - et est encore - largement pratiquée dans les laboratoires pour produire des œufs de xénope en masse (Reed, 2005; Zimmerman, 2010). Chaque femelle *Xenopus* pond des milliers d'œufs en une seule fois (1 000 à 6 000 pour *Xenopus tropicalis*). Très peu d'espèces de grenouilles peuvent être amenées à produire autant d'œufs aussi régulièrement et aussi facilement (Reed, 2005; Zimmerman, 2010) permettant d'obtenir aisément des cellules pour des études en biochimie, biologie moléculaire et cellulaire. En outre, la fertilisation d'une ponte produit un très grand nombre d'embryons synchronisés, faisant du *Xenopus* un modèle largement utilisé pour la biologie du développement (Wallingford *et al.*, 2010). Enfin, la facilité de

manipulation des embryons et la transparence des têtards sont autant de raisons expliquant la popularité du genre *Xenopus* auprès des biologistes du développement et cellulaires (Hellsten *et al.*, 2010).

Cette popularité n'est pas récente puisque dès les années quarante, l'étude embryologique des amphibiens a permis la création de diverses tables de classification des étapes de leur développement, de la cellule œuf à la métamorphose. Sur les plus de 45 tables décrites à ce jour, les deux plus citées dans la littérature sont celles de Nieuwkoop et Faber (1956) sur *Xenopus laevis* et celle de Gosner (1960) sur les anoures en général (Nieuwkoop et Faber, 1956; Gosner, 1960; McDiarmid et Altig, 1999). Encore de nos jours le xénope est considéré comme l'espèce modèle d'anoure par excellence. Dans une étude récente, Wheeler et Brändli (2009) ont comparé les avantages et inconvénients de six principaux organismes modèles utilisés en biologie permettant la compréhension des mécanismes moléculaires fondamentaux du vivant : le nématode (*Caenorhabditis elegans*), la drosophile (*Drosophila spp.*), le poisson-zèbre (*Danio rerio*), le xénope (*Xenopus spp.*), la poule (*Gallus gallus*) et la souris (*Mus musculus*). Cette étude démontre que les xénopes représentent un excellent modèle de prédiction de la biologie humaine pour combler le fossé entre les essais *in vitro* et les essais précliniques sur mammifères dans la recherche biomédicale. Ceci s'explique par la facilité de leur manipulation, le coût des embryons, leur génome connu, la possibilité de faire des études génétiques et le fait qu'ils partagent une longue histoire évolutive avec les mammifères (Wheeler et Brändli, 2009).

Deux espèces sont principalement utilisées comme modèles d'amphibiens en biologie : *Xenopus laevis* et *Xenopus tropicalis*, car phylogénétiquement très proches et partageant les mêmes avantages embryologiques qu'évoqués précédemment (Sá et Hillis, 1990). À taille adulte le *Xenopus tropicalis* est plus petit que *Xenopus laevis* et ses œufs sont également plus petits mais plus nombreux par ponte. En outre, la durée d'une génération est plus courte chez *Xenopus tropicalis* ce qui facilite son maintien en laboratoire (Tableau 1.3). Les différences majeures entre ces deux espèces se situent aux échelles chromosomique et génomique. Si le *Xenopus tropicalis* est diploïde, ce n'est en revanche pas le cas de *Xenopus laevis* qui est allo-tétraploïde (Tymowska et Fischberg, 1973; Graf et Fischberg, 1986; Evans *et al.*, 2004; Hellsten *et al.*, 2010). Cela signifie que *Xenopus laevis* résulte de l'hybridation de deux espèces ancestrales diploïdes. Ce phénomène évolutif se traduit par un génome plus important (18 paires de chromosomes et 3,1 milliards de paires de bases contre 10 paires de chromosomes pour 1,6 milliards de paires de bases pour *Xenopus tropicalis*) ainsi que par la présence de nombreux gènes paralogues et de duplications

d'allèles compliquant d'autant plus les analyses du génome et des transcrits (Pollet, 2005; Hellsten *et al.*, 2010). C'est pourquoi, dès les années quatre-vingt, les études génomiques sur *Xenopus laevis* ont été abandonnées au profit de *Xenopus tropicalis* (Pollet, 2005).

Tableau 1.3 : Tableau de comparaison *Xenopus tropicalis* et *Xenopus laevis*

	<i>Xenopus tropicalis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
Taille des œufs ^{1,2}	0,7 – 0,8 mm	1,0 – 1,3 mm
Nombre d'œufs par ponte ^{1,2}	1 000 – 6 000	300 – 1 000
Durée d'une génération ³	6 – 12 mois	12 – 24 mois
Taille de l'adulte ³	4 – 5 cm	10 – 12 cm
Ploidie ⁴	diploïde	allo-tétraploïde
Nombre de chromosomes ⁴	10 paires	18 paires
Taille du génome (paire de bases) ⁴	1,6×10 ⁹ paires de bases	3,1×10 ⁹ paires de bases

Source : ¹ Reed (2005), ² Zimmerman (2010) ; ³ Delarue et Arnoult (2004) ; ⁴ Hellsten *et al.* (2010)

C'est en 2010 que le séquençage et l'assemblage du génome de *Xenopus tropicalis* ont été publiés par Hellsten *et al.* Son génome est représenté par plus de 20 000 gènes codant pour des protéines, y compris des orthologues d'au moins 79 % des gènes associés à des maladies humaines. Le séquençage et l'assemblage du génome de *Xenopus tropicalis* permettent non seulement une meilleure compréhension de l'évolution du génome et du protéome des vertébrés mais ils autorisent également des études approfondies des transcrits et l'identification des mécanismes fonctionnels survenant chez les xénopes selon diverses conditions environnementales ou expérimentales.

1.4.2 Le benzo[a]pyrène

Le benzo[a]pyrène (BaP) est un membre de la famille des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP). Au sens strict les HAP sont des molécules organiques constituées seulement d'atomes de carbone et d'hydrogène (hydrocarbure) et composées de multiples cycles (polycyclique) benzéniques (ou aromatiques) : généralement deux à sept anneaux organiques dans lesquels les électrons sont délocalisés (Haritash et Kaushik, 2009). Le caractère ubiquiste de ces composés réside dans le fait qu'il existe de nombreuses sources d'émissions de HAP dans l'environnement. Elles peuvent être classées selon deux modes principaux : les sources diagénétiques et les sources pyrolytiques (Soclo *et al.*, 2000). La diagenèse désigne le long

processus bio-physico-chimique par lequel les sédiments sont transformés en roches sédimentaires et des HAP sont produits lors de la lente maturation de la matière organique à basse température et à haute pression (Blumer, 1976). Cependant la principale origine des HAP est de source pyrolytique. Des HAP sont en effet produits lors de la combustion incomplète de combustibles fossiles ou de matière organique comme les matières végétales.

Parmi les HAP, le benzo[*a*]pyrène a retenu beaucoup l'attention car il a été identifié comme étant hautement cancérigène pour l'Homme (Wang *et al.*, 2002). Il est d'ailleurs souvent utilisé comme un marqueur d'exposition totale aux HAP dans l'industrie et dans l'environnement (Lin *et al.*, 2002).

1.4.2.1 Origine et devenir du benzo[*a*]pyrène dans l'environnement

Le benzo[*a*]pyrène est produit naturellement dans le pétrole brut, les huiles de schiste et les goudrons de houille, et est émis avec les gaz et les cendres des volcans actifs ou lors de feux de prairie ou de forêt (Villar *et al.*, 2006). Néanmoins, comme pour les autres HAP, il est communément admis que les principales sources de benzo[*a*]pyrène sont anthropiques. Le benzo[*a*]pyrène n'ayant aucune utilité industrielle en soi, il n'existe pas de filière de production (outre l'utilisation de la molécule en laboratoire par exemple). Il est donc essentiellement et involontairement produit lors de la combustion incomplète de la matière organique et est lié à l'urbanisation : chauffage résidentiel (fioul, charbon, bois, gaz), combustion des carburants automobiles (gaz d'échappement des moteurs, aussi bien essence que diesel), production industrielle, incinération, ... (Srogi, 2007; CIRC, 2012). De manière anecdotique pour l'environnement, il a aussi été identifié dans les fumées de cigarettes, les viandes grillées au barbecue et le café torréfié (Srogi, 2007; CIRC, 2012).

Ainsi, le premier compartiment environnemental contaminé par le benzo[*a*]pyrène est l'atmosphère. Selon le modèle de séparation gaz / particules des composés organiques semi-volatils, le benzo[*a*]pyrène, qui a une pression de vapeur de $7,3 \times 10^{-7}$ Pa à 25 °C (Tableau 1.4), est majoritairement lié à la phase particulaire dans l'atmosphère (Murray *et al.*, 1974; Bidleman, 1988). Le benzo[*a*]pyrène peut être transporté loin de son lieu d'émission via le mouvement des masses d'air. Par des dépôts secs ou un lessivage atmosphérique par les précipitations, le benzo[*a*]pyrène peut ensuite contaminer d'autres compartiments environnementaux comme les sols ou les eaux de surface (Srogi, 2007).

Tableau 1.4 : Caractéristiques physico-chimiques du benzo[*a*]pyrène

Caractéristiques physico-chimiques	
Nom IUCPA	Benzo[<i>a</i>]pyrène
Numéro CAS	50-32-8
Formule brute	C ₂₀ H ₁₂
Formule topologique	
Masse molaire (en g.mol ⁻¹) ¹	252,31
Solubilité dans l'eau à 25 °C (en mg.L ⁻¹) ¹	3×10 ⁻³
Coefficient de partage octanol/eau (Log <i>K</i> _{ow}) ²	6,06
Coefficient de partage carbone organique/eau est élevé (<i>K</i> _{oc}) ²	5,07×10 ⁶
Pression de vapeur à 25 °C (en Pa) ²	7,3×10 ⁻⁷
Constante de Henry à 25 °C (en Pa.m ³ .mol ⁻¹) ²	4,0×10 ⁻²

Sources : ¹ CIRC (2012) ; ² INERIS (2006). La constante de Henry correspond au rapport entre la pression de vapeur (en Pa) et la solubilité dans l'eau (en mol.m⁻³).

Une fois dans les sols, le benzo[*a*]pyrène est faiblement sujet à la mobilité puisque il a une importante propension à la rétention sur la matière organique comme le suggère son coefficient d'adsorption élevé ($K_{oc} = 5,07 \times 10^6$) (INERIS, 2006). Sa faible pression de vapeur indique qu'il est en outre peu volatilisable depuis les surfaces de sol sec ou de sol humide compte tenu de sa faible valeur de constante de Henry ($4,0 \times 10^{-2} \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ à 25 °C) (Hulscher *et al.*, 1992).

La contamination des eaux de surface par le benzo[*a*]pyrène survient principalement par les dépôts atmosphériques mais aussi par les eaux de ruissellements urbains, les effluents municipaux, les effluents industriels ou encore des déversements de pétrole ou des fuites (Srogi, 2007). Les eaux de ruissellement urbaines sont chargées de HAP déposés sur les sols par les dépôts atmosphériques mais aussi par les rejets du trafic automobile (essence, produits d'échappement, particules de pneus, bitume des revêtements routiers). En outre, des concentrations plus élevées de HAP dans les eaux de ruissellements urbains ont été mesurées en automne et en hiver, en raison de l'incidence élevée des véhicules dans les rues, couplée à l'utilisation des systèmes de chauffage (Manoli et Samara, 1999). Dans les milieux aquatiques, le benzo[*a*]pyrène à la fois hydrophobe ($\log K_{ow} = 6,06$) et très faiblement soluble dans l'eau ($3 \times 10^{-3} \text{ mg.L}^{-1}$ à 25 °C), est fortement adsorbé sur les matières organiques et les sédiments.

De plus, il est peu, voire pas volatilisable (Tableau 1.4, constante de Henry ; Luo *et al.*, 2004). Ainsi, les sédiments et la matière organique peuvent agir comme un compartiment transitoire de stockage de benzo[*a*]pyrène. Dans des conditions hydrodynamiques spécifiques ou en présence de bioturbation, ce composé peut être remis en suspension ou dissous à nouveau et ainsi devenir biodisponible (Katayama *et al.*, 2010). L'évaluation de la concentration en benzo[*a*]pyrène dans les eaux de surface est donc une épineuse problématique quant à la variabilité géographique et temporelle des concentrations de benzo[*a*]pyrène dissous (Patrolecco *et al.*, 2010).

Tableau 1.5 : Concentrations en benzo[*a*]pyrène mesurées dans les eaux douces naturelles

Site étudiée	Type d'échantillon	Fréquence de détection	Concentrations mesurées (ng.L ⁻¹)			Référence
			Moyenne	Médiane	Maximale	
Seine, France	Eau de surface	13 %	–	–	270	(Gasperi <i>et al.</i> , 2009)
Macédoine, Grèce	Eau de surface	–	–	–	1,7	(Manoli <i>et al.</i> , 2000)
Elbe, Allemagne	Eau de surface	–	–	6,3	16	(Götz <i>et al.</i> , 1998)
Hangzhou, Chine	Eau de surface	100 %	1 582	1 222	3 575	(Zhu <i>et al.</i> , 2004)
Delta du Nil, Égypte	Eau de surface	–	–	–	460	(Badawy <i>et al.</i> , 1995)
Tibre, Italie	Eau de surface	–	9	–	25,4	(Patrolecco <i>et al.</i> , 2010)
Chine	Eau de surface	–	57,0	1,9	1 871,7	(Wu <i>et al.</i> , 2011)
Baie de Daya, Chine	Eau de surface	–	633	–	4 799	(Zhou et Maskaoui, 2003)
Rivière des Perles, Chine	Eau de surface	–	–	–	0,02	(Luo <i>et al.</i> , 2004)
Lac Nansi, Chine	Eau de surface	–	–	–	0,09	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
Alsace, France	Eau de pluie	–	81,99	–	205,9	(Delhomme <i>et al.</i> , 2008)
Macédoine, Grèce	Eau de pluie	–	–	–	6,0	(Manoli <i>et al.</i> , 2000)
Dübendorf, Suisse	Neige/glace	–	–	–	3,7	(Leuenberger <i>et al.</i> , 1988)

La plupart des études se sont focalisées sur les concentrations environnementales de benzo[*a*]pyrène adsorbé dans les sédiments ou sur le dosage en HAP totaux dans les eaux de surface (Yunker *et al.*, 2002; Tobiszewski et Namieśnik, 2012). Ainsi, les concentrations environnementales en benzo[*a*]pyrène dans les eaux de surface sont extrêmement variables, allant au-delà du microgramme par litre dans des eaux chinoises fortement exposées par une importante urbanisation (Tableau 1.5 ; Zhou et Maskaoui, 2003; Zhu *et al.*, 2004; Wu *et al.*, 2011). En Europe, le benzo[*a*]pyrène a été retrouvé, parfois à de fortes concentrations, dans

les eaux de pluie ou dans la neige (Leuenberger *et al.*, 1988; Delhomme *et al.*, 2008). Ceci illustre parfaitement les transferts de ce polluant d'un compartiment à un autre de l'écosystème.

1.4.2.2 Écotoxicité du benzo[*a*]pyrène sur les amphibiens

Le caractère lipophile du benzo[*a*]pyrène ($\log K_{ow} = 6,06$) implique une forte bioaccumulation dans les organismes vivants à partir de l'ingestion d'eau, de sédiments ou de nourriture (Srogi, 2007). Cette bioaccumulation a été mesurée chez plusieurs espèces d'anoures (*Pelophylax ridibundus*, *Pelophylax k.l. esculentus*) ou d'urodèles (*Notophthalmus viridescens*) (Vojinovic-Miloradov *et al.*, 1996; Bommarito *et al.*, 2010b; Reynaud *et al.*, 2012). Néanmoins, si les effets génotoxiques, reprotoxiques et immunotoxiques du benzo[*a*]pyrène sont relativement bien documentés chez d'autres vertébrés aquatiques comme les poissons (Potter *et al.*, 1994; Reynaud et Deschaux, 2006; Dong *et al.*, 2008; Obiakor *et al.*, 2014), relativement peu d'études se sont intéressées aux effets de ce contaminant sur les amphibiens. Plus précisément, de même que pour les dosages dans les eaux de surfaces, de nombreuses publications se sont intéressées aux HAP totaux sans en caractériser la composante benzo[*a*]pyrène (Békaert *et al.*, 1999; Matson *et al.*, 2005; Bryer *et al.*, 2006; Mantecca *et al.*, 2007; Bommarito *et al.*, 2010a; Dorchin et Shanas, 2010; Zhang *et al.*, 2014). Les quelques recherches basées sur des effets strictement imputés au benzo[*a*]pyrène sont présentées dans le Tableau 1.6.

La majorité de ces travaux se sont concentrés sur les anoures et plus particulièrement sur l'espèce modèle *Xenopus laevis* (Kennerley et Parry, 1994; Sadinski *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 1996; Colombo *et al.*, 2003; Saka, 2004; Mouchet *et al.*, 2005, 2006; Martini *et al.*, 2012). Les quelques études portant sur les urodèles sont elles aussi basées sur une espèce modèle le pleurodèle de Waltl, *Pleurodeles waltl* (Fernandez et L'Haridon, 1992; Fernandez et L'Haridon, 1994; Djomo *et al.*, 1995; Marty *et al.*, 1998). En outre, les travaux s'intéressant au stade adulte sont peu nombreux (Colombo *et al.*, 2003; Rankouhi *et al.*, 2005; Reynaud *et al.*, 2012) au profit des stades larvaires. Enfin, l'ensemble des publications illustrent des expositions au benzo[*a*]pyrène de type aigu, c'est-à-dire des expositions de courtes durées (un à douze jours) à des concentrations pouvant être excessivement élevées (jusqu'à 10 mg.L⁻¹) par rapport à celles observées dans l'environnement (Djomo *et al.*, 1995; Morse *et al.*, 1996; Mouchet *et al.*, 2005, 2006).

Les effets particulièrement bien décrits chez les poissons comme la génotoxicité, ont été principalement étudiés chez les amphibiens. La génotoxicité du benzo[*a*]pyrène provient de sa biotransformation en métabolites électrophiles capables de se lier aux sites nucléophiles de l'ADN (aussi connu sous la dénomination « adduits à l'ADN ») et sur sa capacité à générer des espèces réactives de l'oxygène responsables de dommages oxydatifs de l'ADN (Baan *et al.*, 2009). De façon similaire, le benzo[*a*]pyrène est générateur d'adduits à l'ADN chez les larves d'amphibiens. Cette génotoxicité survient pour des expositions plus importantes chez les têtards *Xenopus laevis* (50 µg.L⁻¹) que chez les larves de *Pleurodeles waltl* (4 µg.L⁻¹) (Morse *et al.*, 1996; Marty *et al.*, 1998). Le test des micronoyaux (Iarmarcovai *et al.*, 2007) a largement été utilisé pour évaluer l'intensité des dommages chromosomiques engendrés par le benzo[*a*]pyrène chez les amphibiens. Ce type de dommages a été observé à de nombreuses reprises chez les têtards d'anoures et les larves d'urodèles exposés à des concentrations en benzo[*a*]pyrène inférieures à la dizaine de microgramme par litre (Fernandez et l'Haridon, 1994; Djomo *et al.*, 1995; Sadinski *et al.*, 1995; Mouchet *et al.*, 2005, 2006; Marquis *et al.*, 2009).

Outre sa génotoxicité, le benzo[*a*]pyrène semble affecter le développement des larves de *Xenopus laevis* en retardant la croissance des embryons, à très forte concentration (333 µg.L⁻¹), ainsi qu'en allongeant leur phase larvaire, à des doses beaucoup plus faibles (Sadinski *et al.*, 1995; Saka, 2004). Curieusement les conséquences de ce type de perturbation après métamorphose ne semblent pas avoir été étudiées.

Ainsi, les connaissances concernant les effets du benzo[*a*]pyrène sur l'amphibien adulte de même que les effets d'une exposition long terme à ce contaminant sur les différents stades de vie de l'amphibien demeurent manquantes.

Tableau 1.6 : Effets écotoxicologiques du benzo[*a*]pyrène sur les amphibiens

Espèce étudiée	Ordre	Stade	Concentration d'exposition	Durée d'exposition	Effets observés	Concentration effective	Référence
<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	<i>Anura</i>	adulte	0,025 – 252 µg.L ⁻¹	2 jours	• ↑ activité EROD	• à 252 µg.L ⁻¹	(Rankouhi <i>et al.</i> , 2005)
<i>Pelophylax kl. esculentus</i>	<i>Anura</i>	adulte ♀	10 µg.L ⁻¹	8 jours	• ↑ activité ECOD et GST	—	(Reynaud <i>et al.</i> , 2012)
<i>Rana temporaria</i>	<i>Anura</i>	têtard	50 ; 250 ; 500 µg.L ⁻¹	6 jours	Génotoxicité : • ↑ micronoyaux érythrocytaires	• dès 50 µg.L ⁻¹	(Marquis <i>et al.</i> , 2009)
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Anura</i>	embryon	0,003 – 3 330 µg.L ⁻¹	4 jours	• ↓ croissance	• entre 333 et 3 330 µg.L ⁻¹	(Saka, 2004)
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Anura</i>	têtard	125 ; 1 000 ; 10 000 µg.L ⁻¹	12 jours	• ↑ mortalité Génotoxicité : • ↑ micronoyaux érythrocytaires	• dès 125 µg.L ⁻¹	(Mouchet <i>et al.</i> , 2005)
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Anura</i>	têtard	7,8 ; 15,6 ; 31,3 ; 62,5 ; 125 µg.L ⁻¹	16 jours	• ↑ durée avant métamorphose Génotoxicité : • ↑ micronoyaux érythrocytaires • ↑ adduits à l'ADN	• dès 7,8 µg.L ⁻¹ • à 62,5 µg.L ⁻¹	(Sadinski <i>et al.</i> , 1995)
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Anura</i>	têtard	10 ; 20 ; 50 ; 100 ; 200 ; 500 µg.L ⁻¹	2 jours	Génotoxicité : • ↑ mutations α-globine	• entre 10 et 50 µg.L ⁻¹	(Kennerley et Parry, 1994)
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Anura</i>	têtard	8,36 ; 14,64 ; 89,06 ; 309,47 µg.L ⁻¹	9 jours	Immunotoxicité : • ↑ transcription HSP70 et IL-1β	• dès 8,36 µg.L ⁻¹	(Martini <i>et al.</i> , 2012)
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Anura</i>	têtard	10 ; 50 ; 100 µg.L ⁻¹	1 jour	Génotoxicité : • ↑ adduits à l'ADN	• dès 50 µg.L ⁻¹	(Morse <i>et al.</i> , 1996)
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Anura</i>	têtard	125 µg.L ⁻¹	12 jours	Génotoxicité : • ↑ micronoyaux érythrocytaires	—	(Mouchet <i>et al.</i> , 2006)
<i>Xenopus laevis</i>	<i>Anura</i>	adulte ♀	100 mg.kg ⁻¹	7 jours	• ↑ transcription CYP1A	—	(Colombo <i>et al.</i> , 2003)
<i>Pleurodeles waltl</i>	<i>Urodela</i>	embryon	50 µg.L ⁻¹	5 jours	• ↑ mortalité	—	(Fernandez et L'Haridon, 1992)
<i>Pleurodeles waltl</i>	<i>Urodela</i>	larve	4 ; 40 ; 200 µg.L ⁻¹	12 jours	Génotoxicité : • ↑ micronoyaux érythrocytaires	• dès 4 µg.L ⁻¹	(Djomo <i>et al.</i> , 1995)
<i>Pleurodeles waltl</i>	<i>Urodela</i>	larve	12,5 ; 25 ; 50 ; 500 µg.L ⁻¹	8 jours	Génotoxicité : • ↑ micronoyaux érythrocytaires	• dès 25 µg.L ⁻¹	(Fernandez et L'Haridon, 1994)
<i>Pleurodeles waltl</i>	<i>Urodela</i>	larve	4 ; 40 ; 200 µg.L ⁻¹	12 jours	• ↑ activité EROD Génotoxicité : • ↑ adduits à l'ADN	• dès 40 µg.L ⁻¹ • dès 4 µg.L ⁻¹	(Marty <i>et al.</i> , 1998)

EROD, activité enzymatique éthoxyrésorufine-O-dééthylase ; ECOD, activité enzymatique éthoxycoumarine-O-dééthylase ; GST, activité enzymatique glutathione-S-transférase ; HSP70, 70 kilodalton heat shock protein ; IL-1β, Interleukin-1 beta ; CYP1A, cytochrome P450 1A.

1.4.3 Le triclosan

Le triclosan (TCS) aussi appelé 5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy) phénol (dénomination selon l'IUCPA, l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée) est un agent antimicrobien (bactéricide et fongicide) organochloré de synthèse à large spectre.

Le mode d'action antimicrobien de ce composé est double. D'une part il inhibe l'*énoyl-[acyl-carrier-protein] réductase* à NADH impliquée dans la biosynthèse des acides gras (Stewart *et al.*, 1999) et d'autre part le triclosan s'intercale dans les membranes des cellules bactériennes compromettant leur intégrité fonctionnelle (Guillén *et al.*, 2004).

Aux États-Unis, le triclosan a été initialement utilisé dans les années 1960 dans la composition des savons. Il a ensuite été introduit dans l'industrie des soins de santé pour le lavage des outils chirurgicaux en 1972 puis pour les soins bucco-dentaires dans les dentifrices en Europe à partir de 1985 (Jones *et al.*, 2000). Il est rapporté qu'entre les années 1992 et 1999, la majorité des quelques sept-cent produits de consommation à propriétés antibactériennes contenaient du triclosan (Schweizer, 2001). Aujourd'hui encore, ce composé est trouvé dans une grande variété de produits de consommation à travers le monde tels que les savons, les déodorants, les crèmes pour la peau, les cosmétiques, les dentifrices, les jouets, les tissus, les matières plastiques et autres matériaux en contact avec des aliments (DeLorenzo *et al.*, 2008). D'après l'Agence européenne des produits chimiques, la production et l'importation européenne de triclosan étaient comprises entre 1 000 et 10 000 tonnes en 2011 (INERIS, 2015). Néanmoins, le durcissement récent des normes et des réglementations ainsi que la sensibilisation des consommateurs vis-à-vis des effets néfastes du triclosan seraient responsables d'une tendance à la baisse de la consommation de ce composé. Les émissions françaises et européennes de triclosan vers l'environnement sont en revanche très peu renseignées. Comme il n'existe aucune source naturelle connue de triclosan, sa présence dans l'environnement est donc en totalité due aux activités anthropiques (INERIS, 2015).

1.4.3.1 Origine et devenir du triclosan dans l'environnement

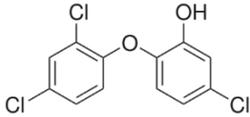
L'origine du triclosan dans l'environnement est intimement liée à son utilisation. Elle est à la fois issue des industriels utilisant ce composé dans la fabrication de divers produits mais

également des consommateurs utilisant ces produits (INERIS, 2015). Les produits contenant du triclosan sont généralement évacués avec les eaux usées et transportés via le réseau d'égouts vers des installations de traitement des eaux usées (McAvoy *et al.*, 2002). Le triclosan est en effet régulièrement détecté dans les eaux usées à des concentrations comprises entre 0,001 et 22 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Kinney *et al.*, 2008; Durán-Álvarez *et al.*, 2012; Roccaro et Vagliasindi, 2014). Les stations d'épuration éliminent ensuite jusqu'à 90 % du triclosan des eaux usées suivant le type d'installation (McAvoy *et al.*, 2002; Singer *et al.*, 2002; Bester, 2005).

La source la plus probable de rejets de triclosan vers les sols est l'épandage des boues issues des stations d'épuration. En effet, en raison de sa nature hydrophobe (Tableau 1.7, $\log K_{ow} = 4,7$) une partie de l'élimination du triclosan lors du traitement des eaux usées pourrait être due à sa sorption sur les sédiments résiduels à l'origine des boues d'épuration (McAvoy *et al.*, 2002; Bester, 2005). Ces dernières peuvent alors éventuellement être utilisées comme amendement pour les sols agricoles (Verlicchi et Zambello, 2015). En France, dans le cadre du projet « Analyse de micropolluants prioritaires et émergents dans les rejets et les eaux superficielles » (AMPERES), le triclosan a été quantifié dans près de 30 % des boues étudiées et à des concentrations comprises entre 10 et 100 mg.kg^{-1} (Coquery *et al.*, 2011). Avec un fort potentiel d'adsorption aux carbones organiques ($K_{oc} = 3,5 \times 10^3$ à $1,6 \times 10^4$) le triclosan est faiblement sujet à la mobilité dans les sols (Barron *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009). Il n'est pas non plus sujet à la volatilisation à partir des surfaces de sols secs compte tenu de sa faible pression de vapeur estimée à $6,2 \times 10^{-4}$ Pa à 25 °C ou des surfaces de sols humides compte tenu de sa constante de Henry estimée à $2,0 \times 10^{-3}$ $\text{Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$ à 25 °C (Bock *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011). Néanmoins, le triclosan est vulnérable à la photodégradation avec une demi-vie dans les sols estimée à 17 jours (Ozaki *et al.*, 2011).

Compte tenu de son utilisation et de ses propriétés physico-chimiques, les rejets atmosphériques de triclosan sont considérés comme inexistant. En outre, il est estimé que dans l'atmosphère le triclosan est photodégradé en chlorophénols, chlorohydroxydiphényl éthers, 2,7- et 2,8-dichlorodibenzo-*p*-dioxin avec une demi-vie inférieure à 16 heures (INERIS, 2015).

Tableau 1.7 : Caractéristiques physico-chimiques du triclosan

Caractéristiques physico-chimiques	
Nom IUCPA	5-chloro-2-(2,4-dichlorophénoxy)phénol
Numéro CAS	3380-34-5
Formule brute	C ₁₂ H ₇ Cl ₃ O ₂
Formule topologique	
Masse molaire (en g.mol ⁻¹) ¹	289,542
Solubilité dans l'eau à 25 °C (en mg.L ⁻¹) ²	4,6
Coefficient de partage octanol/eau (Log K _{ow}) ²	4,7
Coefficient de partage carbone organique/eau est élevé (K _{oc}) ³	3,5×10 ³ à 1,6×10 ⁴
Pression de vapeur à 25 °C (en Pa) ¹	6,2×10 ⁻⁴
Constante de Henry à 25 °C (en Pa.m ³ .mol ⁻¹) ⁴	2,0×10 ⁻³

Sources : ¹ McAvoy *et al.* (2002) ; ² Ying *et al.* (2007) ; ³ INERIS (2015) ; ⁴ Bock *et al.* (2010)

Avec une limite de solubilité dans l'eau de 4,6 mg.L⁻¹ à 25 °C le triclosan est considéré comme peu soluble dans l'eau (Ying *et al.*, 2007). Malgré cela, 5 à 10 % du triclosan reste dissous lors du traitement des eaux usées et est rejeté dans les eaux de surface (Bester, 2005). Dans le milieu aquatique, le triclosan est également peu mobile. La forte valeur du coefficient K_{oc} suggère une forte adsorption du triclosan sur la matière organique et les sédiments dans l'eau. En outre, sa volatilisation depuis la surface de l'eau est très faible compte tenu de sa faible constante de Henry. Néanmoins, dans les eaux de surface, le triclosan est sujet à la photodégradation qui peut représenter jusqu'à 80 % de son élimination totale en période estivale pour une demi-vie inférieure à 100 jours (Tixier *et al.*, 2002). Le principal produit de cette photolyse serait le 2,8-dichlorodibenzo-*p*-dioxin (Aranami et Readman, 2007). En outre le triclosan est sujet à la biodégradation qui a été estimée de 18 à 70 % de dégradation pour des durées de 21 à 91 jours respectivement (NICNAS, 2009).

Les concentrations en triclosan dans les effluents de stations d'épuration sont relativement variables suivant les points de mesures (Tableau 1.8). Les valeurs atteignent généralement plusieurs centaines de nanogrammes de triclosan par litre bien qu'elles puissent dépasser le microgramme par litre dans certains effluents d'Amérique du nord ou d'Europe (Kolpin *et al.*, 2002; Agüera *et al.*, 2003; Loraine et Pettigrove, 2006).

Tableau 1.8 : Concentrations en triclosan mesurées dans les effluents de stations d'épuration.

Site étudié	Type d'échantillon	Fréquence de détection	Concentrations mesurées (ng.L ⁻¹)			Référence
			Moyenne	Médiane	Maximale	
États-Unis	Effluent	58 %	–	140	2 300	(Kolpin <i>et al.</i> , 2002)
Arkansas, États-Unis	Effluent	24 %	–	–	250	(Haggard <i>et al.</i> , 2006)
Lac de Greifen, Suisse	Effluent	–	–	–	213	(Singer <i>et al.</i> , 2002)
Lac de Greifen, Suisse	Effluent	100 %	214	136	650	(Lindström <i>et al.</i> , 2002)
Almeria, Espagne	Effluent	–	1 342	1 380	2 210	(Agüera <i>et al.</i> , 2003)
Détroit, Canada	Effluent	–	–	–	63	(Hua <i>et al.</i> , 2005)
La Ruhr, Allemagne	Effluent	100 %	–	–	600	(Bester, 2005)
Australie	Effluent	100 %	142	108	434	(Ying et Kookana, 2007)
Californie, États-Unis	Effluent	50 %	710	–	2 110	(Loraine et Pettigrove, 2006)
Tennessee, États-Unis	Effluent	–	193	–	–	(Yu et Chu, 2009)
Australie	Effluent	100 %	142	108	434	(Ying et Kookana, 2007)

Les concentrations environnementales en triclosan dans les eaux de surfaces semblent relativement moins variables que dans les effluents (Tableau 1.9). Les concentrations s'échelonnent entre la dizaine et la centaine de nanogrammes par litre d'eau, mais certaines eaux de surface aux États-Unis, comme dans la région des Grands lacs, sont plus contaminées et peuvent atteindre 300 ng.L⁻¹ d'eau (Kolpin *et al.*, 2004; Klečka *et al.*, 2010).

Tableau 1.9 : Concentrations en triclosan mesurées dans les eaux douces naturelles

Site étudié	Type d'échantillon	Fréquence de détection	Concentrations mesurées (ng.L ⁻¹)			Référence
			Moyenne	Médiane	Maximale	
Itter, Allemagne	Eau de surface	–	–	–	90	(Wind <i>et al.</i> , 2004)
Lac de Greifen, Suisse	Eau de surface	–	20	–	–	(Singer <i>et al.</i> , 2002)
La Ruhr, Allemagne	Eau de surface	100 %	–	–	10	(Bester, 2005)
Lac de Greifen, Suisse	Eau de surface	100 %	11	7	74	(Lindström <i>et al.</i> , 2002)
Détroit, Canada	Eau de surface	–	–	–	8	(Hua <i>et al.</i> , 2005)
Mississippi, États-Unis	Eau de surface	–	–	–	34,9	(Zhang <i>et al.</i> , 2007)
Lac Majeur, Italie	Eau de surface	38 %	2,6	–	4	(Loos <i>et al.</i> , 2007)
Australie	Eau de surface	–	–	–	75	(Ying et Kookana, 2007)
Hong-Kong, Chine	Eau de surface	100 %	31,7	31,6	37,6	(Wu <i>et al.</i> , 2007)
Grands lacs, États-Unis	Eau de surface	90 %	–	–	300	(Klečka <i>et al.</i> , 2010)
Iowa, États-Unis	Eau de surface	10 %	–	–	140	(Kolpin <i>et al.</i> , 2004)
Géorgie, États-Unis	Eau de surface	100 %	4,5	–	9,3	(Kumar <i>et al.</i> , 2009)

La variabilité dans les concentrations en triclosan dans les effluents de station d'épuration ou dans les eaux de surface peut probablement s'expliquer par les différences de consommation en triclosan mais aussi par l'efficacité des procédés de traitement des eaux usées (Bester, 2005). En outre, les concentrations sont variables selon la saison d'échantillonnage, le débit du cours d'eau et la distance entre le point d'échantillonnage et la station d'épuration (Kolpin *et al.*, 2004; Glassmeyer *et al.*, 2005; Loraine et Pettigrove, 2006). Cette dernière observation, bien qu'en apparence triviale, illustre les phénomènes de dilution, d'adsorption sur les particules en suspension, de dégradation et de bioconcentration du contaminant le long des cours d'eau.

1.4.3.2 Écotoxicité du triclosan sur les amphibiens

Avec un coefficient de partage octanol/eau ($\text{Log } K_{ow}$) de 4,7 le triclosan est un contaminant suffisamment liposoluble pour se bioconcentrer et se bioaccumuler dans les organismes aquatiques. Sa toxicité est extrêmement variable d'une espèce d'amphibien à une autre. En guise d'exemples, il a été observé la mort de 91 % des têtards d'*Anaxyrus woodhousii* exposés pendant 28 jours à $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ alors que la CL_{50} de têtards de *Lithobates sphenoccephalus* exposés durant quatre jours est cinquante fois plus forte (Palenske *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2013). Malgré cette variabilité, la toxicité létale du triclosan semble peu probable dans l'environnement, compte-tenu des concentrations mesurées dans les eaux de surface. Néanmoins de nombreux effets ont été observés chez des amphibiens exposés à des doses sub-létales de triclosan (Tableau 1.10).

Ces études se sont exclusivement intéressées aux anoues et principalement à leur stade têtard (Fraker et Smith, 2004; Smith et Burgett, 2005; Veldhoen *et al.*, 2006; Palenske *et al.*, 2010; Fort et Pawlowski, 2011; Hinthner *et al.*, 2011; Brown *et al.*, 2013; Marlatt *et al.*, 2013; Hammond *et al.*, 2015). Le triclosan semble stimuler leur développement en augmentant leur taille et leur masse totale ainsi que la longueur de leurs membres postérieurs. En outre, la durée du développement de ces membres mais également la durée totale de la phase têtard sont raccourcies suite aux expositions à des concentrations en triclosan comprises entre 0,3 et $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (Veldhoen *et al.*, 2006; Fort et Pawlowski, 2011; Marlatt *et al.*, 2013). Ces modifications pourraient être associées à des changements dans l'expression des ARNm de gènes impliqués dans l'axe thyroïdien tels les récepteurs thyroïdiens *TRa* et *TRβ* ou encore la

protéine thyroïdo-sensible *THIBZ*. Ces modifications sont en revanche très variables selon les temps d'exposition. Il a en effet été observé chez les têtards *Lithobates catesbeianus* exposés à $3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de triclosan, une sur-transcription de *TR β* suite à une exposition de deux jours et au contraire une sous-transcription de ce même gène à la suite de dix-huit jours d'exposition (Veldhoen *et al.*, 2006; Marlatt *et al.*, 2013; Hammond *et al.*, 2015).

Le comportement des têtards d'anoures semble aussi modifié par les expositions au triclosan mais le temps d'exposition ou l'espèce étudiée pourrait être source d'une variabilité importante dans les réponses. Pour une même concentration d'exposition ($0,23 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), les têtards de *Bufo americanus* exposés trois jours sont plus actifs que leurs témoins non exposés, contrairement aux têtards de *Lithobates pipiens* exposés 24 jours qui sont moins actifs que leurs témoins respectifs (Fraker et Smith, 2004; Smith et Burgett, 2005).

À notre connaissance, une étude seulement s'est intéressée aux effets du triclosan sur le stade adulte. Des expositions relativement importantes (20 à $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) s'accompagnent d'une diminution significative du taux de vitellogénine et de testostérone plasmatiques (Matsumura *et al.*, 2005). Curieusement, à l'instar du benzo[*a*]pyrène, aucune étude ne s'est intéressée aux conséquences de ces altérations sur la reproduction des amphibiens ni sur leur progéniture. En revanche, l'ensemble des études mentionnées est basé sur des expositions de courtes durées qui ne reflètent pas toujours les concentrations couramment retrouvées dans les écosystèmes.

Tableau 1.10 : Effets écotoxicologiques du triclosan sur les amphibiens

Espèce étudiée	Ordre	Stade	Concentration d'exposition	Durée d'exposition	Effets observés	Concentration effective	Référence
<i>Acris crepitans</i> <i>Bufo woodhousii</i> <i>Lithobates sphenoccephalus</i>	Anura	têtard	31 – 750 µg.L ⁻¹	4 jours	Rythme cardiaque • ↑ <i>B. woodhousii</i> • ↓ <i>L. sphenoccephalus</i>	• <i>A. crepitans</i> CL ₅₀ 367 µg.L ⁻¹ • <i>B. woodhousii</i> CL ₅₀ 152 µg.L ⁻¹ • <i>L. sphenoccephalus</i> CL ₅₀ 562 µg.L ⁻¹	(Palenske <i>et al.</i> , 2010)
<i>Anaxyrus woodhousii</i>	Anura	têtard	10 ; 100 ; 1 000 µg.L ⁻¹	28 jours	• mortalité 91 % • mortalité 100 %	• à 10 µg.L ⁻¹ • dès 100 µg.L ⁻¹	(Brown <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bufo americanus</i>	Anura	têtard	0,23 ; 2,3 ; 23 ; 230 µg.L ⁻¹	3 jours	• ↑ activité • ↓ survie • ↑ survie	• dès 0,23 µg.L ⁻¹ • à 2,3 µg.L ⁻¹ • à 230 µg.L ⁻¹	(Smith et Burgett, 2005)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Anura	têtard	3 µg.L ⁻¹	2 jours	• ↑ transcription TRβ, THIBZ (queue, peau dorsale)	—	(Hammond <i>et al.</i> , 2015)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Anura	têtard	0,29 – 290 µg.L ⁻¹	2 jours	Réponse au stress : • altération transcription HSP30, CAT	• dès 0,29 µg.L ⁻¹	(Hinthner <i>et al.</i> , 2011)
<i>Lithobates catesbeianus</i>	Anura	têtard	0,3 ; 3 ; 30 µg.L ⁻¹	18 jours	• ↑ développement membre inf. • ↓ masse • ↓ transcription TRβ (queue) • ↑ transcription PCNA (cerveau)	• dès 0,3 µg.L ⁻¹ • 30 µg.L ⁻¹ • dès 0,3 µg.L ⁻¹ • dès 3 µg.L ⁻¹	(Veldhoen <i>et al.</i> , 2006)
<i>Lithobates pipiens</i>	Anura	têtard	0,23 ; 2,3 ; 23 ; 230 µg.L ⁻¹	24 jours	• ↓ activité • ↓ survie	• dès 0,23 µg.L ⁻¹ • à 230 µg.L ⁻¹	(Fraker et Smith, 2004)
<i>Pseudacris regilla</i>	Anura	têtard	0,3 ; 3 ; 30 µg.L ⁻¹	21 jours	• ↑ développement larvaire • ↑ longueur membres inférieurs • ↑ transcription TRα, TRβ (cerveau, queue)	• dès 0,3 µg.L ⁻¹	(Marlatt <i>et al.</i> , 2013)
<i>Xenopus laevis</i>	Anura	têtard	0,8 ; 3,1 ; 12,5 ; 50 µg.L ⁻¹	32 jours	• ↑ développement larvaire (masse ; taille)	• dès 3,1 µg.L ⁻¹	(Fort et Pawlowski, 2011)
<i>Xenopus laevis</i>	Anura	adulte ♂	20 ; 100 ; 200 µg.L ⁻¹	14 jours	• ↓ Vg plasmatique • ↓ T plasmatique	• dès 20 µg.L ⁻¹ • à 200 µg.L ⁻¹	(Matsumura <i>et al.</i> , 2005)

CL₅₀, concentration létale médiane ; TRβ, thyroid hormone receptor beta ; THIBZ, thyroid hormone induced bZip protein ; HSP30, 30 kilodalton heat shock protein ; CAT, catalase ; PCNA, Proliferating cell nuclear antigen ; TRα, thyroid hormone receptor alpha ; Vg, vitellogénine ; T, testostérone.

1.5 Les objectifs et la structure de l'étude

Comme en témoignent les tableaux 1.5, 1.8 et 1.9, de par leur mode de production ou leur consommation, le benzo[*a*]pyrène et le triclosan sont des polluants ubiquistes retrouvés dans les zones humides de tous les continents. Dans ces milieux aquatiques, les amphibiens sont de ce fait constamment exposés à ces contaminants. Néanmoins, d'après les résumés de la littérature présentés dans les tableaux 1.6 et 1.10, les effets du benzo[*a*]pyrène et du triclosan sur les amphibiens ont été principalement évalués à la suite d'expositions de courtes durées sur les stades larvaires exposés à une seule des deux molécules. En outre, les approches choisies sont majoritairement ciblées sur des modes d'action largement décrits par ailleurs comme la génotoxicité du benzo[*a*]pyrène ou sur des étapes particulières, bien que critiques, du cycle de vie des amphibiens comme la perturbation de la métamorphose par le triclosan. Autrement dit, la littérature manque d'informations concernant tant les effets de ces deux contaminants sur le stade adulte que sur leurs effets à plus long terme ou sur les effets de ces deux contaminants en mélange.

Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse réside dans l'identification et la compréhension des effets physiologiques associés à l'exposition de *Xenopus tropicalis* aux perturbateurs endocriniens benzo[*a*]pyrène et triclosan. Notre approche est divisée en deux parties basées sur des expositions aiguës et chroniques (Figure 1.17).

Dans la première partie de l'étude (Chapitre 2), nous nous sommes particulièrement intéressés aux effets de ces deux perturbateurs endocriniens seuls ou en mélange sur des xénopes adultes exposés en cinétique de 24 heures à des concentrations fortes mais envisageables d'un point de vue environnemental. Afin de mieux appréhender les perturbations mises en jeu, c'est-à-dire sans *a priori* sur les effets potentiellement induits par les contaminants, nous avons réalisé un séquençage massif du transcriptome hépatique de xénopes femelles (Publication I). Cette étape a permis l'identification de gènes candidats dont la transcription a été ensuite quantifiée chez des xénopes adultes mâles exposés dans des conditions similaires (Publication II). Enfin, en combinaison avec cette analyse transcriptomique nous avons caractérisé chez les xénopes femelles et mâles les altérations cellulaires et physiologiques émanant des expositions (Publications I et II).

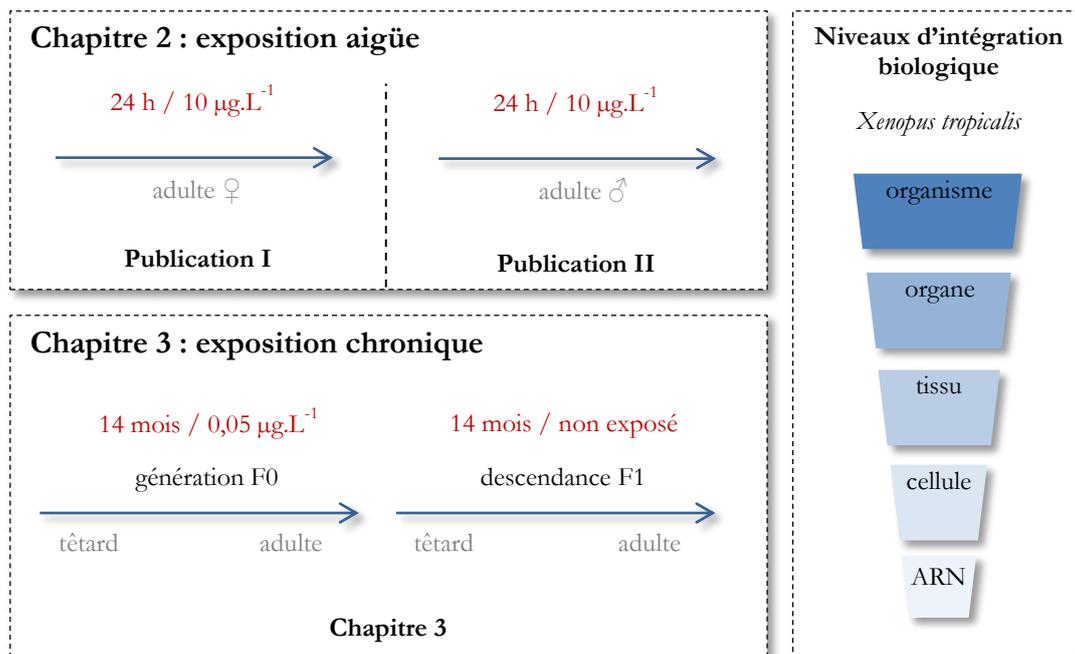


Figure 1.17 : Organigramme de la structure de l'étude. Les effets à court et long terme du benzo[*a*]pyrène, du triclosan et du mélange benzo[*a*]pyrène/triclosan ont été appréhendés selon différentes échelles biologiques, du niveau moléculaire jusqu'à la physiologie générale de l'individu.

La seconde partie de l'étude (Chapitre 3) a concerné l'impact des perturbateurs endocriniens sur la physiologie et le succès reproducteur des amphibiens et à l'identification des mécanismes impliqués dans leur réponse à long terme à la pollution (Figure 1.7). Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux effets sur une première génération de *Xenopus tropicalis* (F0) exposée à de faibles concentrations environnementales de benzo[*a*]pyrène, de triclosan, et d'un mélange benzo[*a*]pyrène/triclosan. Dans un second temps, nous avons étudié la descendance (F1) non exposée afin d'en évaluer les effets multigénérationnels. À l'instar de la première partie, une approche intégrant différentes échelles biologiques a été adoptée. À l'échelle de l'organisme, des mesures de traits d'histoires de vies ont été effectuées tout au long du développement des deux générations. En effet, nous avons réalisé un séquençage massif des ARNm et une analyse approfondie du métabolisme hépatique (enzymologie, histologie, physiologie...) de la génération parentale F0. Ceci nous a permis d'identifier les mécanismes moléculaires et les processus physiologiques perturbés par l'exposition et de les mettre en relation avec les modifications observées en première partie de la thèse (Chapitre 3).

Les approches intégratives que nous avons appliquées dans les deux volets de cette étude nous permettent d'appréhender la réponse des amphibiens aux stress environnementaux induits par des perturbateurs endocriniens ubiquistes des eaux de surface. L'originalité d'une telle démarche réside dans l'étude de concentrations environnementales à court terme mais également à long terme de perturbateurs endocriniens en mélange et dans l'identification des altérations multigénérationnelles et des perturbations à différents niveaux d'organisation biologique (du transcriptome au succès reproducteur des individus).

2 Effets à court terme de l'exposition aux perturbateurs endocriniens

2.1	Introduction	73
2.2	Impaired liver function in <i>Xenopus tropicalis</i> exposed to benzo[<i>a</i>]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence	77
2.2.1	Background.....	77
2.2.2	Methods.....	79
2.2.2.1	Animals	79
2.2.2.2	<i>Xenopus</i> exposure to benzo[<i>a</i>]pyrene	80
2.2.2.3	BaP extraction from water and HPLC analysis	80
2.2.2.4	Sample preparations	81
2.2.2.5	RNA extraction and cDNA library preparation for sequencing.....	81
2.2.2.6	Sequencing of cDNA libraries, mapping reads on the <i>Xenopus</i> genome.....	82
2.2.2.7	Gene expression quantification and differential analysis	82
2.2.2.8	Analysis of gene functions differentially regulated by BaP treatment.....	83
2.2.2.9	Functional annotation enrichment	83
2.2.2.10	mRNAseq data validation using RT-qPCR.....	84
2.2.2.11	Measurements of blood glucose.....	84
2.2.2.12	Cryosectioning	86
2.2.2.13	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling assay	86
2.2.2.14	Hematoxylin, eosin and saffron staining	86
2.2.2.15	Oil red O staining.....	87
2.2.2.16	Biliary cholesterol content.....	87
2.2.2.17	Biliary BaP metabolite content.....	88
2.2.2.18	Statistical analysis	88
2.2.2.19	Data access	88
2.2.3	Results.....	89
2.2.3.1	BaP uptake and metabolism	89
2.2.3.2	Sequencing and mapping of cDNAs.....	90
2.2.3.3	Functional analysis of BaP regulated genes and their dynamics	92
2.2.3.4	Effects on the steroid biosynthesis pathway and lipid metabolism.....	94
2.2.3.5	Effects on glucose metabolism	97
2.2.3.6	Effects on the MAPK signalling pathway, hepatocyte apoptosis.....	98
2.2.3.7	Effects of BaP on cell-cell interactions.....	102
2.2.4	Discussion	103
2.2.5	Conclusions.....	108
2.2.6	Abstract	110

2.3	Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[<i>a</i>]pyrene and triclosan in <i>Xenopus tropicalis</i>.	112
2.3.1	Introduction.....	112
2.3.2	Experimental	114
2.3.2.1	Animals	114
2.3.2.2	<i>Xenopus</i> exposure to benzo[<i>a</i>]pyrene (BaP) and triclosan (TCS)	114
2.3.2.3	BaP and TCS extraction from water and HPLC analysis	115
2.3.2.4	Biliary BaP and TCS metabolites content.....	116
2.3.2.5	RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR.....	117
2.3.2.6	Measurements of glycaemia and alanine aminotransferase activity.....	117
2.3.2.7	Histological observations with HE and ORO staining.....	119
2.3.2.8	Assessment of splenocyte viability and phagocytosis activity	120
2.3.2.9	Statistical analysis.....	121
2.3.3	Result and discussion	121
2.3.3.1	BaP and TCS uptake and metabolism.....	121
2.3.3.2	Effects on the insulin signaling pathway, glucose and lipid metabolism.	123
2.3.3.3	Effects on cell-cell interactions	127
2.3.3.4	Effects on innate immune system and liver inflammation	129
2.3.3.5	Effects on the testes.....	133
2.3.4	Conclusion	133
2.3.5	Abstract	135
	Highlights.....	135
	Statement of novelty	136
	Acknowledgements	136
2.4	Conclusion	137

2.1 Introduction

Cette première partie a été initiée suite à une étude précédente réalisée sur la grenouille verte *Pelophylax kl. esculentus* au sein du Laboratoire d'ECologie Alpine (LECA). Cette étude a démontré que cette espèce était capable de tolérer des concentrations de benzo[*a*]pyrène (BaP) fortes mais réalistes d'un point de vue environnemental ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) durant une semaine d'exposition sans exprimer de phénotype apparent de toxicité. Cette tolérance s'accompagnait d'une bioconcentration importante du BaP, mais surtout d'une très forte capacité de métabolisation suivie d'une excrétion des métabolites dans la vésicule biliaire (Reynaud *et al.*, 2012). Ces mêmes travaux ont également démontré que les inductions d'enzymes de phase I et de phase II de biotransformation survenaient tardivement au regard de la production de métabolites et des potentiels effets toxiques. Ainsi, du fait de cette apparente tolérance, il paraissait essentiel de vérifier qu'aucun effet toxique non visible ne pouvait perturber la physiologie des animaux et d'identifier des marqueurs plus sensibles que les enzymes de détoxification, répondant plus précocement à une exposition aux HAP. Dans cette optique, s'est inscrite l'étude en cinétique de l'effet du BaP sur le transcriptome hépatique du *Xenopus tropicalis* adulte femelle (Publication I, Figure 2.1).

Publication I : C. Regnault, I.A.M. Worms, C. Oger, C. MelodeLima, S. Veyrenc, M.-L. Bayle, B. Combourieu, A. Bonin, J. Renaud, M. Raveton et S. Reynaud (2014). *Impaired liver function in Xenopus tropicalis exposed to benzo[*a*]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. BMC Genomics 15: 666.*

Des xénopes femelles ont été exposées au BaP ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) dans 500 mL d'eau à 25 °C. D'autres femelles témoins, n'ont été exposées qu'au solvant de dilution des perturbateurs endocriniens, l'éthanol, à une concentration finale de 0,001 %. Les expositions ont été réalisées pendant 24 h avec quatre temps de prélèvement (6 h, 12 h, 18 h, 24 h) en trois répliques chacune. Afin de ne caractériser que les expositions transcutanées et éviter les transferts via le bol alimentaire, les xénopes n'ont pas été nourries durant l'exposition. En effet, il est admis que les xénopes ne boivent pas, les échanges d'eau étant transcutanés (Ogushi *et al.*, 2010).

Publication I

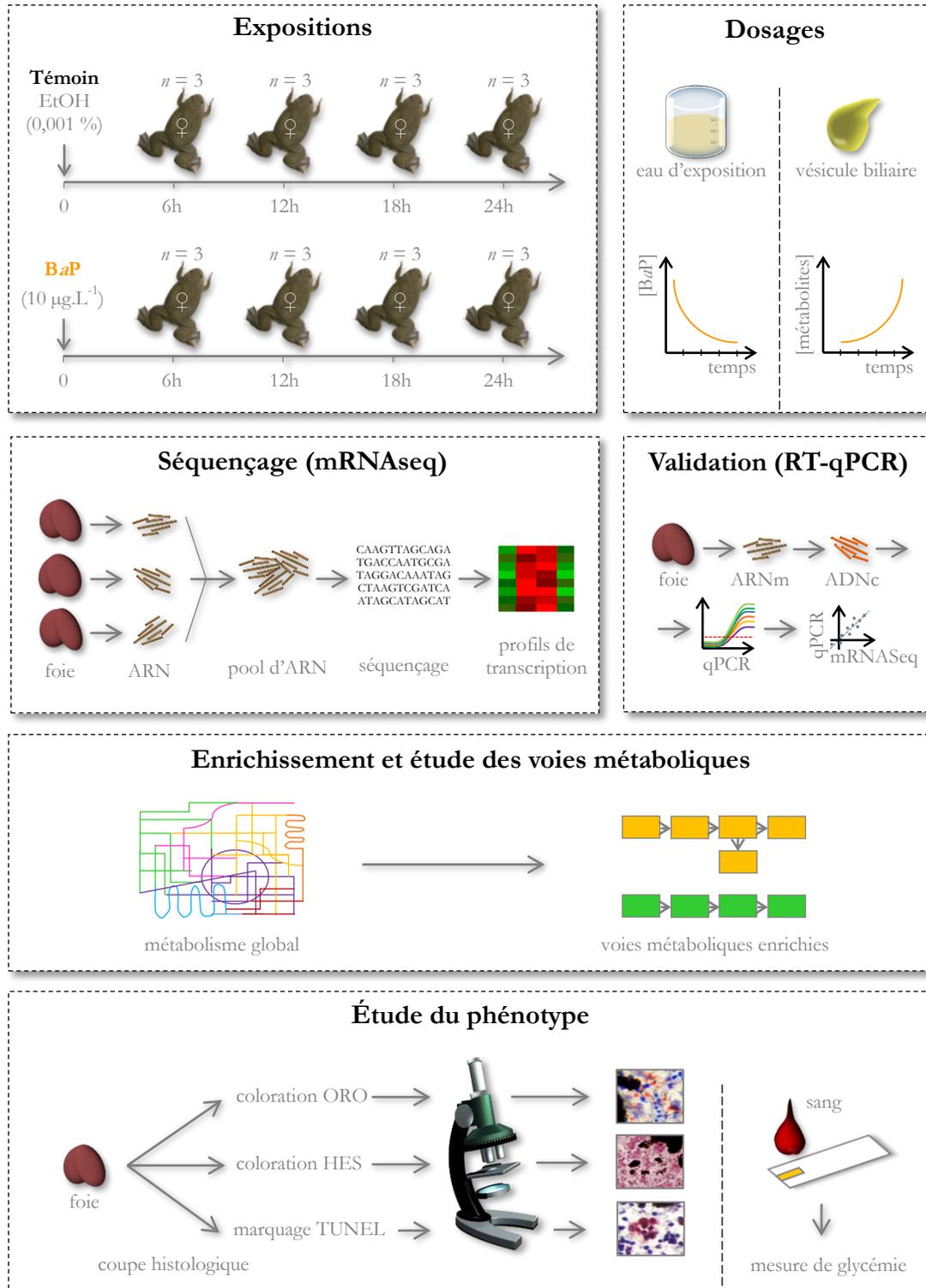


Figure 2.1 : Approche expérimentale développée dans la Publication I. EtOH, éthanol ; mRNAseq, séquençage massif des ARN messagers ; RT-qPCR, transcription inverse suivie d'une réaction en chaîne par polymérase quantitative ; ORO, huile rouge *oil red O* ; HES, hématoxyline-éosine-safran ; TUNEL, *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*.

À chaque durée d'exposition, de l'eau d'exposition et la vésicule biliaire ont été prélevées pour une mesure directe de la fluorescence du BaP et de ses métabolites. Ces mesures témoignent respectivement de l'absorption par voie transcutanée du BaP par les xénopes et de son excrétion sous forme de métabolites dans les sucs biliaires après un transit hépatique. Le foie étant l'organe majeur de détoxification, a aussi été prélevé. Les ARN totaux du foie de chaque xénope (même lobe pour tous) ont été extraits, puis regroupés et les ARNm ont été séquencés par une technique de séquençage à très haut débit de type Illumina/Solexa (mRNAseq). Après un traitement statistique des données, les résultats du séquençage ont été validés par RT-qPCR. Une étude des grandes fonctions physiologiques modulées par les gènes ayant une expression significativement différente entre les xénopes exposés et les xénopes témoins a été réalisée par l'analyse statistique de l'enrichissement des réseaux métaboliques. Enfin, cette étude à l'échelle transcriptomique a été complétée par une étude plus générale du phénotype des femelles, tels les niveaux de glycémie, la structure histologique du tissu hépatique et la mesure de l'apoptose des hépatocytes.

Dans le but de confirmer chez les xénopes mâles, le phénotype observé chez les femelles, nous les avons exposés dans les mêmes conditions que les femelles au BaP. Dans les milieux naturels, les amphibiens sont exposés à des contaminants en mélange. Aussi avons-nous également réalisé une étude des effets d'une exposition de faible durée à des perturbateurs endocriniens en mélange (BaP et TCS) sur les xénopes adultes mâles (Publication II, Figure 2.2).

Publication II : C. Regnault, J. Willison, S. Veyrenc, A. Airieau, P. Méresse, M. Fortier, M. Fournier, P. Brousseau, M. Raveton et S. Reynaud. *Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis. Soumise dans *Journal of Hazardous Materials*.**

Les expositions ont été réalisées en cinétique de court terme (durées 12 h, 18 h, 24 h) dans des conditions semblables à l'exposition des femelles (quatre répliques pour chacune). La cinétique de l'absorption et de la métabolisation du BaP et du TCS a été mesurée par des dosages à chaque durée dans l'eau d'exposition et dans la vésicule biliaire. Les perturbations engendrées par les deux molécules ont été évaluées par l'analyse en RT-qPCR de la transcription hépatique des gènes clés des voies métaboliques décrites comme enrichies lors de l'analyse du transcriptome des femelles (Publication I). Pour conclure, et afin d'évaluer la

part du métabolisme dans les effets liés à l'exposition aux perturbateurs endocriniens, les effets du BaP et du TCS sur le système reproducteur (histologie des testicules et transcription des gènes impliqués dans la synthèse des hormones sexuelles) et sur le système immunitaire inné (activité phagocytaire splénique, transcription des peptides antimicrobiens de la peau) ont été analysés.

Publication II

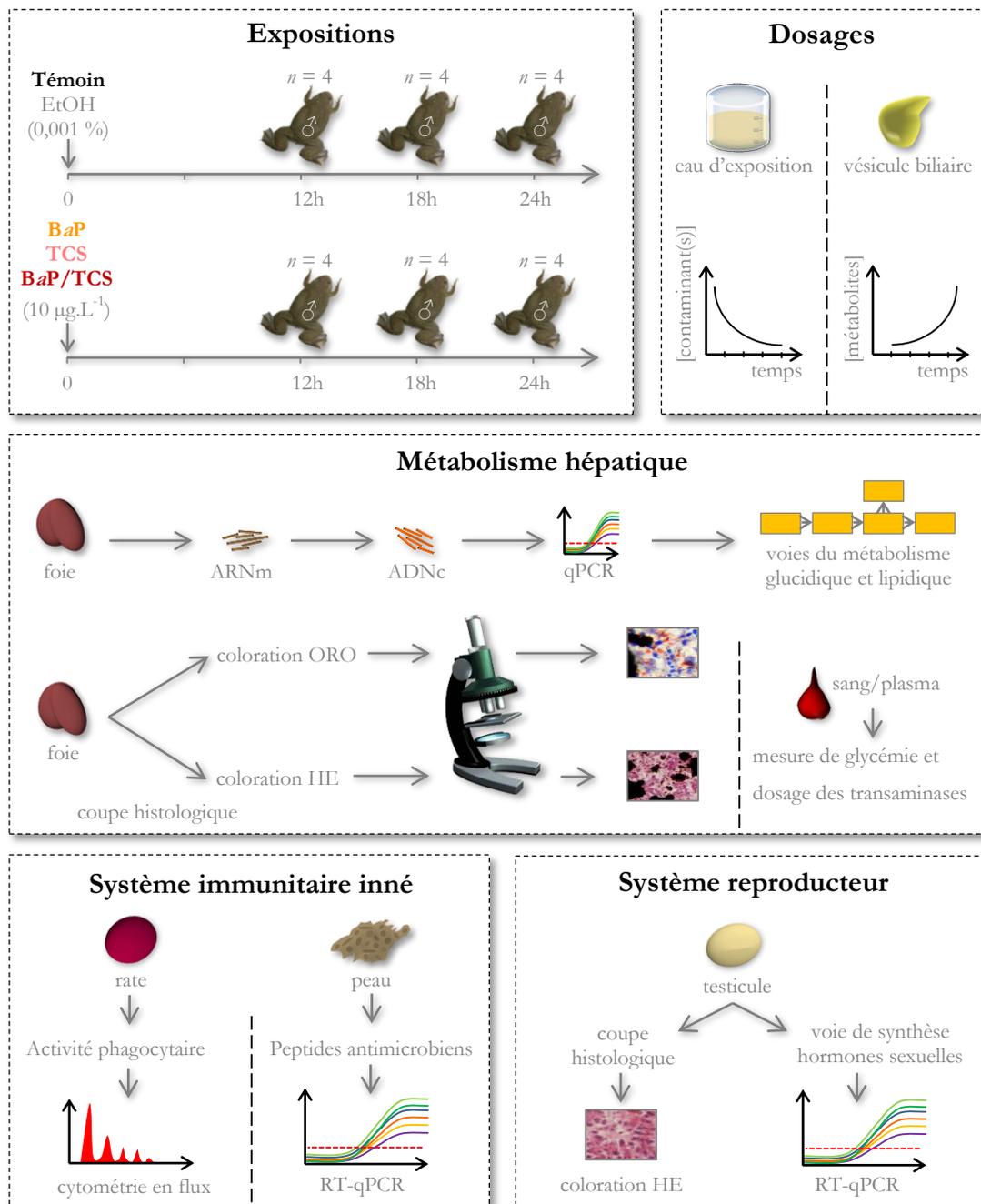


Figure 2.2 : Approche expérimentale développée dans la Publication II. EtOH, éthanol ; qPCR, réaction en chaîne par polymérase quantitative ; ORO, huile rouge oil red O ; HE, hématoxyline-érythrosine.

2.2 Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo[*a*]pyrene: transcriptomic and metabolic evidence

Christophe Regnault, Isabelle AM Worms, Christine Oger-Desfeux, Christelle MelodeLima, Sylvie Veyrenc, Marie-Laure Bayle, Bruno Combourieu, Aurélie Bonin, Julien Renaud, Muriel Raveton and Stéphane Reynaud.

BMC Genomics 2014, 15:666 <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/15/666>.

doi:10.1186/1471-2164-15-666

2.2.1 Background

Dramatic declines in amphibian populations in wetlands have been described worldwide since the 1980s (Lips *et al.*, 2008), with current extinction rates reaching levels that are 211 times higher than background levels (Roelants *et al.*, 2007). Despite lengthy debate about causative agents responsible for this species decline, theoretical and empirical research has confirmed the complex cross-effects of anthropogenic activities on the survival of amphibians through habitat loss, the introduction of exotic species, increased UV radiation, water acidification, emerging infectious diseases and multi-pollution (Carey *et al.*, 1999; Blaustein and Bancroft, 2007; Hayes *et al.*, 2010). Some field studies using landscape-scale data have suggested that chemical contaminants may correlate with population declines in several amphibian species (Fellers *et al.*, 2004; Reeder *et al.*, 2005; Bank *et al.*, 2006; Sparling and Fellers, 2009). Therefore, chemical contaminants were proposed as one of the key contributing factors altering amphibian population fitness (Fedorenkova *et al.*, 2012). However, the exact mechanisms of population responses to chemical exposure are still poorly understood, leading several authors to consider pollution as a cause of secondary importance (Kaplan, 2009).

Numerous toxicological studies have reported diverse physiological effects in individuals exposed to pollutants, such as increased mortality, decreased growth rates, malformations, endocrine disruption and immunosuppression (Carey *et al.*, 1999; Blaustein and

Bancroft, 2007; Hayes *et al.*, 2010). Most of these studies solely investigated larval exposure and focused on pesticides as contaminants (Hayes *et al.*, 2010). However, freshwater ecosystems are polluted with complex mixtures including emerging and well-known pollutants, like heavy metals, polychlorobiphenyls, personal care products, drugs and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), as well as their transformation products. In the case of PAHs, several studies have suggested that amphibians exhibit a variety of physiological disorders when exposed to environmentally relevant concentrations of PAHs (from 25 ng.L⁻¹ to 30 µg.L⁻¹) at the larval stage (Fernandez and L'Haridon, 1992; Hatch and Burton, 1998; Mouchet *et al.*, 2005; Matson *et al.*, 2009). However few studies have focused on adult amphibian responses (Stabenau *et al.*, 2006; Ueda *et al.*, 2011; Reynaud *et al.*, 2012) and even less on the all-important females on which the resources found in the eggs are entirely dependent (DiCroce *et al.*, 1997). The PAH, benzo[*a*]pyrene (BaP) is classified as a priority pollutant, based on its known carcinogenicity (Willett *et al.*, 2000; Padrós *et al.*, 2003). The mechanisms causing BaP toxicity are linked to its bioactivation through a series of enzymes specifically induced for the metabolism and excretion of BaP, as the genes encoding for enzymes are closely- regulated by *AhR* and *NRF2* transcription factors (Ma, 2001; Nebert *et al.*, 2004; Köhle and Bock, 2007). One deleterious effect of this active metabolism is the generation of genotoxic (capable of forming DNA adducts) and non-genotoxic metabolites, some of which are capable of inducing oxidative stress (Penning *et al.*, 1999). Since the main BaP and other xenobiotic biotransformation reactions take place in the liver, this is also the preferential location for collateral toxic events (Sturgill and Lambert, 1997). It would appear that the bioaccumulation of BaP is very pronounced in amphibian species (Brandt *et al.*, 2002), but adult females exposed to relatively high doses (10 µg.L⁻¹) of BaP presented good levels of tolerance to this contaminant due to efficient hepatic detoxification (Reynaud *et al.*, 2012). To date, in the absence of any apparently toxic effects linked to the specific aforementioned BaP regulation, no study has assessed the possible hidden harm to female amphibian liver physiology caused by PAHs. Today, this knowledge gap can be bridged using high throughput sequencing approaches, such as mRNA sequencing (mRNAseq), recovering information on gene expression over the whole transcriptome from a single experiment (Rosenblum *et al.*, 2009; Gohin *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2012; Devonshire *et al.*, 2013). This technique has recently been shown to be more sensitive, reliable and informative than microarrays for the *in vitro* evaluation of BaP toxicity (van Delft *et al.*, 2010). In the case of *Xenopus tropicalis*, the interpretation of large numbers of sequences generated by mRNAseq takes advantage of the

recently released complete genome (Hellsten *et al.*, 2010), and benefits from a comprehensive repository from the standard model *Xenopus tropicalis*, giving access to all levels of sequence data sets, including transcriptomic data (Bowes *et al.*, 2008). *Xenopus tropicalis* is easy to maintain, has a short life cycle and is an appropriate model for the analysis of the sublethal effects of toxicants in amphibians (Säfholm *et al.*, 2012; Schwendiman and Propper, 2012). *Xenopus tropicalis* would therefore appear to be an excellent amphibian model for in-depth studies on the more hidden effects of chemical contaminants, particularly BaP, on the female liver at different biological levels.

The objective of this study was to reveal *in vivo* hepatic responses in *Xenopus tropicalis* females exposed to an environmentally relevant concentration of BaP ($10 \mu\text{g.L}^{-1}$) at the transcriptomic, cellular and physiological levels. Due to the dynamic nature of cellular responses, a kinetic approach was applied over a 24-hour exposure period by sequencing mRNA at 6, 12, 18 and 24 hours post-exposure. Transcriptomic data collected from exposed and non-exposed animals were compared in order to identify hepatic metabolic pathways significantly affected by BaP treatment. The metabolic pathways which were found to be enriched at transcriptomic level were studied in detail as regards their chronological activation by BaP, and were further associated to cytological and physiological liver phenotype changes over the same time period.

2.2.2 Methods

2.2.2.1 Animals

Xenopus (*Xenopus tropicalis*) females were purchased from the “Xenopus national husbandry” (CRB “*Xenopes*”), University of Rennes 1 (<http://xenopus.univ-rennes1.fr/>). The frogs were fed daily *ad libitum* with pellets of trout food. They were allowed to acclimatize for 3 weeks at 25°C with a photoperiod of 12 hrs: 12 hrs in constantly filtered water prior to starting the experiments. All experiments were performed in an animal house accredited by the French Ministry of Animal Welfare (n° B 38 421 10 001) and in accordance with European Union laws and the recommendations of the ethics committee (ComEth Grenoble - C2EA - 12).

2.2.2.2 *Xenopus* exposure to benzo[*a*]pyrene

Xenopus were exposed individually at 25°C in 1 L glass jars protected from the light (3 individual replicates by time and exposure conditions). The exposure solutions consisted of 500 mL tap water (pH 7.8, organic carbon = 0.6 mg.L⁻¹, dissolved oxygen = 9.9 mg.L⁻¹, nitrate = 2.9 mg.L⁻¹, nitrites < 0.02 mg.L⁻¹) containing BaP at an initial concentration of 10 µg.L⁻¹. This concentration was chosen to match BaP concentrations usually found in highly-polluted waters, as used in previous experiments (Dortch *et al.*, 2008; Reynaud *et al.*, 2012). The control frogs were exposed to ethanol (vehicle) at 1/1000 (v:v) concentration. To avoid any circadian effects, experiments with the control and BaP-exposed animals were conducted in parallel. The frogs were not fed during the exposure period (from 0 to 24 hours).

2.2.2.3 BaP extraction from water and HPLC analysis

Water samples were stored in 50 mL tubes at -20°C. When measuring the BaP concentration, the water samples were defrosted overnight at room temperature. Fifty microliters of fluoranthene (50 mg.L⁻¹, extraction internal control) and 5 mL of acetone were added. The solutions were then extracted three times with 30 mL *n*-hexane. The pooled *n*-hexane solution was dehydrated by adding 2.5 g of sodium salt of sulfurous acid (Na₂SO₃). This solution was filtered in a glass filter. The remaining salt was agitated twice with 15 mL of *n*-hexane (5 min) and filtered. The filtered *n*-hexane solution was evaporated at 40°C using a rotary evaporator until a volume of 1 mL was obtained. Samples and washing solutions were transferred into a HPLC-brown glass vial and evaporated at room temperature overnight. Afterwards, 500 µL of acetonitrile was put into the vial and was vortexed and sonicated (2 min) before HPLC analysis. HPLC measurements were carried out on a 1260 infinity LC system (Agilent) equipped with a C18 column (Agilent Zorbax Eclipse PAH). The injection volume was 10 µL. The mobile phase consisted of a gradient of acetonitrile in H₂O with 0.1% of trifluoroacetic acid (TFA water) from 60% to 100% of acetonitrile for 20 min at a flow rate of 1 mL.min⁻¹. PAHs were detected using a fluorescent detector (excitation wavelength of 260 nm and emission wavelength of 420 nm). The following retention times were determined for BaP (14 min) and the internal standard fluoranthene (5 min). A calibration curve of BaP (0, 1, 2.5, 5, 10 mg.L⁻¹) was used to determine the sample BaP concentration. The extraction method is 95% efficient for BaP and 97% for fluoranthene. A BaP solution (10 µg.L⁻¹) without

Xenopus was processed as previously described in order to validate the stability of BaP during the 24-hour time period in our conditions (extraction efficiency 97%).

2.2.2.4 Sample preparations

The Xenopus were sacrificed rapidly at 6, 12, 18 and 24 hours post-exposure with a blow to the head. The liver and gall bladder were rapidly removed. Blood was sampled by means of an intra-cardiac puncture in order to measure glucose levels. All the subsequent experiments (dissection, histology, mRNA sequencing etc.) were performed on the same individuals. For the mRNA sequencing experiments, the same liver lobe from each frog was stored in RNAlater (Ambion, Austin, TX, USA) at 4°C until RNA extraction, while the rest of the organ was embedded in Tissue OCT (Labonord, France), immediately dropped into liquid nitrogen, and conserved at -80°C for further histological analysis. The gall bladders were put into clean tubes, immediately dropped into liquid nitrogen, and conserved at -80°C for BaP metabolism analysis.

2.2.2.5 RNA extraction and double-strand cDNA library preparation for sequencing

For each biological replicate, total RNA was extracted from 15 mg liver using the RNAqueous®-4PCR Kit (Ambion, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA quality and quantity were controlled on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, USA). After extraction, total RNA from each biological replicate was pooled equally in order to obtain 8 µg of total RNA in 50 µL for each treatment and used for mRNAseq library preparation using mRNA-Seq-8 Sample Prep Kit (Illumina, USA) according to the manufacturer's instructions. The mRNAs from each treatment were purified using poly-T beads and chemically fragmented. These fragmented mRNAs were used to prepare double-strand fragmented cDNA using superscript II (Invitrogen) at 42°C for 50 min for the first strand. Second-strand cDNAs were then synthesized and the mRNAs removed using DNA pol I and RNase H at 16°C for 2.5 hours. Double-strand cDNAs were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) and processed for end repair and 3' adenylation using Klenow polymerase. These adenylated double-stranded DNA were purified using a MinElute PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) before ligating paired-end adaptors. Products of

ligation were purified on 2% agarose gel based on size range (200 ± 25 pb) for downstream enrichment. The adapter-ligated cDNA library was then enriched using PCR with two primers (primer PE 1.0 and primer PE 2.0, sequences of primers are available at <http://illumina.com>.) annealing to the end of adapters and Phusion DNA polymerase (Finnzymes Oy). PCR cycles were 30 s at 98°C followed by 15 cycles of 10 s at 98°C, 30 s at 65°C, 30 s at 72°C and a final elongation step of 5 min at 72°C. The enriched cDNA libraries were then purified using a QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Germany) before quality control analysis on an Agilent 2100 Bioanalyzer.

2.2.2.6 Sequencing of cDNA libraries, mapping reads on the *Xenopus* genome

Each cDNA library was sequenced on a separated flow cell lane on a Genome Analyzer II (Illumina Corporation) at the National Sequencing Center (Genoscope, Evry, France) to obtain 75 bp single-end reads. Quality control of the reads was performed using the R/Bioconductor package Short-Read v.1.8.2 (<http://www.bioconductor.org/packages/2.7/bioc/html/ShortRead.html>). The reads were trimmed of adaptor sequences and low-quality 3' ends using functions from the HTSeq python package (v.0.4.7p2, <http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq>), and removed completely when their length was less than 35 bp. The cleaned reads were mapped to the *Xenopus* genome assembly (JGI4.2) with Ensembl annotations (release 62) using Bowtie-0.12.7 / Tophat 1.2 software (Trapnell *et al.*, 2009; <http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) (with a maximum intron size of 250000 bp for the discovery of novel junctions between exons).

2.2.2.7 Gene expression quantification and differential analysis

The HTSeq-count function (<http://www-huber.embl.de/users/anders/HTSeq/doc/count.html>) from the HTSeq package was applied with the option `mode = intersection_nonempty` to Tophat alignments to enumerate, for each library, the number of short reads overlapping the Ensembl annotated genes. A table containing the counts for each gene in each library was assembled and filtered prior to the next step to ensure only genes represented by at least 20 reads across all libraries were kept. The Bioconductor package DESeq 1.2.1 (Anders and Huber, 2010) was then used to normalize short read counts across all libraries and to test for the differential expression of the annotated transcripts between

exposed and unexposed animals at each exposure time point. Genes were considered to be differentially transcribed when the transcription ratio TR (BaP-treated versus control) at any time point was > 1.5 in either direction with an adjusted p -value (FDR) lower than 0.05 after the multiple testing correction.

2.2.2.8 Analysis of gene functions differentially regulated by BaP treatment

A comparative analysis of differentially regulated gene functions in BaP-treated and control animals was performed on the genes showing a significant differential transcription at at least one time point. We manually assigned all detected transcripts to different biological categories based on their Ensembl annotation. Genes were classified into 10 categories: cell death/proliferation, cytoskeleton and extracellular matrix, detoxification enzymes, DNA interaction and repair, carbohydrate metabolism and ATP production, lipid metabolism, protein metabolism, immunity, signalling and transport, and hypothetical proteins. In order to compare the transcription patterns of genes from each category, hierarchical clustering was performed by loading fold transcription values into TM4 Multi experiment Viewer (MeV) software (Saeed *et al.*, 2003). Gene trees were calculated using Pearson uncentered distance metric and complete linkage method with optimization of gene order (D'haeseleer, 2005).

2.2.2.9 Functional annotation enrichment

Differentially expressed genes were subjected to annotation enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway mapping using the online functional annotation tool DAVID (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery, <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang *et al.*, 2009a, 2009b) with all genes detected in our experiment as background (10,483 genes). *Xenopus* gene identifiers were transformed into their human orthologs to improve the richness of the output (Zheng *et al.*, 2010a, 2010b). In order to differentiate functional enrichment due to up- and downregulated genes, the DAVID tool was used on any gene found up- or down-regulated at at least one time point from the genes found to be differentially transcribed at any time point. Significance was calculated using a modified Fisher's exact test ($p < 0.05$). Heat maps of expression profiles for genes sharing enriched annotation pathways or other genes associated with these pathways were produced using TM4 Multi experiment Viewer (MeV) software, as described above.

2.2.2.10 mRNAseq data validation using RT-qPCR

The transcription levels of ten genes (ENSXETG00000021546 – *Cytochrome P450 26B1*; ENSXETG00000003432 – *Cytochrome P450 51A1*; ENSXETG00000021140 – *Cytochrome P450 1A1*; ENSXETG00000011124 – *jun oncogene*; ENSXETG00000023050 – *squalene epoxidase*; ENSXETG00000007561 – *catalase*; ENSXETG00000011266 – *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1*; ENSXETG00000024078 – *heat shock 70 kDa protein*; ENSXETG00000018041 – *potassium large conductance calciumactivated channel M alpha1*; ENSXETG00000017419 – *pyruvate dehydrogenase phosphatase catalytic subunit 2*) found to be over-transcribed at at least one time point were validated using real-time quantitative PCR (RTqPCR). We treated 1.6 µg of the total RNA per *Xenopus* and per time point with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and used cDNA synthesis with superscript III and OligodT20 primer (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions, the resulting cDNAs were diluted 50 times. Real-time quantitative PCR reactions of 25 µL were performed on an iQ5 system (Biorad, Hercules, CA, USA) using iQ SYBR Green supermix (Biorad), 0.3 mM of each primer (Table 2.1) and 5 µL of diluted cDNAs. A melting curve analysis was performed to check for the specificity of the primers in producing one single targeted PCR product. The transcription level was quantified using the $\Delta\Delta C_t$ method taking into account PCR efficiency (Pfaffl, 2001) and using three housekeeping genes for normalization: the *ribosomal proteins L8* (ENSXETG00000015483), *S7* (ENSXETG00000001209) and *L27* (ENSXETG00000003912). Results were expressed as mean transcription ratio (\pm standard error) between BaP-treated animals and controls for each time point.

2.2.2.11 Measurements of blood glucose

Glycaemia was measured using Accu-Chek[®] performa teststrips (Roche).

Table 2.1: Primer sequences used for RT-qPCR in mRNAseq data validation.

Gene name	Accession no.	Forward primer	Reverse primer	Annealing T°C
<i>CAT</i>	ENSXETG00000007561	AGTGCCCAAAGAAGGAATC	GGTTAATGAAGCGGAGAGG	58
<i>CYP1A1</i>	ENSXETG00000021140	GATACCATTACCACTGCTCTCTC	CCTCCTTTCTCTGCCAATAACC	53
<i>CYP26B1</i>	ENSXETG00000021546	TTCTACGCCTGCCTTATCTTAC	CTGGGTTTGGATGGTCTACG	58
<i>CYP51A1</i>	ENSXETG00000003432	AGGTCGGCATCGCTGTATC	ATGGTTGTGTAGTTTATCGTAGGG	55
<i>HSP70</i>	ENSXETG00000024078	ACTTACTTCTGCTGGATGTTG	AGGTCTGTGTCTGCTTGG	51
<i>JUN</i>	ENSXETG00000011124	TCACAGACGAGCAAGAAG	TCACAGACGAGCAAGAAG	51
<i>KCNMA1</i>	ENSXETG00000018041	GGATGGTGGCTGTTATGGAGAC	TGGCTGGGTGTGCTGAGG	56
<i>PCK1</i>	ENSXETG00000011266	ATGCCGACCTGCCGTATG	TCCACCCTCACTCACAAC	60
<i>PDP2</i>	ENSXETG00000017419	TCGCCTTCAAACCTACCATAC	GACCACTTGCTCATTTCTCC	59
<i>SQLE1</i>	ENSXETG00000023050	TTGCGGTAGAGAACGACAG	CATTCAGCACTACACTCATCC	52
<i>RPL8</i>	ENSXETG00000015483	GCCACCGTTATCTCCACAATC	GACCACCACCAGCAACAACC	56
<i>RPL27</i>	ENSXETG00000003912	GTTGTCTTGTCTTAGCAG	TGGCAGTCACCTTACGAG	58
<i>RPS7</i>	ENSXETG00000001209	GGTATTTCCAGGCTCTCTTG	ACCACCTCCAACCTTCTATTTCC	54

CAT, catalase; *CYP1A1*, cytochrome P450 1A1; *CYP26B1*, cytochrome P450 26B1; *CYP51A1*, cytochrome P450 51A1; *HSP70*, heat shock 70kDa protein; *JUN*, jun oncogene; *KCNMA1*, potassium channel calcium activated M alpha 1; *PCK1*, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; *PDP2*, pyruvate dehydrogenase phosphatase; *SQLE1*, squalene epoxidase; *RPL8*, ribosomal protein L8; *RPL27*, ribosomal protein L27; *RPS7*, ribosomal protein S7. Ribosomal proteins were used as housekeeping genes.

2.2.2.12 Cryosectioning

Frozen samples were cut into 7 μm thick sections on a cryostat (CM3050 S, Leica, Nussloch, Germany). Frozen sections were collected on Superfrost plus microscope slide (Labonord). Cryochamber and specimen temperatures were set at -25°C .

2.2.2.13 Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

Hepatic cell apoptosis was examined using terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay on frozen sections according to the manufacturer's instructions (in situ cell death detection kit AP, Roche). After labeling, frozen sections were counterstained with Mayer's Haemalaun (Merck Millipore) and mounted in aqueous mounting agent (Aquatex, Merck Millipore). The apoptotic positive cells were counted on the basis of 5 high power fields by slide (1,000 to 1,700 counted cells).

2.2.2.14 Hematoxylin, eosin and saffron (HES) staining

The amount of pigment in the liver tissue was assessed after section staining according to the standard hematoxylin, eosin and saffron protocol: frozen sections were air dried to the slides, stained with Mayer's Haemalaun solution (Merck Millipore), with alcoholic eosin Y (1%) and with alcoholic saffron (1%) and mounted in Coverquick 4000 (Labonord) mounting media. In order to quantify pigment content in the HES sections, 24 slides per treatment and time point were photographed under a Nikon Eclipse E600 microscope using an Olympus DP70 digital camera. Between 3 and 5 pictures were randomly taken along the slide, giving a total of 72 Red-Blue-Green pictures. Each picture has been imported into Ecognition Developer [version 8.7, Trimble Geospatial Imaging, Westminster, CO, USA]. We processed chessboard segmentation (1 pixel = 1 object) over the images. Then, using a 2-class typology (pigment or not), we manually defined a brightness threshold to discriminate between the two classes and classified the images according to this threshold. We rasterized the results of the classifications and estimated the proportion of each class.

2.2.2.15 Oil red O (ORO) staining

Frozen sections were stained with Oil red O to assess total lipid content according to the standard method: frozen sections were air dried to the slides, fixed for 20 minutes in 4% formaldehyde, rinsed with 60% isopropanol, stained with freshly-prepared Oil Red O (Sigma-Aldrich), rinsed with 60% isopropanol, counterstained with Mayer's Haemalaun (Merck Millipore) and mounted in aqueous mounting agent (Aquatex, Merck Millipore). In order to quantify lipid content, 21 slides per treatment and time point were photographed using the same system described above. Between 3 and 5 pictures were taken randomly along the slides, giving a total of 69 images. We processed image segmentation using Red, Green and Blue layer similarity and leaving the default sharpness and compactness parameters. The size object parameter was set to 10. Then, using a 2-class typology (lipid or not), we manually selected several training parcels for each class. We then ran an image classification using the nearest neighbouring algorithm. We rasterized the results of the classifications and estimated the proportion of each class.

2.2.2.16 Biliary cholesterol content

The gallbladders were weighed and thawed at room temperature and extracted twice with a 45% ethanol mixture. They were centrifuged for 5 min at 10,000 rpm and 100 μ L of supernatant was collected. 5 α -cholestane (Sigma-Aldrich) and 500 μ L of a KOH 5 M solution in methanol were added as an internal standard and as a saponification reagent, respectively. After a one hour reaction at 55° C, 500 μ L of water was added and NaCl was poured until saturation. Three mL of *n*-hexane were added and the mixture centrifuged for 5 min at 3,000 rpm. The *n*-hexane phase was removed and stored. Then 3 mL of diethylether was added for the second extraction. The samples were centrifuged for 5 min at 3,000 rpm and the diethylether phase was removed and combined to the *n*-hexane phase. *n*-hexane and diethylether were evaporated with nitrogen, and the samples were derivatized for 1 hour at 55°C with 50 μ L of 1% TMCS in BSTFA (Sigma-Aldrich) before being subjected to GC-MS analysis (Varian 320). The GC-MS parameters were as follows: injection temperature was 300° C in splitless mode; separation was performed on a DB-5MS column (Agilent) 30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m with Heat 1 mL.min⁻¹ as carrier gas and a temperature gradient from 240° C to 300° C at 20° C.min⁻¹; ion source and transfer line were heated at 250° C;

cholesterol and 5 α -cholestane were quantified in SIM mode using the following ions, 329 m/z and 217 m/z, respectively; confirmation ions for cholesterol were 458 m/z and 368 m/z, and 372 m/z and 357 m/z for 5 α -cholestane; The quantification limit for cholesterol was 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of bile.

2.2.2.17 Biliary BaP metabolite content

Total biliary metabolite content was determined by fluorescence (Beyer *et al.*, 2010). Forty-five percent ethanolic extracts obtained as described above, were diluted 10 and 100 times in 45% ethanol before fluorescence intensity measurement at $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 380/430$ nm (Aas *et al.*, 2000) using Varioskan flash (Thermoscientific). The quantity of BaP metabolites produced was expressed in $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ equivalent 3-hydroxy-benzo[*a*]pyrene (3-OHBaP, NCI Chemical Carcinogen Standard Repository) used herein as standard for quantification.

2.2.2.18 Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm standard error of the mean. Each value was derived from three individual experiments. Since the nature of the distribution of the results was unknown (Gaussian or not), the statistical significance between the means obtained for BaP-exposed *Xenopus* and the controls were assessed using the non-parametric Mann and Whitney's U test of significance ($p < 0.05$ was considered statistically significant).

2.2.2.19 Data access

Detailed transcription data for all genes detected by RNAseq in the present study are presented in an additional file (www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-15-666-S2.xlsx). RNAseq sequence data are available in the ArrayExpress database (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MTAB-2444.

2.2.3 Results

2.2.3.1 BaP uptake and metabolism

BaP clearance in the water was used as an indicator of the uptake kinetics in *Xenopus* (Figure 2.3). The observed decrease in BaP concentrations in the water indicated rapid trans-ttegumental uptake of the pollutant in the organism with a mean of 0.88 ± 1.14 μg per hour in the first 6 hours. From hour 6 to 12, the uptake rate dropped to 0.6 μg per hour. From hour 12 to the end of exposure, no further decrease in BaP concentration was observed and a residual concentration of approximately $1.6 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was measured, corresponding to 16% of the initial BaP concentration (Figure 2.3, yellow dots).

Hepatic BaP metabolism was evaluated by measuring total BaP metabolites content in the gall bladder (Figure 2.3, black dots). Benzo[*a*]pyrene metabolite concentrations in the gall bladder increased concomitantly with the depletion of BaP in the water. The liver metabolism rate drastically increased after 12 hours of exposure, which corresponds to the point of maximum BaP depletion from the water. The highest liver metabolism rate was observed from hour 18 to 24 post-exposure, with 65 ng of BaP metabolized per hour.

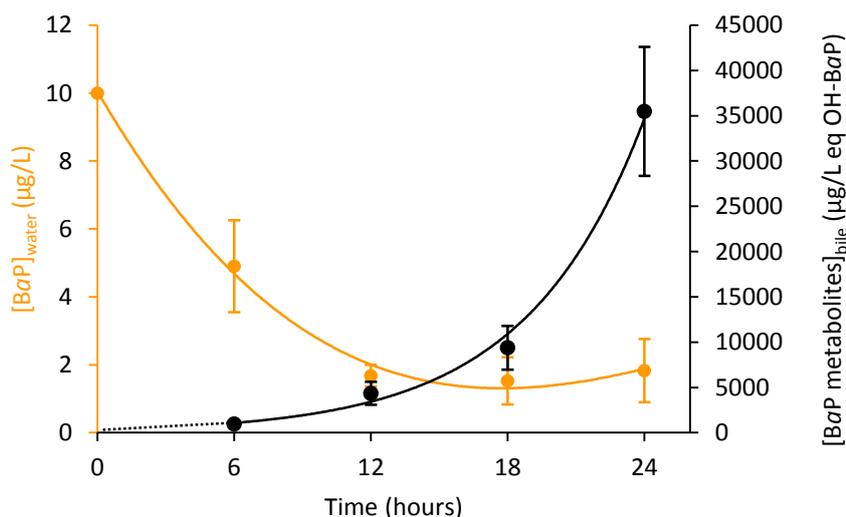


Figure 2.3: Kinetics of benzo[*a*]pyrene (BaP) concentrations in water (yellow curve) and metabolite concentrations in bile (black curve) as a function of exposure time during *Xenopus tropicalis* exposure. Values are mean \pm SE for 3 replicates.

2.2.3.2 Sequencing and mapping of cDNAs

By sequencing 8 cDNA libraries from non-exposed control and exposed *Xenopus* to $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP at hours 6, 12, 18 and 24, a mean of 35.1 million reads per library were sequenced. Approximately 80% of these reads were successfully mapped to the *Xenopus tropicalis* genome and a mean of 19.51 million of reads were mapped onto known genes at a single genomic location with no ambiguity (Figure 2.4.A). A total of 13,551 genes were represented by more than 20 reads across all libraries (Figure 2.4.B and additional file, <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-15-666-S2.xlsx>).

A	Control				BaP			
	6h	12h	18h	24h	6h	12h	18h	24h
Reads sequenced ($\times 10^6$)	34.9	33.6	36.2	36.7	35.4	33.6	35.4	35.1
Reads mapped to genome ($\times 10^6$)	28.6	27.0	30.2	30.7	28.5	27.5	28.0	28.3
(%)	(82.1)	(80.5)	(83.6)	(83.8)	(81.5)	(81.8)	(79.1)	(80.6)
Reads mapped to genes ($\times 10^6$)	19.8	18.2	20.5	21.2	19.5	18.7	18.7	19.5
(%)	(56.8)	(54.2)	(56.8)	(57.9)	(55.2)	(55.8)	(52.9)	(55.7)

B	6h	12h	18h	24h	Total
Total genes	13547	13534	13544	13545	13551
Differentially transcribed genes	86	179	56	58	308
Over-transcribed genes	32	163	27	19	223
Under-transcribed genes	54	16	29	39	120

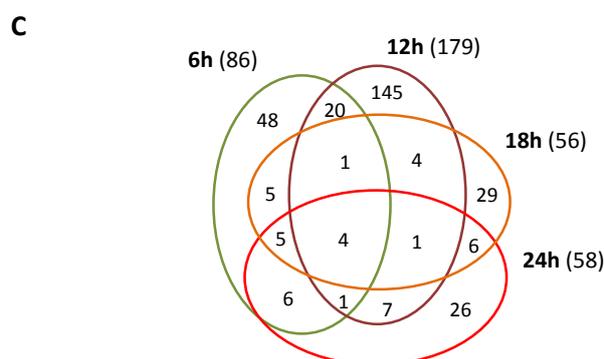


Figure 2.4: Sequencing and mapping statistics and differential transcription analysis. A. Sequencing and mapping statistics. **B.** Differential transcription analysis. **C.** Venn diagram showing the number of genes differentially transcribed at any given time point compared to the control. The total number of genes differentially transcribed at each time point is indicated in brackets.

An analysis of transcription levels from hour 6 to 24 identified 308 genes differentially expressed ($FDR < 0.05$) with a transcript ratio (TR) > 1.5 -fold in either direction at at least one time point during exposure (Figure 2.4.B and Annexe I). Excepted for hour 12 of exposure when the majority of genes were over-transcribed, the distribution of transcription ratios was well balanced between under- and over-transcription with most TRs being within a 5-fold variation in either direction. Interestingly, only four genes were consistently found to be differentially transcribed at the four time points considered, and an average of 5 genes were found consistently differentially transcribed at two or three time points with a maximum of 20 genes shared between hour 6 and 12 (Figure 2.4.C). Cross-validation of TRs from mRNA sequencing with real-time quantitative RT-qPCR at each point of exposure revealed a positive correlation between TRs obtained from these two techniques in over 10 genes studied ($R^2 = 0.89$ and $p < 0.001$) (Figure 2.5).

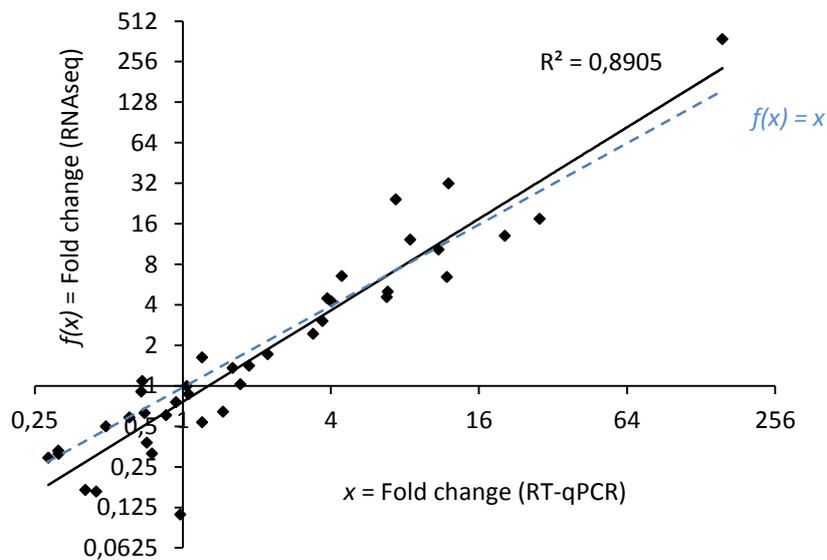


Figure 2.5: Quantitative real-time PCR validation of mRNAseq data. The correlation between mRNAseq and RT-qPCR data was performed on transcription ratios obtained at each time point for 10 transcripts showing a significant differential transcription in at least one time point of exposure. The blue dashed line represents an equal transcription ratio between both techniques.

2.2.3.3 Functional analysis of BaP regulated genes and their dynamics during exposure

Among the 308 genes differently transcribed at at least one time point during BaP exposure, 62 of them encoded proteins with unknown functions (Annexe I). Approximately 20% encoded proteins involved in “signalling/transport” and in “cell death/proliferation processes” (Figure 2.6). Around 29% were assigned to cell metabolism with 28, 16 and 26 genes involved in the metabolism of “lipids”, “carbohydrates” and “proteins”, respectively. Thirty-four, 18 and 10 genes encoded proteins involved in “cell structure”, “immunity” and “DNA interaction and repair”, respectively. Interestingly, only 12 genes encoded proteins involved in detoxification processes (Figure 2.6). In addition, the general transcription pattern clearly indicated over-transcription at 12 hours post-exposure regardless of the gene function considered (Figure 2.6).

However, a manual annotation only highlights the general functions associated with gene transcription, and does not identify the biochemical pathways in which proteins may be involved. An annotation enrichment analysis was therefore performed in order to determine whether the genes associated with KEGG pathways (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) were significantly over-represented in differentially transcribed genes. An initial assignment of the 308 *Xenopus* genes using their Ensembl identifiers yielded less than 6.7% of genes recognized by the functional annotation tool DAVID (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery). To compensate for the small number of directly attributed terms, the *Xenopus* genes detected in our study (13,357) were mapped against their closest human orthologs (Annexe I). After manual verification of each gene to check for similarity in terms of function and description, 78.4% of *Xenopus* genes had human orthologs (10,483) of which 10,322 (98.4%) matched with annotated DAVID gene objects. Among the genes found to be significantly differentially transcribed, 207 of the 246 with known descriptions (84%) matched with annotated DAVID gene objects. Annotation enrichment analyses performed on over-transcribed genes indicated a link between BaP treatment and “steroid biosynthesis”, “insulin signalling pathway”, “adipocytokines signalling pathway”, “glycolysis/gluconeogenesis” and “MAPK signalling pathways” (Table 2.2).

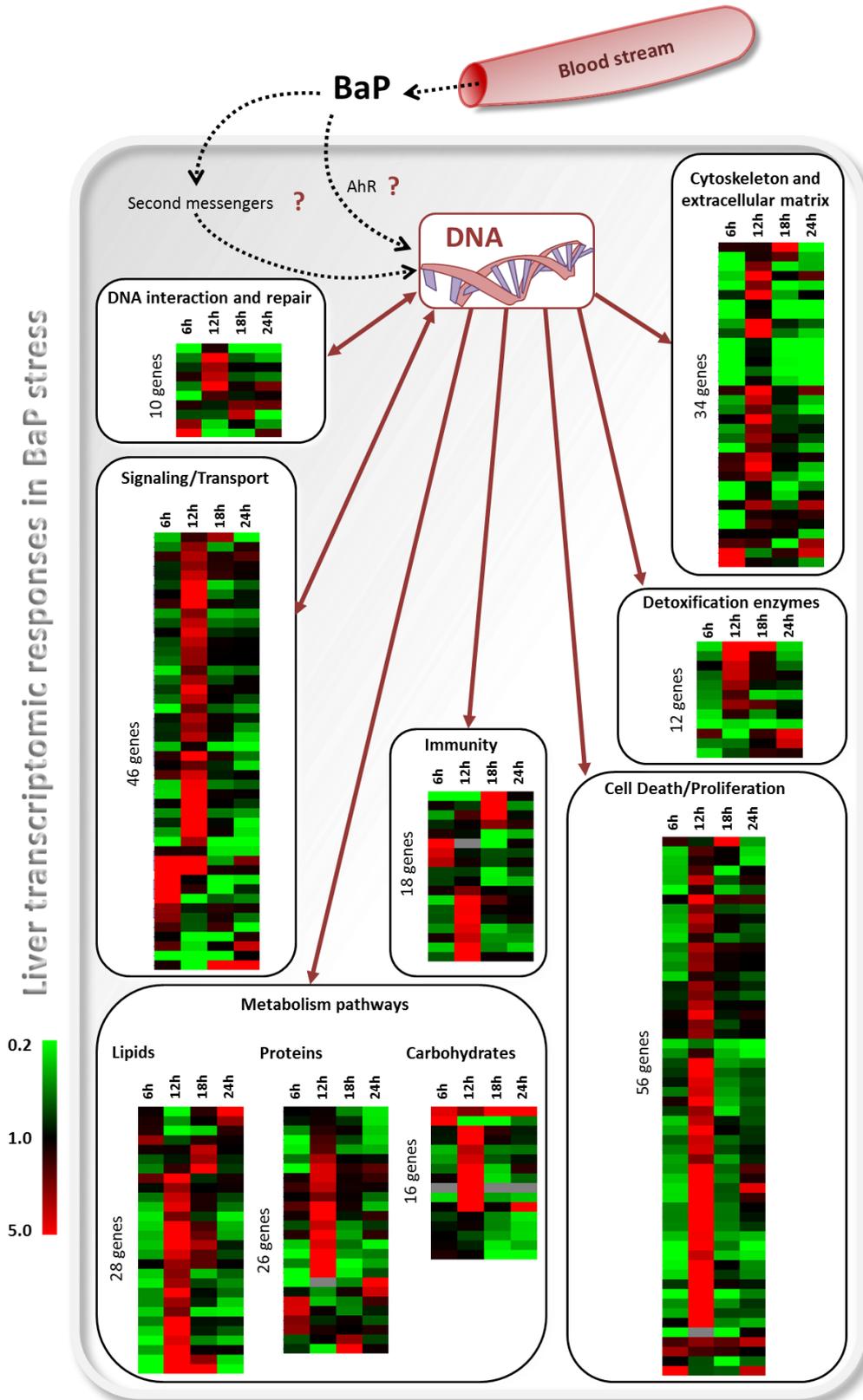


Figure 2.6: Map overview of significant changes in liver gene transcription in *Xenopus tropicalis* in response to BaP exposure. Genes have been manually assigned to general biological pathways. Color scale indicates transcription ratios relative to the control.

Interestingly, annotation enrichment analyses performed on under-transcribed-genes again indicated a link between BaP treatment and “steroid biosynthesis” pathways as well as “tight junction” pathways (Table 2.2).

Table 2.2: Pathway enrichment study based on genes differentially transcribed between control and BaP-exposed animals

	Kegg pathway	Number of genes	Fold enrichment	p-value*
UP	Steroid biosynthesis (cholesterol biosynthesis)	7	23.8	1.6E-07
	Insulin signaling pathway	7	3.1	2.3E-02
	Adipocytokine signaling pathway	5	5.0	1.6E-02
	MAPK signaling pathway	9	2.5	2.4E-02
	Glycolysis / Gluconeogenesis	4	4.5	5.0E-02
DOWN	Steroid biosynthesis (cholesterol biosynthesis)	4	27.8	3.3E-04
	Tight junction	6	5.3	4.6E-03

The 308 genes showing a significant differential transcription at least one time point were used for annotation enrichment using the DAVID (Database for Annotation, Visualisation and Integrated Discovery) functional annotation tool. *modified Fisher's exact test ($p < 0.05$). MAPK, mitogen-activated protein kinases.

2.2.3.4 Effects of BaP on the steroid biosynthesis pathway and lipid metabolism

The enrichment of KEGG “steroid biosynthesis” pathway concerned genes involved in cholesterol biosynthesis using acetyl-coA as a precursor [*farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1 (FDFT1)*, *squalene epoxidase (SQLE1)*, *lanosterol synthase (LSS)*, *cytochrome P450 51A1 (CYP51A1)*, *24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24)* and *7-dehydrocholesterol reductase (DHCR7)*]. The dichotomic link between BaP treatment and cholesterol biosynthesis is clearly characterized by two chronological phases of the transcriptional response (Figure 2.7.A). Genes involved in this pathway appeared over-transcribed at 12 and 18 hours post-exposure and under-transcribed at the first (6 hours) and last (24 hours) time points considered in the present study. Interestingly, this gene transcription time pattern was similarly detected for genes involved in cholesterol biosynthesis regulation [*insulin-induced gene 1*, *sterol regulatory element-binding transcription factor 2 (SREBP2)* and *hydroxyméthylglutaryl CoA-reductase (HMGCR)*] as well as in cholesterol depletion from the blood [*low density lipoprotein receptor (LDLR)*] (Figure 2.7.B).

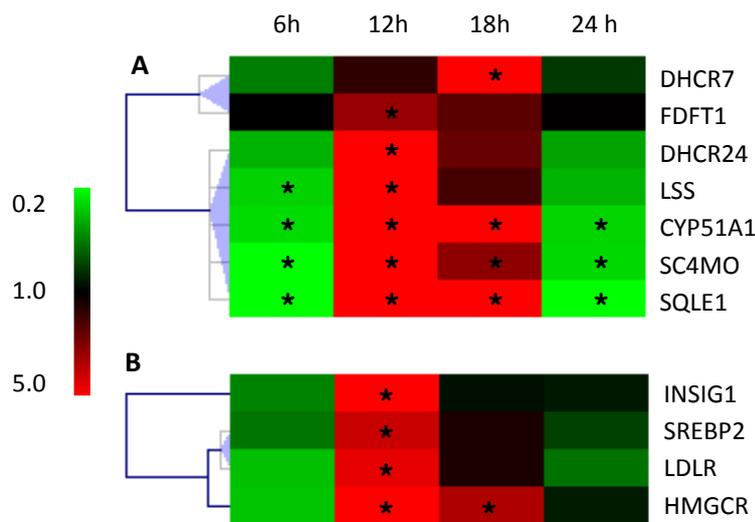


Figure 2.7: Hierarchical clustering of cholesterol biosynthesis genes (A) and cholesterol biosynthesis regulation and depletion from the blood (B) differentially transcribed compared to control. The color scale indicates transcription ratios relative to the control. Gene names are indicated. *DHCR7*, 7-dehydrocholesterol reductase; *FDFT1*, farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1; *DHCR24*, 24-dehydrocholesterol reductase; *LSS*, lanosterol synthase; *CYP51A1*, cytochrome P450 51A1; *SC4MO*, sterol-C4-methyl oxidase; *SQLE1*, squalene epoxidase; *INSIG1*, insulin induced gene 1; *SREBP2*, sterol regulatory element-binding transcription factor 2; *LDLR*, low density lipoprotein receptor. Stars indicate significant transcription variations (>1.5-fold in either direction and adjusted $p < 0.05$).

In the control animals, gall bladder cholesterol concentrations increased from $0.69 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to $3.73 \mu\text{g.mL}^{-1}$ during the first 18 hours and slightly decreased thereafter, reaching $3.50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ at 24 hours. Bile cholesterol concentrations in the BaP-exposed animals were 4 to 2.5-fold significantly lower than the controls at 18 and 24 hours post-exposure, respectively (Figure 2.8).

Histological data revealed that BaP induced an important accumulation of lipid droplets in the liver *i.e.* steatosis (Figure 2.9). In BaP-treated animals, a significant increase in hepatocyte lipid contents was observed from 6 to 18 hours post-exposure followed by a significant decrease at 24 hours. At hours 12 and 18 of exposure, hepatocyte lipid content was about 6-fold higher in BaP-treated animals compared to the controls (Figure 2.10).

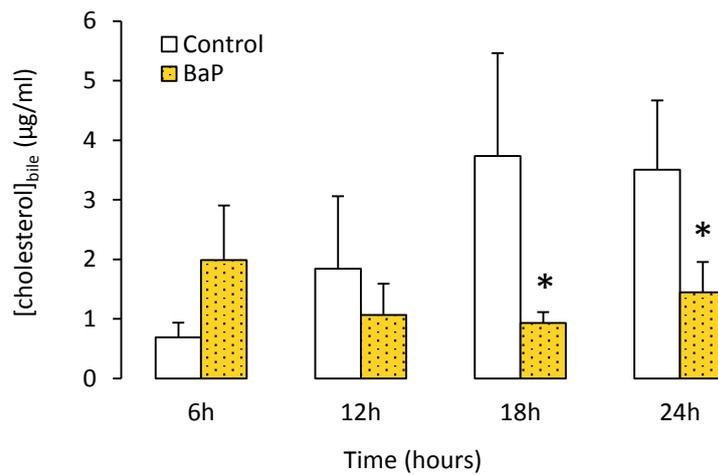


Figure 2.8: Kinetics of cholesterol concentration in bile. Data represent mean \pm SE values for 3 replicates. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test, asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$.

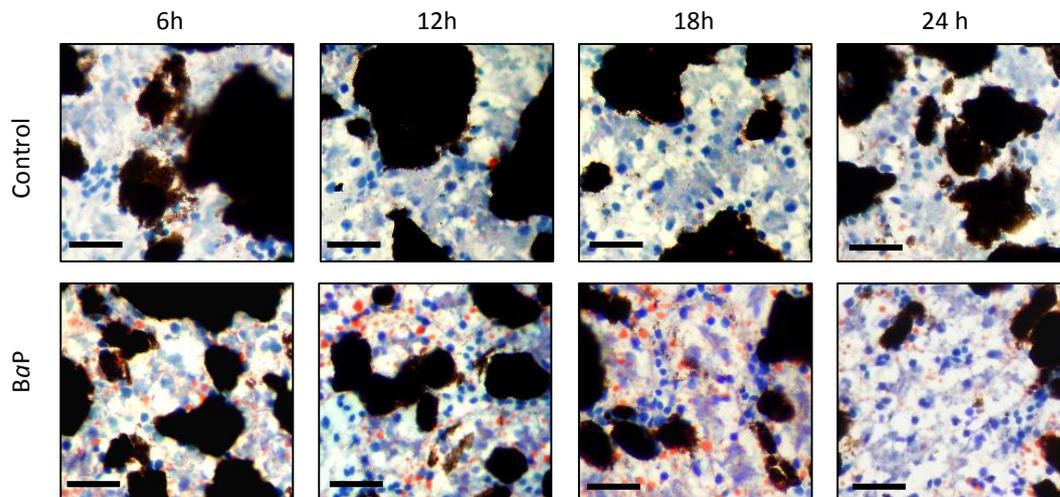


Figure 2.9: Oil red staining for total lipid content measures in the livers of control and BaP-exposed animals. Lipid content was indicated by red staining. Bars = 25 μ m.

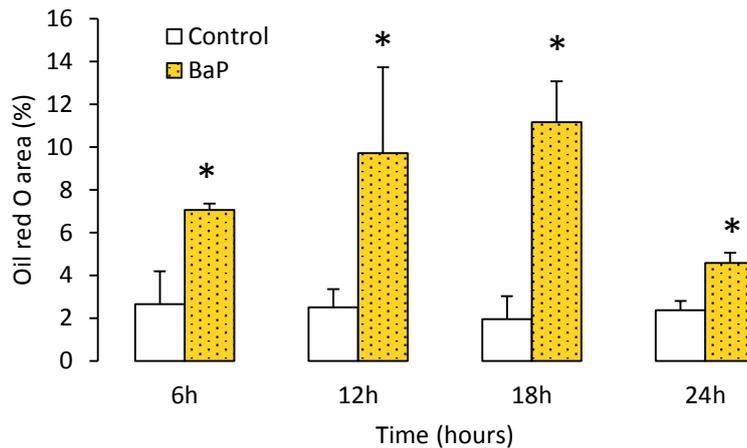


Figure 2.10: Percentage of oil red area in the livers of control and BaP-exposed animals. Data are mean \pm SE values for 24 sections replicates. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test ($n = 3$), and asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$.

2.2.3.5 Effects of BaP on glucose metabolism

More than 50% of the genes linked to “insulin signalling”, “adipocytokines signalling” and “glycolysis/gluconeogenesis” pathway enrichment were shared across these three pathways, suggesting that BaP strongly affects glucose metabolism. Interestingly, the genes involved in glycolysis/gluconeogenesis were over-transcribed, especially at 12 hours post-exposure, *phosphoenolpyruvate carboxykinase 1* (*PCK1*) excepted, which was significantly over-transcribed at 6, 18 and 24 hours post exposure (Figure 2.11).

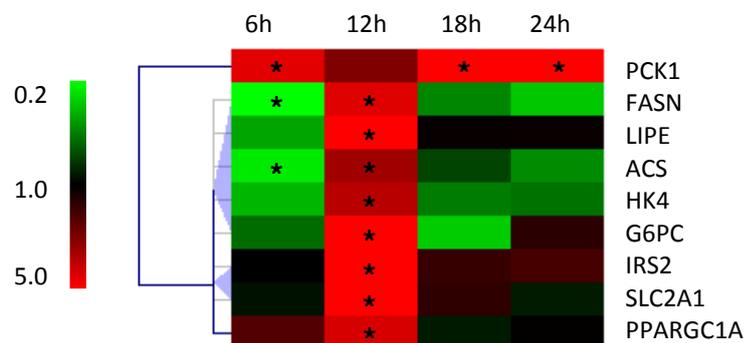


Figure 2.11: Hierarchical clustering of genes found to be differentially transcribed compared to the control and involved in insulin, adipocytokine and gluconeogenesis pathways. Color scale indicates transcription ratios relative to the control. Gene names are indicated. PCK1, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; FASN, fatty acid synthase; LIPE, lipase hormone-sensitive; ACS, acyl-CoA synthetase; HK4, hexokinase 4; G6PC, glucose-6-phosphatase; IRS2, insulin receptor substrate 2; SLC2A1, solute carrier family 2 (glucose transporter) member 1; PPARGC1A, peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha. Stars indicate significant transcription variations (>1.5-fold in either direction and adjusted $p < 0.05$).

Three genes involved in fatty acid and lipid metabolism and closely linked to carbohydrate metabolism were found to be over-transcribed at 12 hours post-exposure [*fatty acid synthase (FASN)*, *lipase hormone-sensitive (LIPE)* and *acyl-CoA synthetase (ACS)*] and two of them (*fatty acid* and *acyl-CoA synthetases*) were found to be under-transcribed at 6 hours post-exposure (Figure 2.11).

In addition, the monitoring of glucose concentrations in blood indicated a marked hyperglycaemia induced by BaP at 6, 12 and 18 hours post-exposure (Figure 2.12).

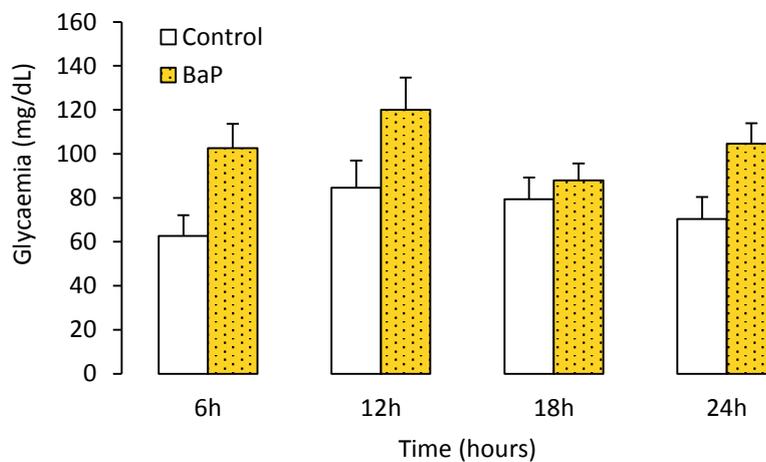


Figure 2.12: Glycaemia kinetics in control and in BaP-exposed *Xenopus tropicalis*. Data are expressed as mean \pm SE of 3 replicates.

2.2.3.6 Effects of BaP on the MAPK signalling pathway, hepatocyte apoptosis

Genes involved in the “MAPK signalling” pathway were found to be over-transcribed at 12 hours post-exposure. Only the *HPS701A* gene was also found to be significantly under-transcribed at 6 hours post-exposure (Figure 2.13.A). Since MAPKs are typically associated with cell apoptosis and proliferation, a clustering analysis was carried out on all the genes involved in these processes. The vast majority of genes involved in the apoptosis pathway (21 out of 23) appeared to be over-transcribed at at least one time point, with 91% overexpressed at 12 hours post-exposure (Figure 2.13.B).

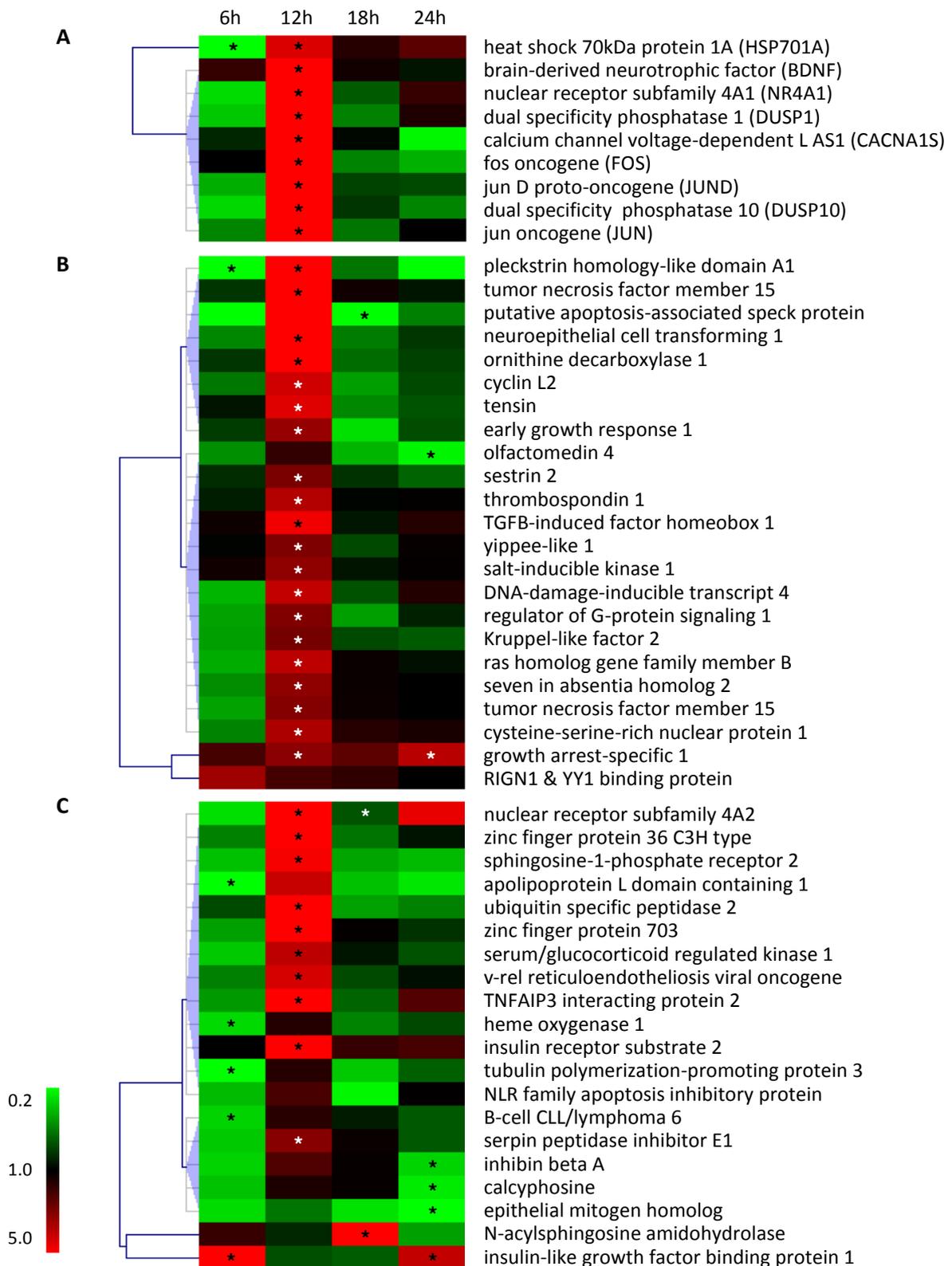


Figure 2.13: Hierarchical clustering of MAPK genes (A); of genes involved in apoptosis processes (B) and of genes involved in proliferation processes (C) found differentially transcribed compared to the control. Color scale indicates transcription ratios relative to the control. Gene names or annotations are indicated. Stars indicate significant transcription variations (>1.5-fold in either direction and adjusted p < 0.05).

For genes involved in proliferation processes, the expression pattern was more complex. About 50% of these were over-transcribed at 12 hours post-exposure, whereas 36% were found to be under-transcribed at 6 and 24 hours post-exposure (Figure 2.13.C).

The hepatocyte apoptosis was significantly higher in BaP-exposed *Xenopus* than in the controls at hours 12, 18 and 24 post-exposure. Apoptotic hepatocytes were absent or relatively rare in the controls, but their number significantly increased by 20-fold in exposed individuals at 24 hours post-exposure (Figure 2.14).

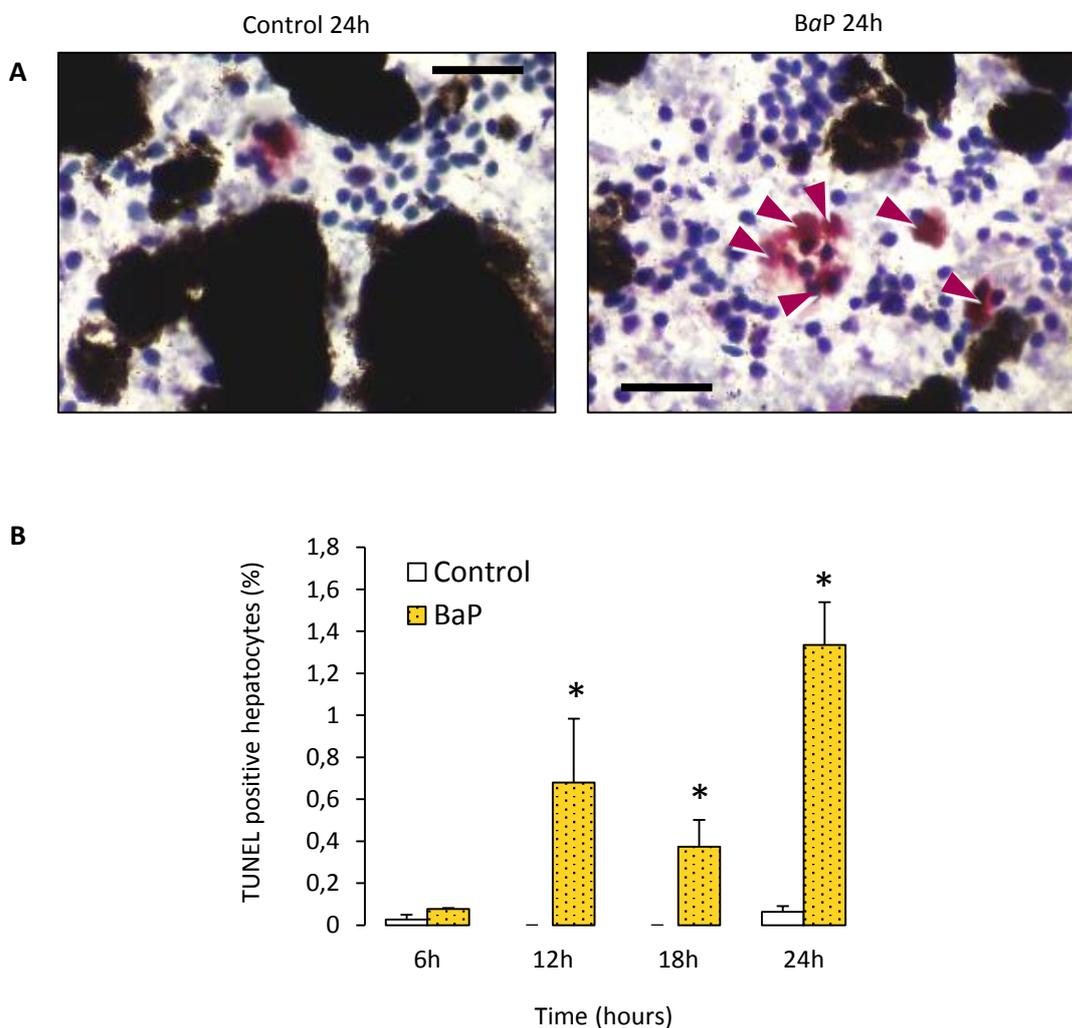


Figure 2.14: TUNEL staining detecting apoptosis-induced DNA damage in hepatocytes in control and in BaP-exposed animals at 24 hours (A). Arrows indicate apoptotic hepatocytes. Bars = 50 μ m. Percentage of TUNEL-positive nuclei in the livers of control and BaP-exposed animals according to the exposure time points (B). Data are mean \pm SE values for 21 sections replicates. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test, and asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$.

Liver pigment content is highly variable in amphibians, and its decrease is associated with hepatic stress and hepatocyte apoptosis. *Xenopus tropicalis* liver is highly pigmented with a maximal pigment area covering 55% to 80% of the tissue sections, as observed in the controls. In exposed *Xenopus*, BaP induced a marked decrease in liver pigment content from hours 12 to 24 post-exposure. Pigment areas were found to have decreased 3-fold at 18 hours post-exposure (Figure 2.15).

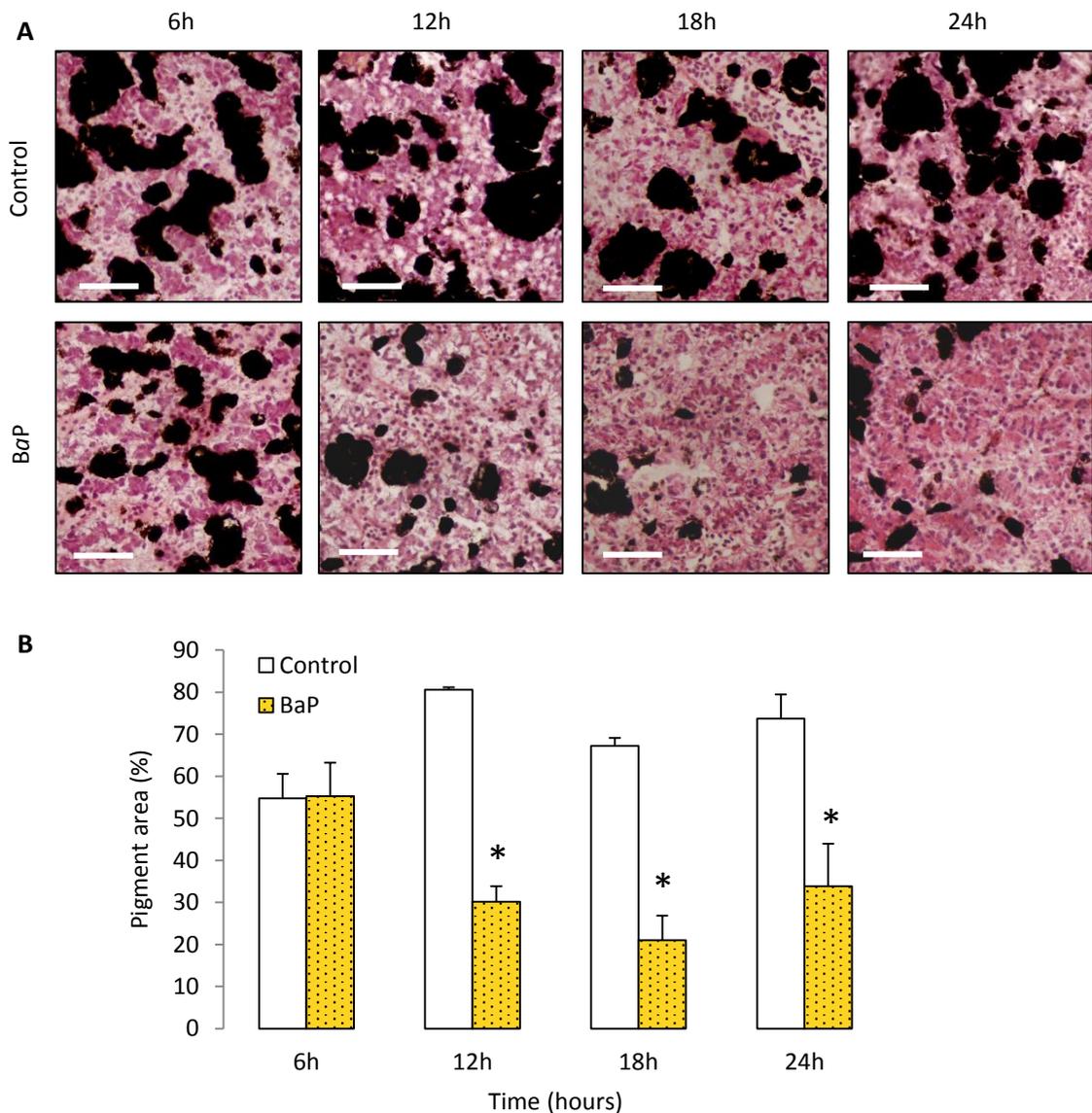


Figure 2.15: Hematoxylin-eosine-safran (HES) staining of liver sections from control and *Xenopus tropicalis* exposed to BaP (A). Bars = 100 μ m. Percentage of pigment area in liver sections of control and BaP exposed animals (B). Data are mean \pm SE values for 21 sections replicates. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test ($n = 3$), and asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$.

2.2.3.7 Effects of BaP on cell-cell interactions

The “tight junction” pathway appeared to be highly downregulated at all time points, except at 12 hours with the under-transcription of genes involved in interactions between claudins and actin [*myosin heavy chain 7 putative* (MYH7), *cold shock domain protein A* (CSDA), *myosin heavy chain 4* (MYH4), *myosin heavy chain 3* (MYH3), *actinin alpha 2* (ACTN2)] and in the transport of claudins to cell membranes (*RAB3B*). Interestingly, this phenomenon was concomitant with an under-transcription of *E-cadherin* (CDH1), a key protein involved in adherent junctions (Figure 2.16).

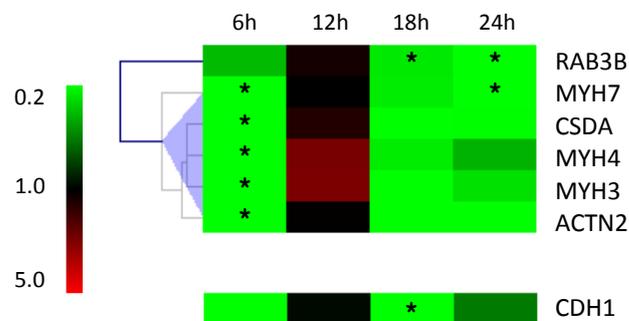


Figure 2.16: Hierarchical clustering of tight and adherent junction genes found differentially transcribed compared to control. Color scale indicates transcription ratios relative to the control. Gene names are indicated. Stars indicate significant transcription variations (>1.5-fold in either direction and corrected $p < 0.05$).

Histological examinations of samples stained with hematoxylin and eosin revealed that the hepatic tissue organization appeared to be destructured in BaP-treated animals. Under magnification, the liver tissue in exposed *Xenopus* displayed hepatocytes with fewer cell contacts and irregular shapes (Figure 2.17).

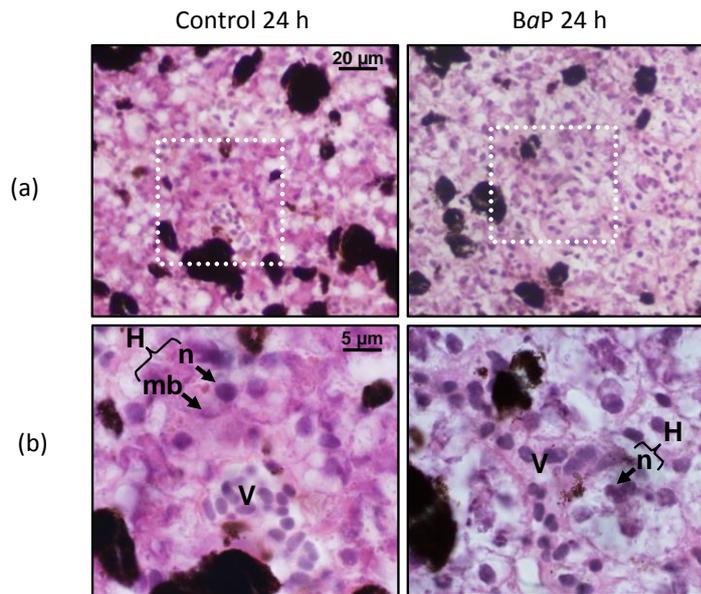


Figure 2.17: Hematoxylin-eosine-safran (HES) staining of liver sections from control and *Xenopus tropicalis* exposed to BaP showing histopathological changes in cell-cell contact in BaP-treated livers compared to control. (a) Sections shown in low magnification (100×). (b) High magnification (400×) of areas delimited by dashed line. H, hepatocyte; m, membrane; n, nucleus; v, vessel.

2.2.4 Discussion

Despite evidence suggesting that amphibians are very sensitive to pollutants (Hayes *et al.*, 2010), their role in the decline of amphibian populations remains unclear (Kaplan, 2009). In this study, we used the carcinogenic pollutant BaP to attempt to uncover any potential hidden toxic effects it may have on the liver tissue of the amphibian model *Xenopus tropicalis* under sub-lethal exposure. The concentration of BaP used in this study has been calculated based on previous studies on green frogs (Reynaud *et al.*, 2012) and the environmental concentrations of BaP likely to occur in highly-polluted sites where frogs are found (Brandt *et al.*, 2002; Matson *et al.*, 2005, 2009). Here, we emphasize the modulation of the transcriptome and liver cellular/physiological phenotype changes over a 24-hour exposure time period. This short-term exposure has been selected based on the results of previous studies on green frogs (Reynaud *et al.*, 2012) and in order to mimic acute exposure.

Recent *in vitro* studies have clearly illustrated the dynamic regulation occurring at the transcriptomic level during BaP exposure and the sequence of events leading to BaP toxicity (van Delft *et al.*, 2010). Similarly, our results highlighted remarkable variations in hepatic gene transcription during pollutant exposure, with major changes occurring at 12 hours post-exposure.

The rapid uptake of BaP from contaminated water and the early excretion of BaP metabolites into the bile observed in the *Xenopus* used in this study, testify to the active involvement of cohorts of specific oxidases, transferases and transport proteins necessary for BaP metabolism. However, none of the 308 genes differentially transcribed upon BaP exposure belonged to the “xenobiotic metabolism” pathway, such as *AbR*, *CY1A1*, *GSTM1* or *UGT1A1*. Moreover, genes associated with biotransformation pathways are known to be involved in the metabolism of endogenous compounds rather than xenobiotics. The induction of BaP metabolism enzymes has been previously shown to occur rapidly after pollutant exposure. In the hepatic cellular model HepG2 for instance, a rapid increase in the expression of genes involved in “Dioxin, xenobiotic metabolism” was observed to drop over the first 9 hours after exposure to 751 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of BaP (van Delft *et al.*, 2010). In fish exposed to a high concentration of BaP (5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), one of the main oxidases involved in phase I of the BaP metabolism process, encoded by the *CYP1A* gene, was over-transcribed immediately after BaP exposure with a high TR of ~ 46 , decreasing to 10 six hours post-exposure (Wang *et al.*, 2006). The lack of “xenobiotic metabolism” pathway genes in our data might be due to the low concentration of BaP applied to *Xenopus*, as well as the relatively long 6-hour period before sampling at the first experimental time point. Detecting immediate BaP metabolism in *Xenopus tropicalis* and early gene regulation by this PAH is therefore unfeasible. Our findings do, however, concur with previous studies on frogs showing rapid faecal elimination of BaP and a relatively good tolerance of this xenobiotic (Reynaud *et al.*, 2012). This further suggested that the classical molecular biomarkers of PAH exposure, such as CYP1A induction, may not be sufficient to highlight liver responses under short-term exposure at low concentrations.

It is widely known that the liver plays a key role in lipogenesis, gluconeogenesis and cholesterol metabolism. The associated metabolic pathways are closely regulated by insulin or adipocytokines (Bechmann *et al.*, 2012). In our study, a significant enrichment of insulin signalling, adipocytokine signalling, glycolysis/gluconeogenesis, steroid (cholesterol) biosynthesis, and MAPK signaling pathways was observed; this may relate to late

transcriptomic responses to BaP exposure in in vitro models (van Delft *et al.*, 2010). To date, the in vivo kinetics of mechanisms regulated by BaP exposure have not been investigated.

The pathways enriched must be considered as a whole and suggest that a possible insulin resistance-like (IR) phenotype occurs rapidly in *Xenopus tropicalis* exposed to BaP. Insulin resistance is characterized by an increase in the enzyme-coding transcripts involved in gluconeogenesis, like *phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK1)*, and by a sustained hyperglycemia (Bechmann *et al.*, 2012). Indeed, we found a marked over-transcription of the *PCK1* gene as early as 6 hours post-BaP-exposure, in addition to a marked hyperglycemia at hours 6, 12 and 24 post-exposure. These findings were confirmed by the over-transcription in BaP-exposed *Xenopus* of the *glucose-6 phosphatase (G6PC)* gene coding for a major gluconeogenic enzyme (Bechmann *et al.*, 2012) and of the glucose transporter *GLUT2* (Im *et al.*, 2005). Moreover, the high over-transcription we observed at 6 hours post-exposure for the *insulin-like growth factor 1 binding protein (IGFBP-1)* repressed by insulin in physiological conditions (Brismar *et al.*, 1994), indicated a marked responsiveness of cell receptors liable to early IR syndrome within a short exposure period. Another important physiological feature is the occurrence of liver steatosis, which is the direct consequence of triglyceride accumulation, observed at the earliest time point considered *i.e.* 6 hours of pollutant exposure. Liver steatosis is a well-known consequence of exposure to xenobiotics as evidenced in fish exposed to mercury or large concentrations of BaP (Brandt *et al.*, 2002; Ung *et al.*, 2010; Wills *et al.*, 2010). Moreover, liver steatosis has been shown to occur within a few hours of mammals or amphibians being subjected to chemical or hypoxic stress (Frangioni *et al.*, 2006; Yin *et al.*, 2007; Aroor *et al.*, 2010). More interestingly, steatosis was shown to be a symptom of IR (Bechmann *et al.*, 2012; Naik *et al.*, 2013). Based on our transcriptomic results, this phenomenon can be directly related to the under-transcription of *sulfotransferase 2B1 (SULT2B1)* at 6 hours post-BaP-exposure, an enzyme known to protect the liver from steatosis and to inhibit lipogenesis (Musso *et al.*, 2013).

In our study, the majority of hepatic genes modulated on BaP exposure led to a significant enrichment of steroid (cholesterol) biosynthesis, with a marked under-transcription at 6 and 24 hours, and over-transcription at 12 and 18 hours. Sustained hyperinsulinemia, a characteristic syndrome of IR, can promote the accumulation of liver cholesterol through the activation of the *sterol regulatory element binding transcription factor 2 (SREBP2)* (Naik *et al.*, 2013). Indeed, our results indicated a marked over-transcription of *SREBP2* 12 hours post-exposure leading to the over-transcription of *HMGCR* and *LDLR* involved in hepatic cholesterol

biosynthesis and cholesterol uptake from blood, respectively, at hours 12 and 18 post-exposure. This phenomenon has been previously demonstrated in mammals and frogs (DiCroce *et al.*, 1997; Musso *et al.*, 2013). Consequently, the genes involved in cholesterol biosynthesis with acetyl-CoA as a precursor were found to be upregulated. The induction of cholesterol biosynthesis has been previously suggested as a marker of liver toxicity from lead, but the underlying mechanisms have not been explored (Mudipalli, 2007). In addition, a previous study on mammals (Sokolović *et al.*, 2010) showed that fasting, as implemented in our experimental conditions, induced an increase in cholesterol output in the bile. This phenomenon was observed in the unexposed *Xenopus* from 6 to 18 hours after food was withdrawn. However, in exposed animals, a decrease in biliary cholesterol clearly indicated a disruption in cholesterol export through the gall bladder. Since hyperinsulinemia is known to induce a reduction in free cholesterol efflux into the bile (Naik *et al.*, 2013), this latter result reinforces our hypothesis that IR occurs and is one of the possible causal effects of the cholesterol metabolism disorder observed after 12 hours of exposure to BaP.

A major consequence of steatosis and cholesterol accumulation in the liver is the induction of hepatic apoptosis/necrosis. Hepatocellular accumulation of lipid droplets predisposes to the overproduction of reactive oxygen species (ROS), whereas cholesterol accumulation induces endoplasmic reticulum (ER) stress, ultimately leading to hepatocyte apoptosis/necrosis and autophagy (Bechmann *et al.*, 2012; Naik *et al.*, 2013). In our study, liver steatosis and the induction of the cholesterol biosynthesis and uptake pathways were accompanied by the induction of hepatocyte apoptosis, a loss in liver pigments and an induction of ROS scavenger enzyme coding gene expression, such as *catalase*. The amphibian livers are characterized by the presence of large quantities of pigments synthesized by melano-macrophagic cells. Pigment content in the liver is highly dynamic and varies according to natural (hibernation) or pathological (infections, *etc.*) conditions. A decrease in liver pigments has been previously associated with metabolic stress, apoptosis and autophagy (Barni *et al.*, 2002). Overall, our results indicated that the perturbation of lipid metabolism induced by BaP was responsible for lipotoxic phenomena including ER stress, ROS production and apoptosis. These results were confirmed by a high over-transcription of pro-apoptotic genes (*tumor protein p53 inducible nuclear protein* and *cyclin L2*) (Jiang *et al.*, 2006; Zhuo *et al.*, 2009) and the down-regulation of genes involved in tight and adherent junctions (Ung *et al.*, 2010). In the liver, the cohesion of parenchymal hepatocytes and biliary epithelial cells

is maintained by apical junctional complexes, such as tight and adherent junctions (Firinicieli *et al.*, 2013). The irregular shape and loose contact with neighbouring cells that were observed, corroborated by the down-regulation of junction-linked genes, could be attributed to the induction of apoptotic processes (Ung *et al.*, 2010).

Among the key proteins which regulate apoptosis/proliferation, MAPKs are closely linked to insulin signalling in the liver. Previous studies have described changes in the liver in response to insulin including glycolysis induction and MAPK–ERK signalling pathway leading to cell proliferation (Ribback *et al.*, 2013). However, the MAPK signalling pathway is classically defined as a key regulator of the cellular balance between apoptosis and proliferation (Seki *et al.*, 2012). Our results highlight the transcription of key oncogenes involved in cell proliferation (*FOS*) and apoptosis (*JUND*). These results suggest a possible balance between cell proliferation induced by hyperinsulinemia, and apoptosis induced by lipotoxicity and ER stress (Bechmann *et al.*, 2012; Naik *et al.*, 2013; Ribback *et al.*, 2013). However, since we did not observe any hepatocyte proliferation at the histological level, and given the measurement of *proliferative cell nuclear antigen* (*PCNA*) (data not shown), our results indicate that the pro-apoptotic branch of the MAPK pathway predominated in BaP-treated *Xenopus*.

The hypothesis for this study is that IR-like symptoms will develop rapidly in *Xenopus* exposed to BaP, affecting the metabolism of carbohydrates and fatty acids and thus leading further to liver steatosis with an apoptotic phenotype in hepatocytes. Cholesterol metabolism disruption is known to be associated with IR (Naik *et al.*, 2013), and our temporal study shows that this occurs posterior to the IR symptoms. As it is the case in mammals (Villa *et al.*, 2012), cholesterol metabolism in frogs is tightly regulated by oestrogens. More specifically, oestrogens induce an increase in hepatic cholesterol synthesis and uptake by activating *HMGCR* and *LDLR* gene transcription, allowing the lipidation of vitellogenin, which is involved in egg maturation (DiCroce *et al.*, 1997). Moreover, oestrogen receptor signalling is affected by *IGFBP-1* in a feedback loop (Villa *et al.*, 2012) and *Ahr* regulation (Swedenborg and Pongratz, 2010), the latter being involved in the disruption of oestrogen-induced vitellogenin synthesis in chicken and fish (Bugel *et al.*, 2013; Bussmann *et al.*, 2013). Steatosis and lipid metabolism disruption has also been associated with other, inter-connected, endocrine axes (Hazlehurst and Tomlinson, 2013). We thus hypothesized that the “outbreak of gene expression” observed at 12 hours post-exposure, associated with lipid and cholesterol metabolism, could also be explained by a disruption of the homeostatic mechanisms in other organs, and the result of a

multi-signal integration leading to a perceptible subsequent impact on the liver transcriptome. For example, an increase in the transcription of the *UGT2A1* gene encoding an enzyme responsible for oestrogen conjugation and elimination by the liver was observed (Chen *et al.*, 2005; Sneitz *et al.*, 2011), somewhat contradicting the observation of over-transcription of the *lipase hormone sensitive* gene encoding an esterase involved in the discharge of cholesterol for further use as a steroid precursor (Fernandez *et al.*, 2008).

The underlying mechanisms remain unclear and warrant further investigation. The marked induction of the hepatic cholesterol biosynthesis pathway triggered by B_aP may ultimately interfere with the oestrogen-regulated lipidation of vitellogenin. In the long term, such mechanisms may impair amphibian reproduction by disrupting oestrogen-controlled egg maturation.

2.2.5 Conclusions

This study provides initial insights into the hidden adverse effects of high environmental concentrations of B_aP on anurans, using *Xenopus tropicalis* as a biological model. Although decreased cholesterol in the bile and an increase in steatosis are known consequences of xenobiotic exposure, our kinetic approach and the use of mRNA sequencing revealed for the first time the sequential toxic effect mechanisms induced by PAHs. B_aP induced a marked metabolic disorder in the liver highlighted by an insulin resistance-like syndrome phenotype and hepatotoxicity due to impaired lipid metabolism (Figure 2.18). Although the concentration used in this study is likely to occur in highly-polluted sites where frogs live and reproduce, a 24-hour exposure is more characteristic of acute contamination. Additional studies concerning chronic exposure to commonly-occurring environmental concentrations of B_aP are needed to confirm the relevance of our results to in situ conditions. However, taken overall, our results strongly suggest that B_aP may disrupt carbohydrate and cholesterol metabolism, and more generally liver physiology as a whole, even after short-term exposure. In the long term, such mechanisms may impair amphibian physiology and reproduction by disrupting egg maturation and energy allocation for reproduction.

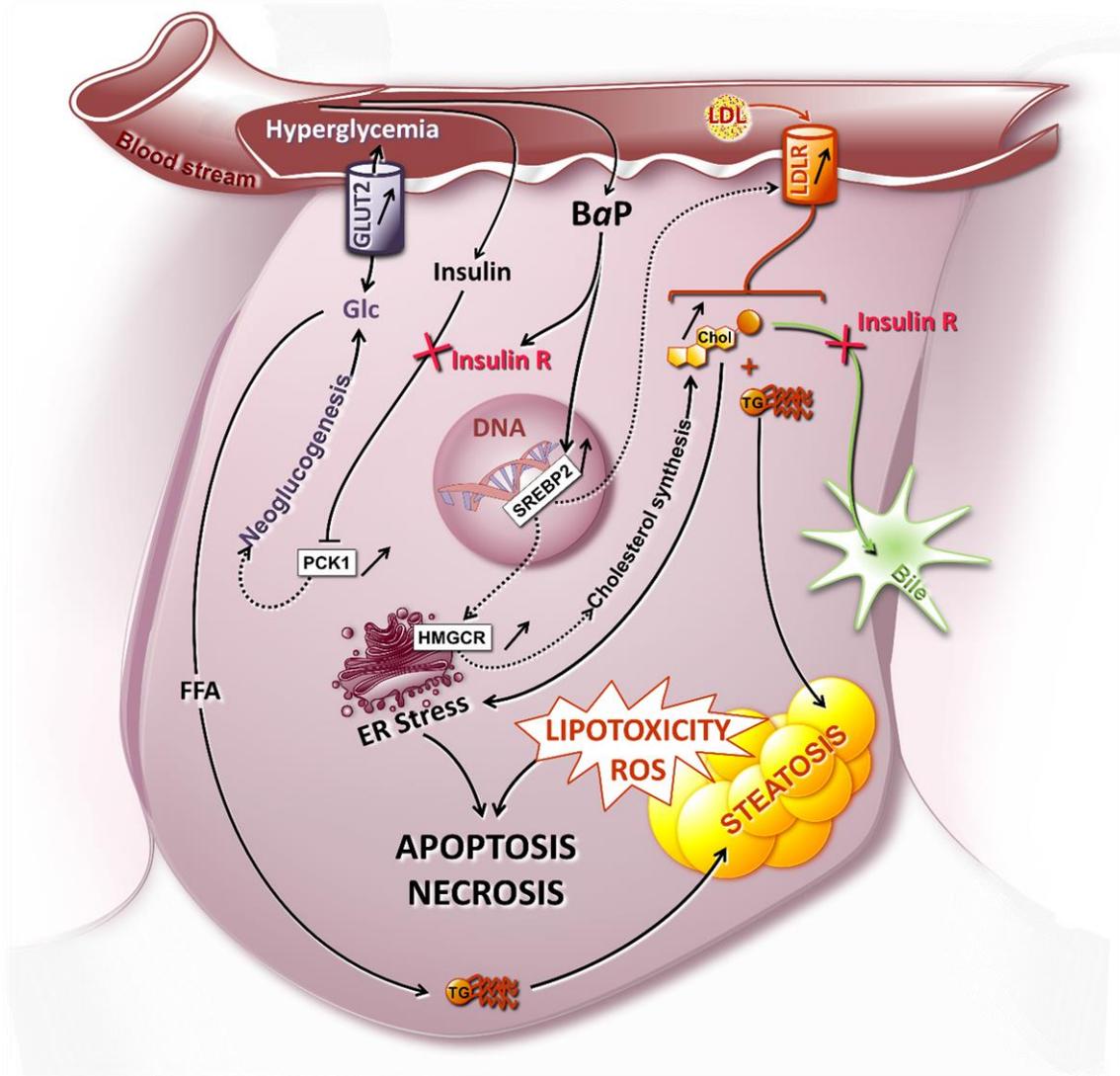


Figure 2.18: Cellular pathways potentially involved in *Xenopus tropicalis* hepatocyte responses to BaP exposure at sub-lethal concentration. This model, based on our transcriptome and liver phenotype dynamic analyses, suggests that BaP is responsible for the induction of an insulin-resistance-like phenotype in *Xenopus*. Insulin resistance is characterized by the over-transcription of gluconeogenic enzymes genes (*PCK1*), sustained hyperglycemia, an over-transcription of glucose transporter (*GLUT2*) and severe liver steatosis. Consequently, hyperinsulinemia may lead to the marked induction of cholesterol synthesis pathways and to a decrease in cholesterol export to the bile. The accumulation of lipids and cholesterol in the hepatocytes thus induces both ER stress and lipid toxicity leading to apoptosis or necrosis. Chol, cholesterol; ER, endoplasmic reticulum; FFA, free fatty acid; Glc, glucose; *GLUT2*, glucose transporter 2; *HMGCR*, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase; Insulin R, insulin resistance; *LDL*, low density lipoprotein; *LDLR*, low density lipoprotein receptor; *PCK1*, phosphoenolpyruvate carboxykinase 1; *SREBP2*, sterol regulatory element binding transcription factor 2; TG, triglycerides.

2.2.6 Abstract

Background: Despite numerous studies suggesting that amphibians are highly sensitive to cumulative anthropogenic stresses, the role pollutants play in the decline of amphibian populations remains unclear. Amongst the most common aquatic contaminants, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been shown to induce several adverse effects on amphibian species in the larval stages. Conversely, adults exposed to high concentrations of the ubiquitous PAH, benzo[*a*]pyrene (BaP), tolerate the compound thanks to their highly efficient hepatic detoxification mechanisms. Due to this apparent lack of toxic effect on adults, no studies have examined in depth the potential toxicological impact of PAH on the physiology of adult amphibian livers. This study sheds light on the hepatic responses of *Xenopus tropicalis* when exposed to high environmentally relevant concentrations of BaP, by combining a high throughput transcriptomic approach (mRNA deep sequencing) and a characterization of cellular and physiological modifications to the amphibian liver.

Results: Transcriptomic changes observed in BaP-exposed *Xenopus* were further characterized using a time-dependent enrichment analysis, which revealed the pollutant-dependent gene regulation of important biochemical pathways, such as cholesterol biosynthesis, insulin signaling, adipocytokines signaling, glycolysis/gluconeogenesis and MAPK signaling. These results were substantiated at the physiological level with the detection of a pronounced metabolic disorder resulting in a possible insulin resistance-like syndrome phenotype. Hepatotoxicity induced by lipid and cholesterol metabolism impairments was clearly identified in BaP-exposed individuals.

Conclusions: Our data suggested that BaP may disrupt overall liver physiology, and carbohydrate and cholesterol metabolism in particular, even after short-term exposure. These results are further discussed in terms of how this deregulation of liver physiology can lead to general metabolic impairment in amphibians chronically exposed to contaminants, thereby illustrating the role xenobiotics might play in the global decline in amphibian populations.

Keywords: RNA sequencing, *Xenopus*, Liver, Metabolic disorders, Insulin resistance-like syndrome, Benzo[*a*]pyrene.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. Authors' contributions CR performed histological manipulations, analyzed RNAseq data and helped to draft the manuscript. IAMW performed mRNAseq sample preparation and participated in writing the manuscript. COD performed RNA-seq data pre-processing, mapping and statistical analysis and helped to draft the manuscript. CML performed bioinformatics. SV performed histological manipulations. MLB and BC performed GC-MS analyses. AB helped in RNAseq sample preparation. JR performed histological image analyses. MR designed the study, participated in data analyses and participated in writing the manuscript. SR designed and coordinated the study, participated in data analysis and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

Isabelle Worms was the recipient of a fellowship from the Rhône-Alpes Region. This work was funded by a research grant from the Grenoble-Alps University and PEPS2012-CNRS. We also acknowledge funding from the federative structure Environmental and Systems Biology (BEeSy) of Grenoble – Alps University. We thank Dr. E. Coissac and Dr. F. Boyer for their help with data deposition. We thank Dr. JP Vert (Mines ParisTech) for his help with bioinformatics and statistics. We are grateful to the CC LBBE/PRABI for providing access to its computing resources and for the technical support provided. We thank Dr. B. Manship and Dr. I. Akhouary for the English language review of the manuscript. We thank Kim Barrett (Version Originale) for the English review of the revised manuscript.

2.3 Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[*a*]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*.

Christophe Regnault, John Willison, Sylvie Veyrenc, Antinéa Airieau, Patrick Méresse,
Marlène Fortier, Michel Fournier, Pauline Brousseau,
Muriel Raveton and Stéphane Reynaud.

Chemosphere 2016, 155:519-527

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653516305215>.

doi: 10.1016

2.3.1 Introduction

Dramatic declines in amphibian populations in wetlands have been described worldwide since the 1980s (Lips *et al.*, 2008), with current extinction rates reaching levels that are 211 times higher than background levels (Roelants *et al.*, 2007). It has been suggested that multiple pollution of wetlands plays a key role, together with other well-known threats including habitat loss, the introduction of exotic species, increased UV radiation, water acidification, emerging infectious diseases (Carey *et al.*, 1999; Blaustein and Bancroft, 2007; Hayes *et al.*, 2010). Some field studies using landscape-scale data have suggested that chemical contaminants may correlate with population decline in several amphibian species. Therefore, it was suggested that chemical contaminants were one of the key contributing factors responsible for altering amphibian population fitness (Fedorenkova *et al.*, 2012).

Among the environmental contaminants known for affecting amphibian fitness, endocrine disruptors (EDs) have been suggested as being the most heavily involved in the worldwide dramatic decline in populations (Kloas and Lutz, 2006). In amphibians, the larval period is a critical period for organ and sex differentiation, and exposure during this life-stage to hormonally active chemicals can disrupt organogenesis and gonadal differentiation (Helbing, 2012). Another sensitive phase is the breeding season, which may last for several

months and during which adult frogs may be exposed to water-borne chemicals at critical phases of egg and sperm maturation (Säfholm *et al.*, 2014). Due to this particular ecology, EDs have been extensively studied in amphibians for their capacity to interfere with tadpole development by disrupting the thyroid hormone axis (Crump *et al.*, 2002; Opitz *et al.*, 2005; Tietge *et al.*, 2005; Opitz, Hartmann, *et al.*, 2006; Opitz, Lutz, *et al.*, 2006; Jagnytsch *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006; Kashiwagi *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2014; Hammond *et al.*, 2015) and with reproductive function in adults by disrupting the sexual hormone axis (Hayes *et al.*, 2002; Mosconi *et al.*, 2002; Urbatzka *et al.*, 2006, 2007; Cevasco *et al.*, 2008; Hayes *et al.*, 2010, 2011; León-Olea *et al.*, 2014; Orton and Tyler, 2015).

In addition to these developmental and reproductive effects, there is also growing concern that metabolic disorders (Casals-Casas and Desvergne, 2011) and immune system disruption (Massart *et al.*, 2013; Bado-Nilles *et al.*, 2014) might be linked with EDs. Widely studied in mammals and humans, the potential involvement of EDs in metabolic disorders as a possible cause of fitness decrease in amphibians has been largely neglected. However, a recent study did demonstrate that acute exposure to benzo[*a*]pyrene (BaP) can induce marked metabolic disorders in female *Xenopus tropicalis* with an insulin resistance-like (IR) syndrome phenotype and hepatotoxicity due to impaired lipid metabolism (Regnault *et al.*, 2014). In the same way, although numerous studies have identified the immunotoxic properties of several contaminants in amphibians (Christin *et al.*, 2003; Gilbertson *et al.*, 2003; Hayes *et al.*, 2010), less is known about the immune mechanisms disrupted by EDs. Due to this lack of knowledge, the role sexual, metabolic or immune disruption plays as part of the effect EDs have on amphibians and their real impact on the decrease of amphibian fitness need to be studied in more detail.

Amongst the emerging EDs, triclosan (TCS) is currently found alongside EDs historically described in wetlands such as the very well-known BaP (Palmquist and Hanæus, 2005; McConnell and Sparling, 2010). Relatively little is known about the impact of TCS and BaP on amphibians. TCS affects larval behavior at high concentrations and has a negative effect on larval survivorship and development (Fraker and Smith, 2004; Smith and Burgett, 2005; Veldhoen *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2010). TCS is also found to decrease testosterone and vitellogenin plasma levels in *Xenopus* males (Matsumura *et al.*, 2005). BaP can induce hormonal/metabolic disturbances in amphibians through the impairment of liver physiology (Regnault *et al.*, 2014) and its immunotoxic properties have been fully described in aquatic

animals (Carlson *et al.*, 2004). Moreover, BaP and TCS (when metabolized into dioxin; (Matamoros *et al.*, 2008) are genotoxicants, which can affect sperm integrity, since spermatozoa lack DNA repair mechanisms (Devaux *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2011). Taken together these results suggest that TCS and BaP are ideal EDs for studying in detail the relative importance of sexual, metabolic or immune disruptions induced by hormonally-active contaminants in amphibians.

The objective of this study was to reveal *in vivo* responses in *Xenopus tropicalis* males exposed to environmentally relevant concentrations of BaP, TCS (10 µg.L⁻¹) or a mixture of both compounds (10 µg.L⁻¹ each) at the transcriptomic, cellular and physiological levels. Due to the dynamic nature of cellular responses, a kinetic approach was applied over a 24-hour exposure period by following the modulation of the transcription of key genes involved in metabolic, sexual and immunity processes and cellular changes in the liver, spleen and testis.

2.3.2 Experimental

2.3.2.1 Animals

Xenopus tropicalis males were purchased from the “*Xenopus* national husbandry” (CRB “Xenopes”, Rennes, France; <http://xenopus.univ-rennes1.fr/>). The frogs were fed daily *ad libitum* with pellets of trout food (INOVA-4.5mm; Coppens International). They were allowed to acclimatize for 3 weeks at 25°C with a photoperiod of 12:12 hours in constantly filtered water prior to starting the experiments. All experiments were performed in an animal house accredited by the French Ministry of Animal Welfare (n° B 38 421 10 001) and in accordance with EU laws and the recommendations of the ethics committee (ComEth Grenoble - C2EA - 12).

2.3.2.2 *Xenopus* exposure to benzo[*a*]pyrene (BaP) and triclosan (TCS)

Xenopus were exposed individually at 25 °C in 1 L glass jars protected from the light (4 individual replicates by time and exposure conditions). The exposure solutions consisted of 500 mL tap water (pH 7.8, organic carbon = 0.6 mg.L⁻¹, dissolved oxygen = 9.9 mg.L⁻¹, nitrate = 2.9 mg.L⁻¹, nitrites < 0.02 mg.L⁻¹) containing either BaP (97% purity, Sigma-

Aldrich, St-Louis, MO, USA) or TCS (97% purity, Sigma-Aldrich) at an initial concentration of $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ or a mixture of BaP and TCS at an initial concentration of $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ each. These concentrations were chosen to match the BaP or TCS concentrations usually found in highly-polluted waters or influent wastewaters, as used in previous experiments (McAvoy *et al.*, 2002; Dortch *et al.*, 2008; Reynaud *et al.*, 2012; Perez *et al.*, 2013; Regnault *et al.*, 2014). The control frogs were exposed to ethanol (vehicle) at 1/1000 (v:v) concentration. To avoid any circadian effects, the experiments using control and exposed animals were conducted in parallel. The frogs were not fed during the exposure period (from 0 to 24 hours) and frogs were collected at 12, 18 and 24 hours of exposure. The *Xenopus* were rapidly sacrificed with a blow to the head and immediately dissected to sample the skin, liver, gall bladder and testes. Blood was collected by means of an intra-cardiac puncture. These samples were kept in the optimum conditions for each of the experiments detailed below.

2.3.2.3 BaP and TCS extraction from water and HPLC analysis

At 12, 18 and 24 hours of *Xenopus* exposure, 50 mL of the remaining water was sampled and temporarily stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. The BaP and TCS was extracted using the method described in Regnault *et al.* (2014). As an internal standard 2.5 μg of fluoranthene (Sigma-Aldrich) was added to each water sample. Solutions were extracted once with a 15:85 (v:v) mixture of acetone/*n*-hexane and then twice with *n*-hexane (HPLC-grade, VWR). After dehydration by adding 2.5 g of Na_2SO_3 (Sigma-Aldrich), *n*-hexane phases were evaporated at $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Dried extracts were solubilized in 150 μL of acetonitrile (HPLC-grade, Roth) for the HPLC analyses.

HPLC measurements were carried out on a 1260 infinity LC system (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) equipped with a C18 column (Agilent Zorbax Eclipse PAH). The injection volume was 20 μL and the mobile phase consisted of a gradient of acetonitrile in H_2O with 0.1% of trifluoroacetic acid (HPLC-grade, Thermo Scientific) from 60% to 100% of acetonitrile at a flow rate of $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. TCS was detected using a diode array detector set to an absorption wavelength of 290 nm. BaP and fluoranthene were detected using a fluorescent detector ($\lambda_{\text{ex/em}} = 260/420 \text{ nm}$). The following retention times were determined for TCS (2 min), for BaP (14 min) and the internal standard fluoranthene (5 min). The extraction method is efficient at 99% for TCS, 96% for BaP and 97% for

fluoranthene. A TCS and a BaP solution (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ each) without *Xenopus* was processed as described above in order to validate the stability of TCS and BaP during the 24-hour time period under the same conditions (recovery of 99% and 97% respectively).

2.3.2.4 Biliary BaP and TCS metabolites content

The collected gall bladders were put into clean glass tubes, immediately flash frozen in liquid nitrogen, and conserved at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Afterwards, the gall bladders were thawed at room temperature, drilled, and the biliary volume was quantified (2 to 4 μL). The total biliary BaP-equivalent (BaP + metabolites) was determined by fluorescence as described by Regnault *et al.* (2014). The bile was then extracted twice with 1 mL of 75% ethanol (HPLC-grade, VWR) for fluorescence intensity measurement at $\lambda_{\text{ex/em}} = 380/430\text{ nm}$ (Varioskan flash, Thermoscientific). Afterwards, the ethanolic extracts were evaporated at room temperature overnight for GC-MS measurement of biliary TCS metabolite content.

To improve GC-MS detection, the samples were silylated. For this purpose, they were solubilized in 50 μL of acetonitrile and 100 μL of BSTFA-TCMS reagent (bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide/trimethylchlorosilane (99/1); Silyl 991, Macherey-Nagel). The reaction was carried out at $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min, followed by incubation at room temperature for at least 40 min. Thereafter, samples were centrifuged (10 min, $14\ 000 \times g$) and the supernatants were collected for analyses. GC-MS analysis was carried out on a HP6840/HP5973 device (Agilent Technologies, Les Ulis, France) equipped with a ZebronTM ZB-5MSi column (30 m, 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm film; Phenomenex). The injector was used in the split mode, with a split ratio of 50:1 and an injection volume of 2.5 μL . The oven temperature was held at $75\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min and then ramped up to $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $12\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, held 1 min and then ramped up to $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ at a rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ and held for a further 20 min. In order to detect TCS, the samples were analyzed in the SIM mode (dwelltime: 100 ms). The following SIM masses and retention times were used for standard TCS: m/z : 200, 345, 347, 360 and 362; t_{R} : 17.71 min. Calibration curves were established for TCS pure standards (Sigma-Aldrich).

2.3.2.5 RNA extraction and real-time quantitative RT-PCR

After dissection and for each *Xenopus*, the dorsal skin, the liver (same lobe/frog) and the same testicle were stored in RNAlater (Ambion – Life Technologies, Austin, USA) at 4 °C for 24 hours, and then at –80 °C. Afterwards, the total RNAs from 70 mg of skin, 25 mg of liver and one testicle were extracted using TRIzol RNA isolation reagent (Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, USA) according to the manufacturer's instructions. Two micrograms of total RNAs were treated with DNase I and used for cDNA synthesis with SuperScript III and oligo-dT₂₀ primer according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). The resulting cDNAs were diluted 100 times in DNases/RNases free water. Real-time quantitative PCR reactions were performed on the iQ5 system (Bio-Rad, Hercules, USA) using 15 µL total reaction volume with 0.3 µM of each primer, 7.5 µL of iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad) and 3 µL of cDNA diluted. The primers used for real-time quantitative PCR are listed in table 2.3. For each gene, real-time RT-PCR efficiency was estimated from a serial dilution of cDNA (10 to 10,000 times) and taken into account in the data analysis performed using the $\Delta\Delta CT$ method (Pfaffl, 2001; Regnault *et al.*, 2014). Three housekeeping genes encoding ribosomal proteins S7 (XB-GENE-977326), L8 (XB-GENE-482209) and L27 (XB-GENE-999331) were used for normalization. The results were expressed as the mean transcription ratio between xenobiotic exposed frogs and controls at each time point. The results were illustrated with heat maps produced with R (v.3.1.1) supplemented by gplots and RColorBrewer packages.

2.3.2.6 Measurements of blood glucose and alanine aminotransferase activity in the serum

Fresh blood sampled from each *Xenopus* was immediately deposited on Accu-Chek performa test strips (Roche Diagnostics, Meylan, France) to measure glycaemia.

Afterwards, the serum was obtained by fresh blood centrifugation (3000 × g for 10 min at 4 °C) and stored at –80 °C. Alanine aminotransferase (ALAT) activity was measured using 3 µL of pure *Xenopus* serum, according to the manufacturer's instructions (Alanine Aminotransferase Activity Assay Kit, Sigma-Aldrich).

Table 2.3 : Primer sequences used for RT-qPCR

Gene involved in biotransformation pathway				
Primer	Xenbase gene ID	Gene annotation	Sequence (5' to 3')	Annealing T°C
<i>CYP1A1</i>	XB-GENE-990173	Cytochrome P450 1A1	Forward: AGGTGGCATCGCTGTATC	55
			Reverse: ATGGTTGTGTAGTTTATCGTAGGG	
Genes involved in lipid metabolism				
Primer	Xenbase gene ID	Gene annotation	Sequence (5' to 3')	Annealing T°C
<i>SREBP2</i>	XB-GENE-1011360	Sterol regulatory element-binding protein 2	Forward: CTAACCACAATGCCAGTAATGATG	56
			Reverse: CTCCTCTCGCCTTCCTTCG	
<i>HMGCR</i>	XB-GENE-5840593	3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase	Forward: GGCTTGCTCTTCTGCTTGC	60
			Reverse: TCTCTGCTTCTTCTTCTG	
<i>LDLR</i>	XB-GENE-962372	Low density lipoprotein receptor	Forward: CTTGAATGGAGTTGACAGATACC	48
			Reverse: AATACAGGACAGAGAGTGAAGC	
Genes involved in insulin signaling pathway and glucose metabolism				
Primer	Xenbase gene ID	Gene annotation	Sequence (5' to 3')	Annealing T°C
<i>INSR</i>	XB-GENE-920733	Insulin receptor	Forward: TGCCAGACCCAGTGACAG	53
			Reverse: TAAGCCAGTGACCATTAGAGAC	
<i>IRS1</i>	XB-GENE-478672	Insulin receptor substrate 1	Forward: AGCCAAACCCCAATCAG	50
			Reverse: GTAGTAGGAGTAGAGGAGAAATGT	
<i>PPARGC1A</i>	XB-GENE-494718	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	Forward: GCACGATCAGGTCGAAGGTC	58
			Reverse: CGGTACTCTCCCTCTTCAGC	
<i>PCK1</i>	XB-GENE-1009230	Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	Forward: ATGCCGACCTGCCGTATG	60
			Reverse: TCACCACCTCACTCACAAC	
<i>G6PC</i>	XB-GENE-963989	Glucose-6-phosphatase, catalytic, 2	Forward: CAAGTTGTGGCTGGTGTATC	48
			Reverse: AGGAGGTGAGGAAGAGTGTAG	
<i>SREBP1c</i>	XB-GENE-987572	Sterol regulatory element binding protein 1c	Forward: TGTGTTCCCTCTGCCCCTC	58
			Reverse: GACCTCCAATGTGATTCTCC	
<i>GCK</i>	XB-GENE-981992	Glucokinase (hexokinase 4)	Forward: GCCCACCTATGTTCGTTCTAC	50
			Reverse: CCACTGCCCTTCCAATCC	
<i>FASN</i>	XB-GENE-1002983	Fatty acid synthase	Forward: CAGTTGGACTACATTGCTAC	58
			Reverse: GCGTTGGTTACAGTATTAGG	
<i>ALDOA</i>	XB-GENE-959791	Aldolase A, fructose-bisphosphate	Forward: TCACCCCGACGACAGAG	55
			Reverse: TCAACCTTAATGCCTACGACACC	
Genes involved in cell-cell interactions				
Primer	Xenbase gene ID	Gene annotation	Sequence (5' to 3')	Annealing T°C
<i>ACTN2</i>	XB-GENE-489122	Actinin, alpha 2	Forward: ATAAGCAAACAGACCAGCATTC	53
			Reverse: AGCAGCCACTCTTCATATCC	
<i>CDH3</i>	XB-GENE-482277	Cadherin 3	Forward: TGAGCAGAGGAAGCAGTATGTG	51
			Reverse: CAGTAGCAGTAGAGTTGGTAGC	
<i>CLDN3</i>	XB-GENE-972426	Claudin 3	Forward: TGGGAAGGACTATGGATGAAC	52
			Reverse: AGCACAGCAATGACAATGG	
<i>CLDN15.1</i>	XB-GENE-994817	Claudin 15, gene 1	Forward: GCGTTCAACATCACTAAG	53
			Reverse: GCTCCACCAACTATATCC	
<i>RAB3B</i>	XB-GENE-483427	RAB3B, member RAS oncogene family	Forward: TCGGCATAGACTTCAAGG	49
			Reverse: TCGCTGGTAATATCATAATC	
Gene involved in steroid hormones				
Primer	Xenbase gene ID	Gene annotation	Sequence (5' to 3')	Annealing T°C
<i>CYP19A1</i>	XB-GENE-953895	Aromatase	Forward: GAGCAACGACATTCCAAATC	52
			Reverse: TTCITCACATAGTAACCATCAATC	
<i>SRD5A1</i>	XB-GENE-1000046	Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1	Forward: GCTATGTTTATGGCTCTTATGG	51
			Reverse: CAATGACGGCACTTCCCTG	
<i>SRD5A2</i>	XB-GENE-940949	Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 2	Forward: TTGCCATTATTAGCGTTCTCTTC	48
			Reverse: GGATAAACCCAGCCATACTTTGC	
Genes involved in innate immune system				
Primer	Xenbase gene ID	Gene annotation	Sequence (5' to 3')	Annealing T°C
<i>CD40</i>	XB-GENE-5963241	CD40 molecule, TNF receptor superfamily member 5	Forward: GGAATGTTGAGTGCTGTGTC	58
			Reverse: AGAAGTGCTGGTTGCTGTTTG	
<i>CAMP1</i>	XB-GENE-1018352	Cathelicidin antimicrobial peptide 1	Forward: TCAGACCAGCAGAGAATC	54
			Reverse: AAGAACAATCAGCATCCG	
<i>MAG</i>	XB-GENE-6255400	Magainin	Forward: GGTGTATTACTTGCCTGTGTTT	48
			Reverse: GCCTCTCTGCTCTAATTTCC	
<i>LEVI</i>	XB-GENE-919720	Levitide	Forward: CTGTGTATTACTTGCCTGTGCTCTC	48
			Reverse: TTCTCGTTCAATCATCTCATCTGC	
<i>XT6L</i>	XB-GENE-6492155	Caerulein	Forward: GAGGAAATGAATGAACGAGTAGC	48
			Reverse: CATTAGGTCCATCAGCAAAGC	
Housekeeping genes				
Primer	Xenbase gene ID	Gene annotation	Sequence (5' to 3')	Annealing T°C
<i>RPL8</i>	XB-GENE-482209	Ribosomal protein L8	Forward: GCCACCGTTATCTCCCAATC	58
			Reverse: GACCACCAGCAACAACC	
<i>RPL27</i>	XB-GENE-999331	Ribosomal protein L27	Forward: GTTGTCTTGTCTTAGCAG	55
			Reverse: TGGCAGTCACCTTACGAG	
<i>RPS7</i>	XB-GENE-977326	Ribosomal protein S7	Forward: GGTATTTCCAGGCTCTCTTG	52
			Reverse: ACCACCTCCAACCTTCTATTTCC	

2.3.2.7 Histological observations with HE and ORO staining

After dissection, the rest of the liver and the second testicle were embedded in Tissue OCT (Labonord – VWR, Templemars, France), immediately flash frozen in liquid nitrogen, and conserved at -80°C . Transverse sections ($7\ \mu\text{m}$) were produced using a cryostat (CM3050 S, Leica, Nussloch, Germany) with the temperature of the cryochamber and specimen set at -25°C . Frozen sections were mounted on Super-Frost plus microscope slides (Labonord).

The frozen sections of liver and testis were air dried and stained with Mayer's Haemalaun solution (Sigma-Aldrich), with erythrosine (Sigma-Aldrich) and mounted in Coverquick 4000 (Labonord) mounting media. In order to assess the morphologic changes in the Hematoxylin/erythrosine (HE) sections, each slide (one per animal) was randomly photographed four times under a Nikon Eclipse E600 microscope using an Olympus DP70 digital camera.

The frozen sections of liver were stained with Oil Red O (ORO) to assess total lipid hepatic content according to the standard method: frozen sections were air dried and fixed for 20 min in 4% formaldehyde, rinsed with 60% isopropanol, stained with freshly-prepared ORO (Sigma-Aldrich), rinsed with 60% isopropanol, counterstained with Mayer's Haemalaun (Sigma-Aldrich) and mounted in aqueous mounting agent (Aquatex, Merck Millipore). In order to quantify lipid content, slides were photographed using the same system described above. Four pictures were taken randomly along the slides, giving a total of 192 images. Each picture was imported into the GNU Image Manipulation Program (GIMP v2.8.6). The hue-saturation tool was used to maximize lightness and minimize saturation of the primary color blue and green and the complementary color cyan. Conversely, the saturation of the primary color red and the complementary color yellow were set to the maximum. Subsequently, red pixels were selected using the select by color tool (threshold 70%) and the number of pixels in this active selection was quantified using the histogram dialog. The number of pixels in rhz background was estimated using the same dialog. The results were obtained as the mean proportion of red pixels on the background between exposed frogs and controls for each time point.

2.3.2.8 Assessment of splenocyte viability and phagocytosis activity

Splenocyte viability and phagocytic activity were measured, based on the protocol of Brousseau *et al.* (1999). Immediately after dissection and in sterile conditions, the spleen was gently crushed with a cell strainer in RPMI supplemented with HEPES (10 mmol.L⁻¹), penicillin/streptomycin (100 U.mL⁻¹ and 100 mg.ml⁻¹ respectively), and 10% fetal bovine serum and the splenocyte suspension was centrifuged 10 min (300 × *g*, 25 °C). Cell pellets were collected and resuspended in 3 mL of RPMI supplemented as described above. For each cell suspension, the number of cells and their viability were determined microscopically using the trypan blue dye exclusion method (Sigma-Aldrich). Cell concentrations were further adjusted for each suspension to 1 × 10⁵ cells in 500 µL RPMI with HEPES, penicillin/streptomycin and fetal bovine serum as previously described. The splenocyte suspensions were incubated for 14 hours at 25 °C with fluorescent carboxylate microspheres Fluoresbrite YG (1.75 µm diameter; Polysciences, Warrington, USA) at a 100:1 bead-to-cell ratio. After the incubation period, the cell suspensions were layered over 4 mL of RPMI supplemented with 3% bovine serum albumin and centrifuged at 150 × *g* (4 °C, 8 min) to remove the free beads adsorbed at the surface of the cell membranes. The cell pellets were resuspended and fixed in 0.5% formaldehyde in phosphate buffered saline (PBS). For each sample, a total of 10,000 events were acquired using a flow cytometer FACSCANTO II (Becton Dickinson, San Jose, USA). The phagocytic cell populations were gated according to their size and granularity defined in the forward light scatter (FSC, size, *y* axis) and side light scatter (SSC, granularity, *x* axis) plot. From this plot, yellow-green fluorescence emission frequency distribution histograms were obtained, which are directly linked to the splenocyte phagocytic activity. The fluorescence emission was collected at 488 nm and the bandwidth of emission wavelength was between 515 and 545 nm (FITC/Alexa488 channel). Data collection and analysis were performed using the FACSDiva software program (v6.1.3, Becton Dickinson). Three endpoints determined the percentage of splenocytes that engulfed one bead or more (phagocytic activity) or three beads or more, and five beads or more (phagocytic efficiency). The data were expressed as the percentage of cells that engulfed one bead or more, three beads and more, and five beads or more.

2.3.2.9 Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM in control and in exposed samples. The statistical significance between the means obtained for exposed *Xenopus* and the controls were assessed using the non-parametric Mann and Whitney's U test of significance ($p < 0.05$ was considered statistically significant).

2.3.3 Result and discussion

2.3.3.1 BaP and TCS uptake and metabolism

The trans-tegmental uptake of the pollutants in *Xenopus* was estimated from BaP and TCS clearance in the exposure water (Figure 2.19). Whatever the treatment considered, a rapid decrease in pollutant concentration was observed. Concerning the single-exposures, in the first 12 hours, BaP and TCS uptake rates were 0.77 ± 0.02 and 0.71 ± 0.04 μg per hour, respectively. Between 12 hours and 24 hours of exposure no decrease in the uptake rate was observed and the BaP and TCS residual concentrations were respectively 0.5 and 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (5% and 10% of the initial BaP and TCS concentration respectively). These results concord with previous studies on green frogs, *Xenopus* and fish indicating major fecal elimination of BaP and TCS (James *et al.*, 2012; Reynaud *et al.*, 2012; Regnault *et al.*, 2014). Interestingly after exposure to the mixture, a significant lower uptake rate of BaP was observed compared to the single exposure with an uptake rate of 0.64 ± 0.04 μg per hour in the first 12 hours (17% lower, Figure 2.19.A). The same trend was observed for exposure to TCS alone or in the mixture (Figure 2.19.B). It has been shown that the lipophilic constituents of a liquid mixture tend to partition into each other leading to a decrease in each other's solubility (Banerjee, 1984). Therefore, the mixture of ED might induce a temporary decrease in the solubility of BaP and TCS in the first hours leading to a decrease in their percutaneous passive partition/diffusion. Afterwards, with a re-equilibrium of concentrations as each ED is re-solubilized, the percutaneous absorption for the mixture at 24 hours was equivalent to single ED exposure.

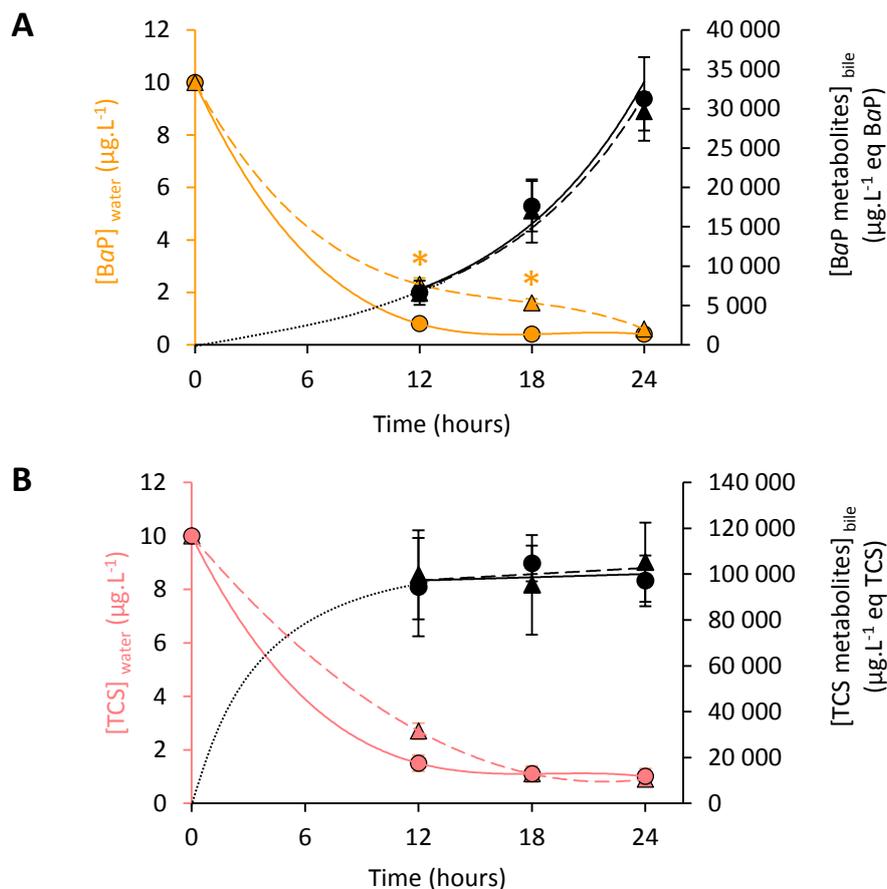


Figure 2.19: Kinetics of BaP (A) and TCS (B) concentrations in water (colored curve) and metabolite concentrations in bile (black curve) during *Xenopus tropicalis* exposure. The continuous curves (—●—) represent single ED exposure and the dotted curves (—▲—) the ED-mixture. Values are mean \pm SE for 4 replicates. The statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test ($n = 4$), and the asterisks indicate a significant difference between single exposure and mixture exposure: *, $p < 0.05$.

The liver metabolism of BaP and TCS was assessed by measuring total BaP and TCS metabolite content in the gall bladder (Figure 2.19). Biliary BaP and TCS equivalent contents were not different between single compound-exposure or exposure to the mixture. These results suggest that a decrease in pollutant concentration in animals has no effect on depuration rates as has been previously described in amphibians (Garrigues *et al.*, 2004). Concentrations of BaP metabolites increased concomitantly with the clearance of xenobiotics in the exposure water. Hepatic metabolism of BaP significantly increased after 12 hours of exposure, when BaP depletion from the water was maximal. Conversely, concentrations of TCS metabolites in the gall bladder were maximal from 12 hours of exposure suggesting a higher hepatic metabolization of this compound compared to BaP.

2.3.3.2 Effects of BaP, TCS and the mixture on the insulin signaling pathway and on the interactions between glucose and lipid metabolism

The liver is the center of crucial metabolic pathways such as lipogenesis, gluconeogenesis or cholesterol metabolism which are regulated by insulin or adipocytokines. In order to assess the impact of the xenobiotics on the insulin signaling pathway and glucose metabolism, the transcription of nine genes was studied (Figure 2.20.A). The *insulin receptor* (*INSR*) and the *insulin receptor substrate 1* (*IRS1*) genes which encode proteins transmitting signals from the insulin to intracellular pathways were found to be over-transcribed during all treatments suggesting a marked activation of insulin signaling in the liver. However, we found a marked over-transcription of the two gluconeogenic *PCK1* and *G6PC* genes at each time and for each pollutant exposure together with a moderate increase in glycaemia in the treated groups at 12 hours post exposure (Figure 2.20.B). Our data also suggested that induction of the gluconeogenic genes is a result of increased transcription of *PPARGC1A* as early as 12 hours of exposure. *PPARGC1A* is known to coactive many transcription factors like *FOXO1* in order to regulate downstream gluconeogenic target genes including *PCK1* and *G6PC* (Puigserver *et al.*, 2003). Taken together, these results are consistent with previous studies performed with BaP and female *Xenopus* (Regnault *et al.*, 2014) and confirmed the induction of an IR syndrome under BaP and also under TCS exposure. Indeed, the activation of the transcription of key genes involved in insulin signaling as *INSR* and the *IRS1* by both compounds and the mixture indicated a possible defect in insulin signaling. These results confirm that EDs should also be considered as metabolic disruptors (Casals-Casas and Desvergne, 2011).

After 12 hours of exposure, *PPARGC1A* transcription decreased for all the treatments considered (Figure 2.20.A). It has been shown that *PPARGC1A* deficiency results in enhanced lipogenesis and hepatic steatosis in mice (Yoneda *et al.*, 2008; Cantó and Auwerx, 2009) which was also consistent with the steatosis observed in this study (Figure 2.21.A). Moreover, the severity of the steatosis observed in *Xenopus* exposed to the mixture was directly linked to the high down regulation of *PPARGC1A* gene.

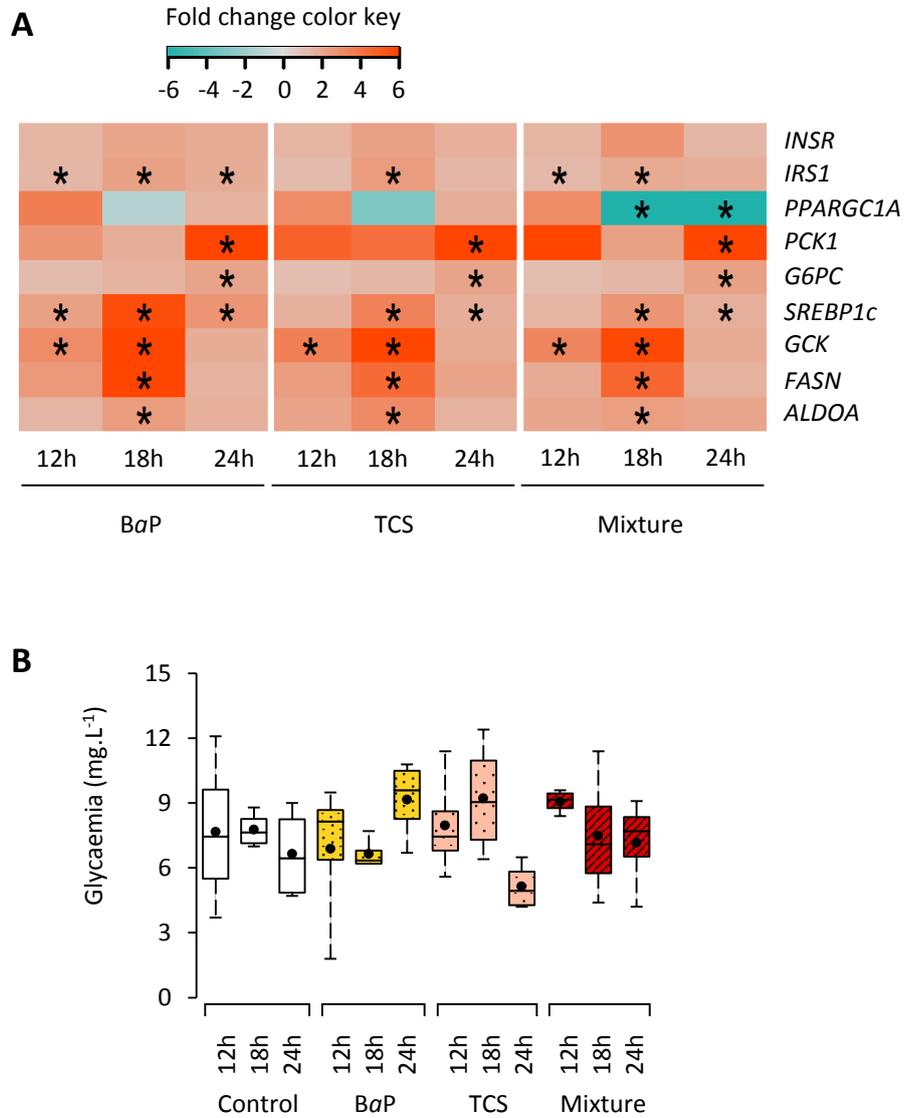


Figure 2.20: Carbohydrate metabolism disturbances induced by BaP and TCS. A. Transcription of genes involved in the insulin signaling pathway and glucose metabolism. The color scale indicates transcription ratios relative to the controls. **B.** Glycaemia kinetics in control and exposed *Xenopus tropicalis*. Data are mean (dot) for 4 replicates with whiskers from minimum to maximum. The statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test ($n = 4$), and the asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$.

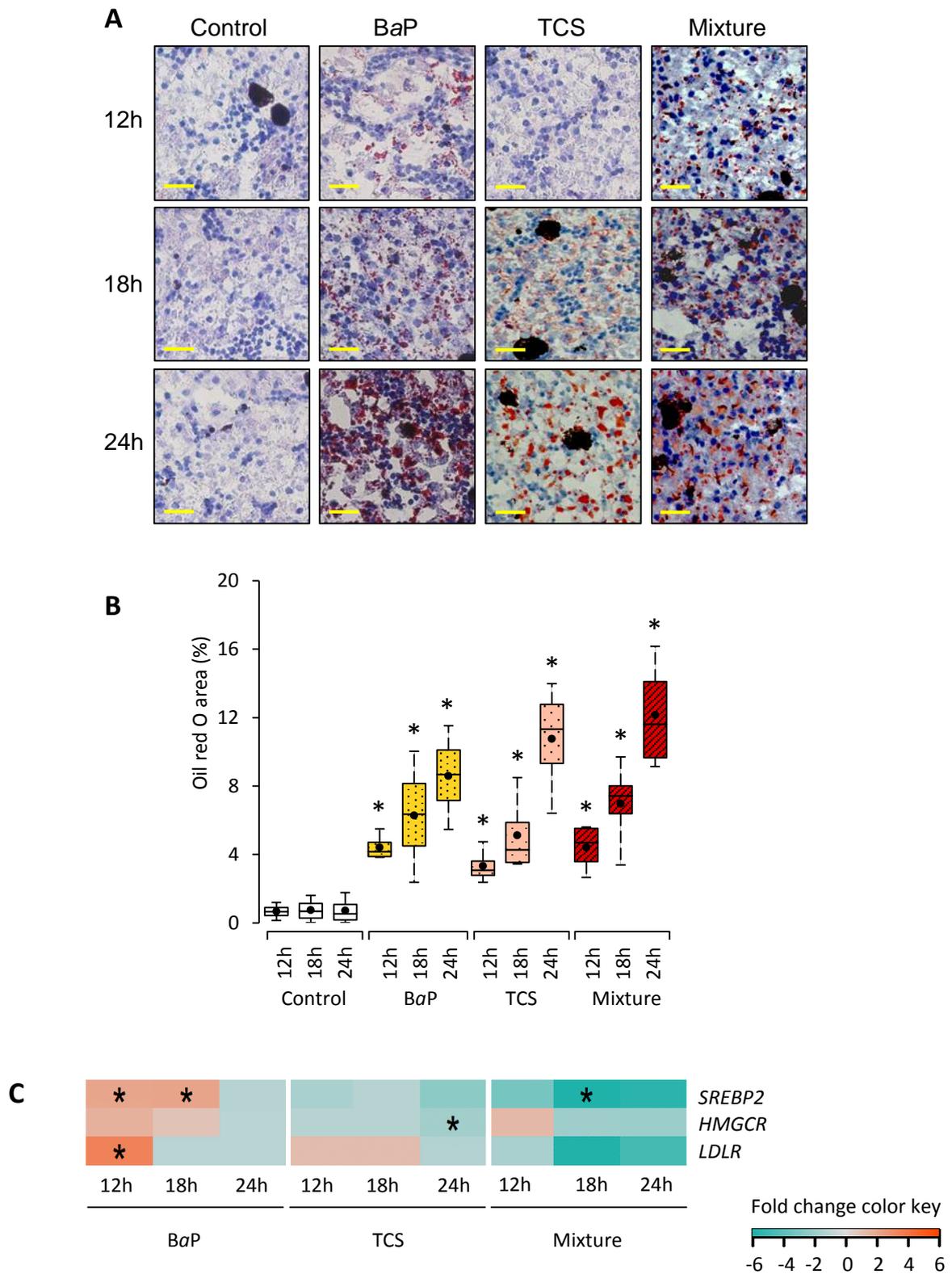


Figure 2.21: Lipid metabolism disorder induced by BaP and TCS. A. Oil Red O staining for total lipid content measured in the livers of control and exposed animals. Lipid content was indicated by red staining. Bars = 25 μ m. **B.** Percentage of Oil Red O area in the livers of control and exposed animals. Data are mean (dot) for 16 section replicates with whiskers from minimum to maximum. **C.** Transcription of genes involved in cholesterol biosynthesis regulation. The color scale indicates transcription ratios relative to the controls. The statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test ($n = 4$), and the asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$.

These results also suggest that a close phenotype with characteristics similar to non-alcoholic fatty disease (NAFLD) may appear rapidly in *Xenopus* males exposed to BaP, TCS and the mixture of the two compounds. The pathological spectrum of NAFLD includes a series of interconnected clinical syndromes of liver injury, ranging from benign steatosis to the malignant non-alcoholic steatohepatitis (NASH) which can degenerate into fibrosis, cirrhosis, and eventually to hepatocellular carcinoma (Arciello *et al.*, 2013).

In addition, the *glucokinase* (*GCK*) gene which encodes the flux controlling enzyme for glycolysis and glycogen synthesis and the *fatty-acid synthase* (*FASN*) gene were over-transcribed during the 24 hours post exposure for all treatments (Figure 2.20.A). Moreover the *sterol regulatory element-binding protein 1* (*SREBP1c*) gene which is a transcription factor regulating *GCK* and *FASN* genes was also over-transcribed during all treatments (Hansmannel *et al.*, 2006). Finally, the *aldolase A* (*ALDOA*) gene which links the glycolysis metabolic pathway and the triglyceride biosynthesis pathway via glycerol was over-transcribed at each time point and for all exposures (Figure 2.20.A). It is well-known that hyperglycaemia induces insulin secretion resulting in the transcription of *SREBP1c* and *GCK* (Azzout-Marniche *et al.*, 2000; Hansmannel *et al.*, 2006). In NAFLD, *SREBP1c* over-transcription results in an increase in *FASN* transcription and the excess storage of triglycerides (TG) (Bitter *et al.*, 2015). The activation of *GCK* transcription is concomitant to the over-transcription of *ALDOA* that breaks down *fructose 1,6-diphosphate* into *glyceraldehyde 3-phosphate* and *dihydroxyacetone phosphate* (Pinto *et al.*, 1969; Brunengraber *et al.*, 2003; Mirhaghparast *et al.*, 2015) which are point of entry from glycolysis metabolic pathway (*via* the glycerol) into pathways for triglyceride biosynthesis (Hajra *et al.*, 2000). These results indicate that in the early hours of exposure to BaP, TCS and the mixture of the two, glucose is engaged in the glycolysis pathway and in the synthesis of TG derived from glycerol and free fatty acids. The direct consequence of triglyceride accumulation is the onset of liver steatosis observed at the earliest ED exposure time points.

Indeed, the histological data revealed that BaP and TCS induced a significant increase in hepatocyte lipid droplet content (Figure 2.21.A). This steatosis was observed from 12 hours post exposure to BaP and to the mixture and from 18 hours post TCS exposure. At 12 hours post exposure to BaP and the mixture, hepatocyte lipid content was about 7-fold higher in treated animals compared to the controls (Figure 2.21.B). At 18 hours post BaP, TCS and mixture exposure, the hepatocyte lipid content was respectively about 8-, 7- and 9-fold higher compared to the controls and increased until the end of exposure reaching respectively 11-,

14- and 16-fold change compared to the control levels (Figure 2.21.B). Steatosis is considered as the first step in disease progression towards NASH (Caballero *et al.*, 2009). Three genes involved in cholesterol biosynthesis regulation (*sterol regulatory element-binding protein 2*; *SREBP2* and *hydroxymethylglutaryl-CoA reductase*; *HMGCR*) as well as in cholesterol depletion from the blood (*Low-density lipoprotein receptor*; *LDLR*) were chosen to assess cholesterol metabolism impairment (Figure 2.21.C; Regnault *et al.*, 2014). The *SREBP2* gene was significantly over-transcribed at 12 hours and 18 hours post BaP exposure and under-transcribed when exposed to the mixture. The *HMGCR* gene was over-transcribed at 12 hours post BaP exposure and significantly under-transcribed at 24 hours post TCS exposure. The *LDLR* was significantly over-transcribed at 12 hours post BaP exposure and under-transcribed at 18 hours and 24 hours post mixture exposure (Figure 2.21.C). These findings confirmed the significant enrichment of cholesterol biosynthesis pathway in *Xenopus* females exposed to BaP (Regnault *et al.*, 2014). *SREBP2* is described as elevated in hyperinsulinemia and the cholesterol accumulation to the progression of NAFLD to NASH (Caballero *et al.*, 2009; Naik *et al.*, 2013). Interestingly, exposure to TCS and the mixture reduced the transcription of the genes involved in cholesterol metabolism, suggesting that TCS is responsible for the effects observed in *Xenopus* treated with both compounds. These results were consistent with the high TCS metabolism by liver after both single-compound and mixture exposure (Figure 2.19.B) and suggested that the steatosis observed for all treatments is the consequence of TG rather cholesterol accumulation in liver.

2.3.3.3 Effects of BaP, TCS and the mixture on cell-cell interactions

As a consequence of previous observations, the effects of ED exposure on tissue integrity were analyzed. The transcription of five genes involved in cell-cell interactions was studied (Figure 2.22.A). The *claudin 3* (*CLDN3*), *claudin 15.1* (*CLDN15.1*) and *actinin alpha 2* (*ACTN2*) involved in the tight junctions were found to be under-transcribed during exposure. *ACTN2* was significantly under-transcribed at 18 hours post BaP and mixture exposure and at 24 hours post BaP, TCS and mixture exposure. *Ras-related protein Rab-3B* (*RAB3B*), a gene encoding the protein involved in transporting claudin to the membrane was significantly over-transcribed at 12 hours and 18 hours post BaP, TCS and mixture exposure and at 24 hours post BaP and TCS exposure. Finally, *cadherin 3* (*CDH3*), a protein involved in adherent junctions, was also found to be under-transcribed whatever the treatments and times considered (Figure 2.22.A).

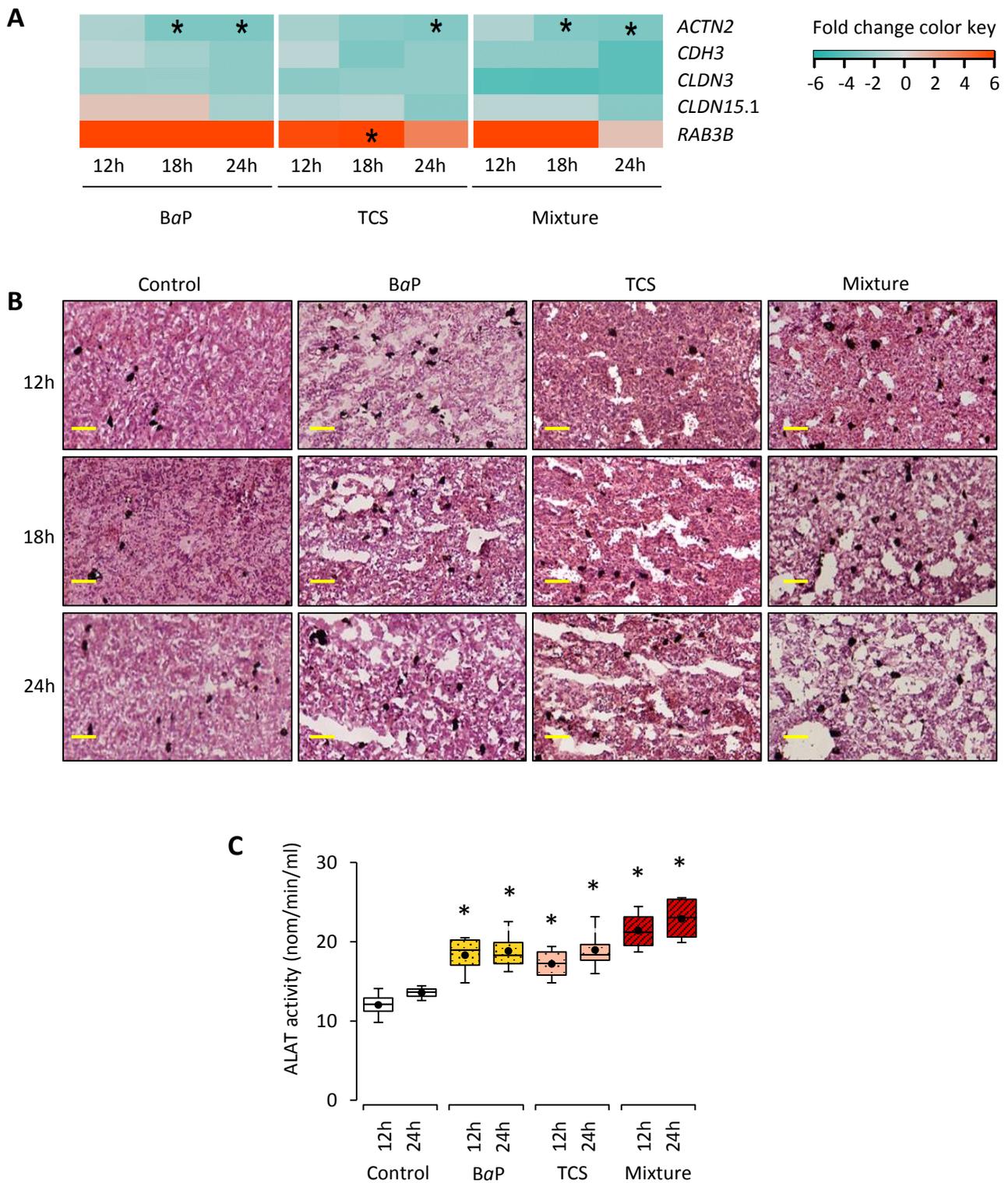


Figure 2.22: Cell-cell adhesion disturbance induced by BaP and TCS. A. Transcription of genes involved in cell-cell interactions. The color scale indicates transcription ratios relative to the controls. **B.** Hematoxylin-erythrosin (HE) staining of liver sections from control and *Xenopus tropicalis* exposed to BaP, TCS and ED-mixture. Bars = 200 μ m. **C.** Serum alanine aminotransferase activities in control and exposed *Xenopus tropicalis*. Data are mean (dot) for 4 replicates with whiskers from minimum to maximum. The statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test ($n = 4$), and the asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$.

Histological data of liver sections stained with HE revealed a disorganization of the hepatic tissue with fewer cell-cell contacts and irregular cytoplasmic shapes (Figure 2.22.B). For both pollutants and their mixture, this marked disorganization was found as early as 12 hours post-exposure and its severity increased until the end of exposure (Figure 2.22.B). These histological phenotypes observed in the liver parenchyma of treated *Xenopus* such as less homogeneous distribution, looseness in cell contact, and irregular shapes may be attributed to the induction of apoptotic processes (Saraste and Pulkki, 2000) as previously described in *Xenopus* females exposed to BaP and zebrafish exposed to mercury (Ung *et al.*, 2010; Regnault *et al.*, 2014).

Finally, the serum alanine aminotransferase (ALAT) activity used as a marker for hepatocellular injury were significantly increased (1.5 fold) in exposed *Xenopus* compared to the controls (Figure 2.22.C) which confirmed the hepatotoxicity observed.

2.3.3.4 Effects of BaP, TCS and the mixture on innate immune system and liver inflammation

Recently, there has been growing evidence that endoplasmic reticulum stress plays a critical role in the development of steatosis and progression to NASH. It has also been linked to various biological processes crucial in the pathogenesis of NAFLD-like insulin resistance, inflammation, and apoptotic cell death (Zhang *et al.*, 2015). Indeed, NASH is generally associated with inflammatory processes (Farrell *et al.*, 2012) and the expression of *CD40* has been reported to play a prominent role in innate immune processes that are known to be associated with inflammation (Liaskou *et al.*, 2012). On the other hand, the liver macrophage involvement in the local expression of *CD40* is sometimes discussed (Sookoian *et al.*, 2010). Nevertheless, no differences in *CD40* transcription were found in our data and no inflammatory cell infiltrations were observed in our liver sample (Figure 2.23). These results suggest an absence of inflammatory process during the first 24 hours of exposure.

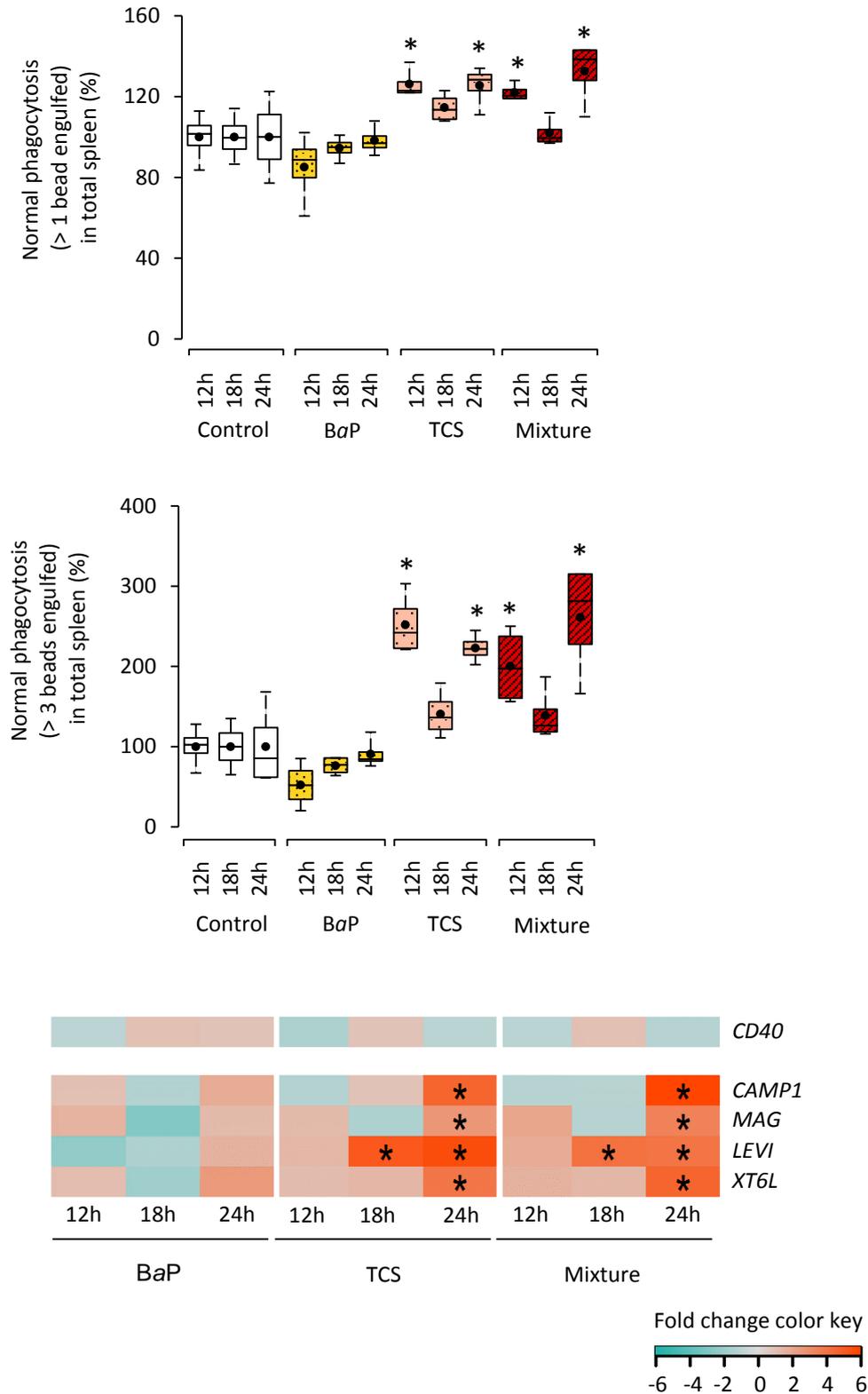


Figure 2.23 : Innate immune system disturbance induced by BaP and TCS. A. Phagocytic activity kinetics in control and exposed *Xenopus tropicalis*. Data are mean (dot) for 4 replicates with whiskers from minimum to maximum. **B.** Phagocytic efficiency kinetics in control and exposed *Xenopus tropicalis*. Data are mean (dot) for 4 replicates with whiskers from minimum to maximum. **C.** Transcription of genes involved in inflammation (*CD40*) or antimicrobial peptides. The color scale indicates transcription ratios relative to the controls. The statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test ($n = 4$), and the asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$.

BaP and PAHs in general are well-known immune system depressors in fish and mammals through multiple mechanisms including the production of immunosuppressive metabolites by cytochrome P450 1A1 activity or an induction of apoptosis (Carlson *et al.*, 2004; Reynaud *et al.*, 2004). This study assesses the impact of EDs on the immune system. No significant differences in the cellularity and viability of the spleen cells collected from exposed *Xenopus* were observed compared to the controls (Figure 2.24). The average number of cells was about 2.4×10^6 splenocytes per spleen and their viability was close to 93%. In frogs exposed to BaP, phagocytic activity (percentage of phagocytes having engulfed one bead and more; Figure 2.23.A) and efficiency (percentage of phagocytes having engulfed three (Figure 2.23.B) or five beads and more (Figure 2.25)) were similar to the controls. In contrast, in frogs exposed to TCS and the mixture, a significant increase in phagocytic activity and efficiency was observed at 12 hours and 24 hours post-exposure compared to the controls. Indeed, phagocytic activity increased by around 1.2 to 1.4 fold and phagocytic efficiency increased approximatively 2 to 3 fold and 3 to 4 fold for phagocytes having engulfed respectively three or five beads.

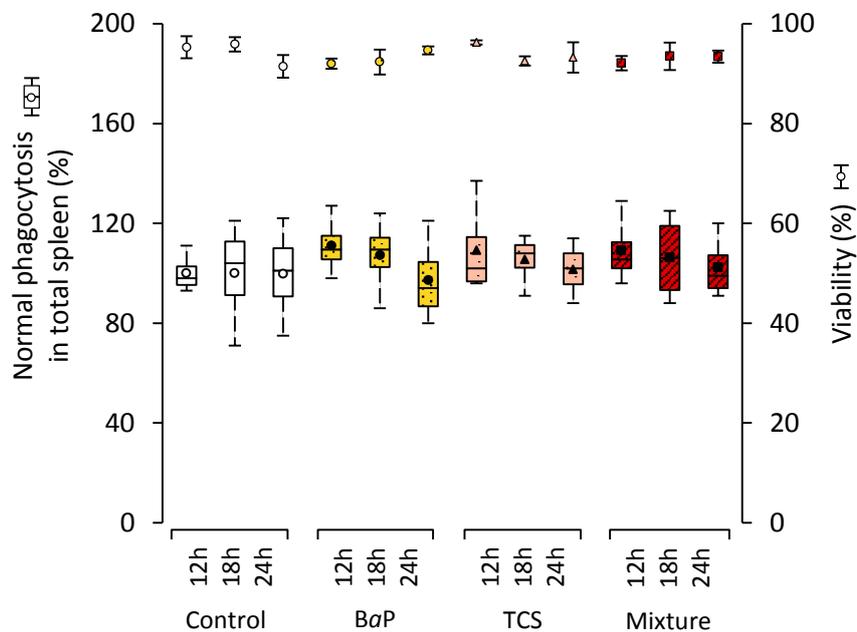


Figure 2.24: Cellularity (boxplot) and viability (dot) of splenocytes from control and exposed *Xenopus tropicalis*. Data are mean (dot) for 4 replicates with whiskers from minimum to maximum.

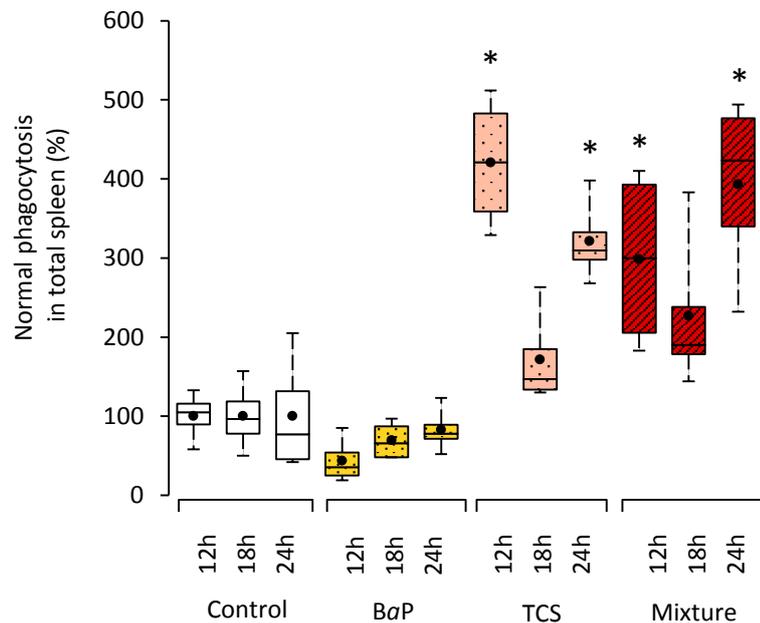


Figure 2.25: Phagocytic efficiency disorder induced by BaP and TCS. Percentage of phagocytes having engulfed five beads and more. Statistical analysis was performed using the Mann–Whitney test ($n = 4$), and asterisks indicate a significant difference from the control: *, $p < 0.05$. Data are mean (dot) for 4 replicates with whiskers from minimum to maximum.

The transcription of skin antimicrobial peptides (AMPs) which are the first defense against invading pathogens through the skin and digestive tract were measured (Rollins-Smith *et al.*, 2002). Four genes classically expressed in the skin, *Levitide (LEVT)*, *Caerulein (XT6L)*, *Maganin (MAG)* and *Cathelicidin antimicrobial peptide 1 (CAMP1)* appeared over-transcribed after TCS and mixture exposure (Figure 2.23.C). These results are consistent with a recent study which showed that TCS pretreatment of human oral keratinocytes could enhance the production of the antimicrobial peptides beta-defensins (Wallet *et al.*, 2012). However, immunostimulation induced by xenobiotics is very complex to extrapolate in terms of immune system efficiency. Indeed, it has been shown that xenobiotic-induced immunostimulation is often synonymous with uncontrolled immune system activation leading to an inability to respond to infectious diseases (Reynaud and Deschaux, 2006).

2.3.3.5 Effects of BaP, TCS and mixture on the testes

In the present study, the potential effects of EDs on the sexual axis were assessed. Steroid hormones synthesis in the testes was studied by monitoring the transcription of the genes encoding the enzyme *3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase* (*SRD5A1* and *SRD5A2*) which catalyzes the conversion of testosterone into its biologically active metabolite (Figure 2.26). In order to assess possible feminization at the tissue level, the transcription of the gene encoding the *aromatase* (*CYP19A1*) which catalyzes the conversion of testosterone into estradiol was studied. No differences were found in the transcription ratio between control and exposed animals whatever the gene considered. HE staining of testes sections showed no disruption to the seminiferous tubule organization. No differences were observed between control and exposed *Xenopus* (data not shown).

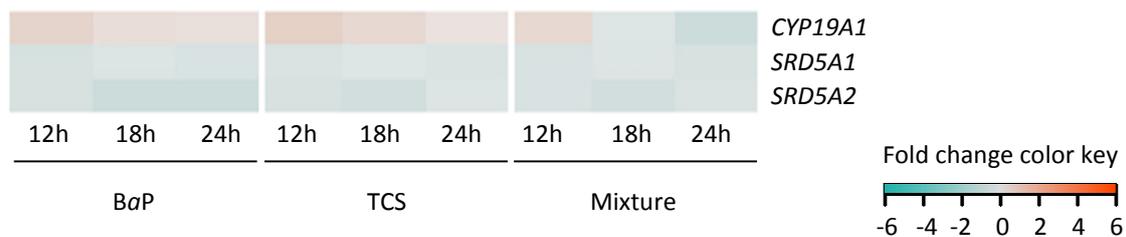


Figure 2.26: Transcription of genes involved in sex steroid hormones. The color scale indicates transcription ratios relative to the controls.

2.3.4 Conclusion

This study provides initial insights into the hidden adverse effects of high environmental concentrations of EDs on anurans, using *Xenopus tropicalis* as a biological model. BaP, TCS and the mixture of the two EDs induced a marked metabolic disorder in the liver highlighted by insulin resistance-like and NAFLD-like phenotypes and hepatotoxicity due to impaired lipid metabolism. For TCS and the mixture, these metabolic disorders were concomitant with innate immunity modulation (Figure 2.27). Although the concentration used in this study is likely to occur in highly-polluted sites where frogs live and reproduce, 24-hour exposure is more characteristic of acute contamination. Additional studies concerning chronic

exposure to commonly-occurring environmental concentrations of EDs are needed to confirm the relevance of our results to *in situ* conditions. However, in addition to the developmental and reproductive effects induced by EDs in amphibians, our results strongly suggest that metabolic disorders and immune system disruption should also be considered.

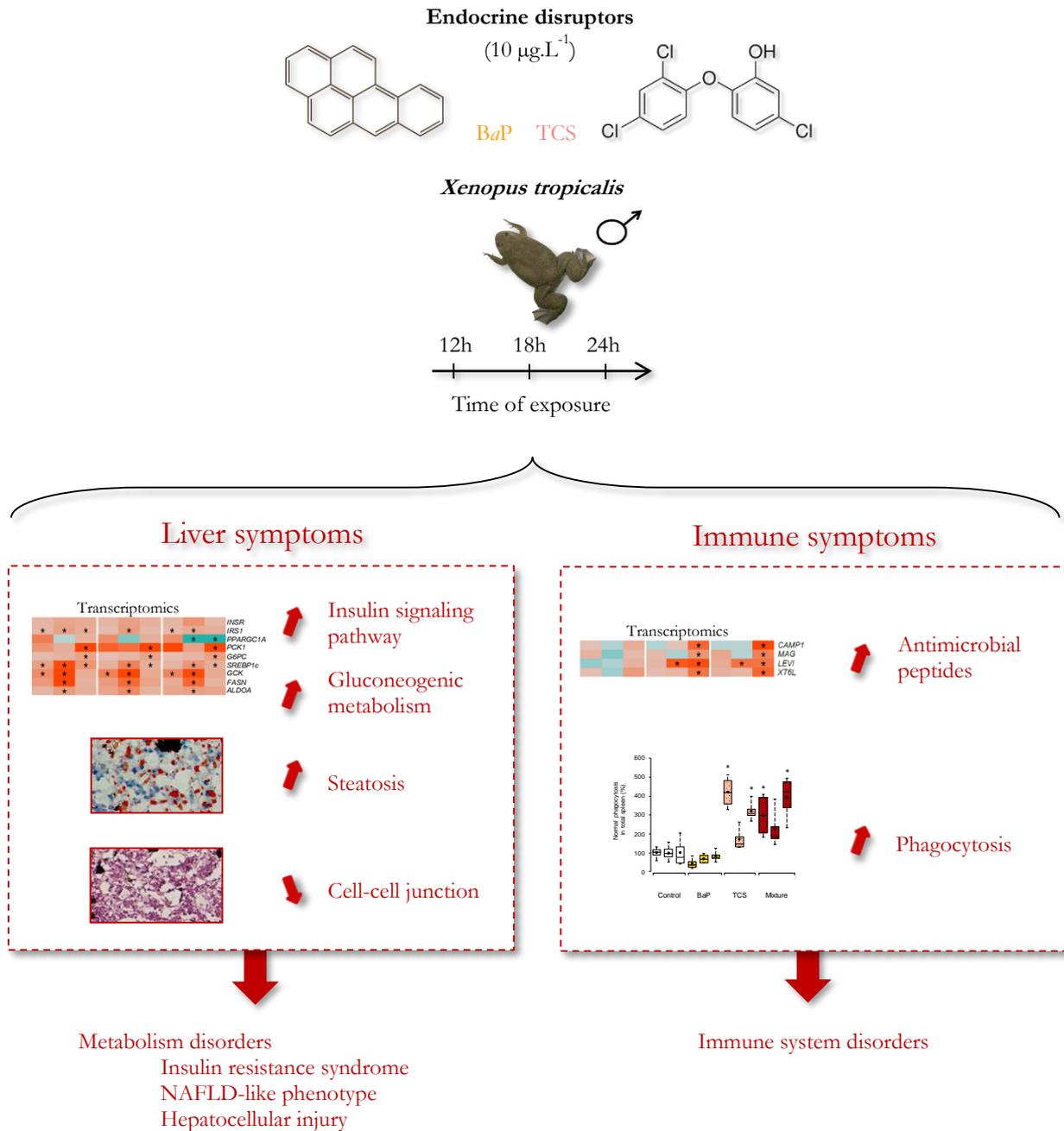


Figure 2.27: Metabolic and immune impairments induced by the endocrine disruptors benzo[a]pyrene and triclosan in *Xenopus tropicalis*, a graphical abstract.

2.3.5 Abstract

Despite numerous studies suggesting that amphibians are highly sensitive to cumulative anthropogenic stresses, the role played by endocrine disruptors (EDs) in the decline of amphibian populations remains unclear. EDs have been extensively studied in adult amphibians for their capacity to disturb reproduction by interfering with the sexual hormone axis.

Here, we studied the *in vivo* responses of *Xenopus tropicalis* males exposed to environmentally relevant concentrations of each ED, benzo[*a*]pyrene (BaP) and triclosan (TCS) alone (10 µg.L⁻¹) or a mixture of the two (10 µg.L⁻¹ each) over a 24-hour exposure period by following the modulation of the transcription of key genes involved in metabolic, sexual and immunity processes and the cellular changes in liver, spleen and testis. BaP, TCS and the mixture of the two all induced a marked metabolic disorder in the liver highlighted by insulin resistance-like and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)-like phenotypes together with hepatotoxicity due to the impairment of lipid metabolism. For TCS and the mixture, these metabolic disorders were concomitant with modulation of innate immunity. These results confirmed that in addition to the reproductive effects induced by EDs in amphibians, metabolic disorders and immune system disruption should also be considered.

Key words: amphibian, *Xenopus tropicalis*, endocrine disruptors, metabolism, NAFLD, benzo[*a*]pyrene, triclosan.

Highlights

Response of *Xenopus tropicalis* males exposed to benzo[*a*]pyrene and triclosan was studied

Metabolic, sexual and immunity processes were assessed over a 24-hour period

Both endocrine disruptors and the mixture induced a marked metabolic disorder in the liver

Triclosan and mixture induced a marked modulation of innate immunity

Metabolic disorders and immune system disruption should also be considered for EDs

Statement of novelty

The possible involvement of endocrine disruptors (EDs) in metabolic or immune disorders as a possible cause of fitness decrease in amphibians is a subject that has been largely neglected. Our study provides new insights into the physiological responses of *Xenopus tropicalis* males exposed to environmentally relevant concentrations of two common EDs.

ED exposure induced a marked metabolic disorder in the liver highlighted by insulin resistance-like phenotype and hepatotoxicity concomitant with immune system modulation. For the first time, our results suggest that in addition to the developmental and reproductive effects induced by EDs in amphibians, metabolic disorders and immune system disruption should be considered.

Acknowledgements

This work was funded by a research grant from the Grenoble-Alps University and PEPS2012-CNRS. We thank Kim Barrett (Version Originale) for the English proofread of the revised manuscript.

2.4 Conclusion

Ces deux études, basées sur des expositions aiguës (mais compatibles avec des concentrations rencontrées dans les biotopes), ont fourni des informations qualitatives significatives quant aux effets néfastes des perturbateurs endocriniens BaP et TCS sur les xénopes femelles et mâles. Malgré des concentrations environnementales élevées, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ces deux molécules ont été rapidement absorbées par les animaux (plus de 80 % des contaminants absorbés en douze heures d'exposition). Cependant, l'absorption du BaP a été plus grande chez les xénopes mâles que chez les femelles (respectivement 95 % et 85 % de la concentration initiale de BaP). Ces résultats apparaissent étonnants car compte tenu de la corpulence supérieure des femelles, la surface de contact avec l'eau est aussi plus importante et devrait permettre une absorption plus rapide (Quaranta *et al.*, 2009). En effet, les xénopes ne buvant pas, la peau est le seul organe d'entrée des xénobiotiques (Ogushi *et al.*, 2010). Chez les mâles le TCS a été moins rapidement absorbé que le BaP lors des expositions uniques. En revanche, lorsque ces molécules ont été en mélange, l'absorption du BaP a été significativement réduite. La métabolisation s'est avérée également très rapide puisque une augmentation importante de la quantité de métabolites a été détectée dans la bile dès douze heures d'exposition. Pourtant, malgré cette métabolisation conséquente, la transcription hépatique des gènes impliqués dans les voies de détoxification n'a pas été modifiée par l'exposition aux perturbateurs endocriniens seuls ni en mélange. En revanche, notre approche en cinétique nous a permis de démontrer que le BaP et le TCS étaient impliqués dans un désordre considérable du métabolisme hépatique.

Par une perturbation de la transcription des acteurs principaux des voies de la signalisation de l'insuline, de la glycolyse et de la néoglucogenèse, les deux xénobiotiques ont induit chez les femelles comme chez les mâles un phénotype semblable à de l'insulino-résistance. De plus, le BaP et le TCS ont considérablement affecté les voies de biosynthèse hépatique du cholestérol et des triglycérides. L'exposition des xénopes femelles au BaP a été en effet accompagnée d'une transcription accrue des gènes impliqués dans la capture du cholestérol circulant et dans sa biosynthèse hépatique. Cette sur-transcription a également été montrée chez les xénopes mâles exposés au BaP. L'augmentation importante de la teneur en lipides dans le foie s'est traduite par l'émergence d'une stéatose hépatique marquée dès les douze premières heures d'expositions chez l'ensemble des individus exposés,

indépendamment de leur sexe ou du type d'exposition. Curieusement, la sur-transcription des gènes liés au cholestérol n'a pas été retrouvée chez les xénopes exposés au TCS ni chez ceux exposés au mélange BaP/TCS. Ceci implique que l'origine de la stéatose observée n'est pas liée au cholestérol mais plutôt aux triglycérides et ainsi à la perturbation du métabolisme glucidique (Yoneda *et al.*, 2008; Cantó et Auwerx, 2009). Ces perturbations des voies métaboliques associées à l'émergence d'une stéatose très marquée suggèrent la présence d'un phénotype semblable à une stéatopathie non alcoolique chez les xénopes exposés (NAFLD pour *non alcoholic fatty liver disease* en anglais). Or, les phénomènes d'insulino-résistance et de NAFLD ont été décrits comme induisant une lipotoxicité hépatique (Magnan, 2006). Nos résultats révèlent tant chez les mâles que chez les femelles, la perturbation du métabolisme lipidique, laquelle a conduit à une forte hépatotoxicité illustrée notamment par une altération des contacts intercellulaires et par une augmentation des niveaux des transaminases sanguines.

Il est intéressant de noter que les perturbations transcriptomiques et phénotypiques observées chez les femelles exposées au BaP ont été vérifiées chez les mâles soumis aux mêmes conditions. En outre, ces mêmes perturbations ont été également retrouvées chez les mâles exposés à un autre contaminant, le TCS, suggérant des effets analogues de ces perturbateurs endocriniens. En revanche, les effets de ces deux contaminants sur le métabolisme du cholestérol sont différents. Chez les amphibiens, les taux de cholestérol hépatique sont finement régulés aussi bien chez les mâles que chez les femelles par l'action de la *3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase* (HMGCR). Chez les femelles, les taux de cette enzyme présentent deux pics annuels sous l'effet des œstrogènes (Bruscalupi *et al.*, 1989; DiCroce *et al.*, 1997). La régulation de la transcription du gène de l'HMGCR par les œstrogènes s'effectue via le *sterol regulatory element-binding protein 2* (SREBP2). Chez les amphibiens mâles en revanche, l'activité de l'HMGCR hépatique est beaucoup plus faible et constante au cours de l'année (Bruscalupi *et al.*, 1989). Ainsi, la forte activation de transcription de SREBP2 observée chez les mâles traités au BaP pourrait traduire un effet œstrogéno-mimétique.

Le système immunitaire inné des xénopes mâles perturbé par l'exposition au TCS et au mélange BaP/TCS s'est traduit par une augmentation de la transcription des peptides antimicrobiens de la peau et par une stimulation de l'activité phagocytaire splénique. Il n'est pas évident d'extrapoler les conséquences de cette perturbation en terme de capacité de

réponse à une infection par des pathogènes, tels le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis* responsable de la chytridiomycose par exemple. En effet, une immunostimulation par les xénobiotiques se traduit généralement par une sur-activation du système immunitaire inadaptée pour la lutte contre un quelconque pathogène (Reynaud et Deschaux, 2006). Quoiqu'il en soit, l'allocation d'énergie au système immunitaire pourrait perturber d'autres systèmes physiologiques d'importance et limiter le succès reproducteur des individus à plus long terme (Martin *et al.*, 2003; Sandland et Minchella, 2003).

Aucune conséquence n'a été observée ni sur la transcription des gènes impliqués dans la synthèse des stéroïdes sexuels ni sur l'histologie des gonades des xénopes mâles exposés au BaP et/ou au TCS. Leur succès reproducteur pourrait tout de même être affecté car nos études ont concerné des individus déjà matures sexuellement qui ont vécu leur développement et leur croissance dans un milieu propre. Notre exposition ont été alors tardive au regard des stades critiques de la mise en place du système reproducteur. Cependant le BaP et le TCS (par sa photodégradation en dioxine) (Matamoros *et al.*, 2008) sont des composés génotoxiques susceptibles d'affecter l'intégrité spermatique car les spermatozoïdes, contrairement aux ovocytes, n'ont pas de système de réparation de l'ADN (Hassan *et al.*, 2011). De plus, en perturbant des mécanismes physiologiques aussi majeurs et centraux que les métabolismes lipidiques et glucidiques, les perturbateurs endocriniens pourraient modifier la maturité des individus (durée, synthèse hormonale, ...) tout autant que la maturation de leurs œufs ou l'énergie allouée à leur reproduction. Le cholestérol, par exemple, est non seulement un précurseur des stéroïdes sexuels mais également de la vitellogénine, elle-même précurseur du vitellus, la réserve énergétique utilisée par les embryons au cours de leur développement (DiCroce *et al.*, 1997; Denslow *et al.*, 1999).

Il paraît donc crucial d'évaluer les effets de ces perturbateurs endocriniens à plus long terme, sur plusieurs générations et à des concentrations plus couramment retrouvées dans les zones humides afin de vérifier s'ils altèrent effectivement le succès reproducteur des xénopes. Ce travail a fait l'objet de la deuxième partie de ce mémoire de thèse.

3 Effets multigénérationnels de l'exposition aux perturbateurs endocriniens

3.1	Objectif de l'étude et approche expérimentale	143
3.2	Méthodologie	145
3.2.1	Maintenance des xénopes	145
3.2.1.1	Conditions de maintenance des xénopes.....	145
3.2.1.2	Exposition des xénopes F0.....	147
3.2.2	Suivi de la croissance des xénopes F0.....	148
3.2.3	Étude de la transcription des gènes hépatiques des femelles F0.....	149
3.2.4	Analyses phénotypiques des xénopes femelles F0	153
3.2.4.1	Mesure de la glycémie	153
3.2.4.2	Test de tolérance au glucose.....	153
3.2.4.3	Mesure de l'activité de l'alanine aminotransférase sérique.....	154
3.2.4.4	Calcul du rapport hépato-somatique.....	154
3.2.4.5	Colorations histologiques du foie par HE et ORO	154
3.2.4.6	Capacité oxydative et production mitochondriale de ROS	155
3.2.5	Age à la maturité sexuelle et reproduction des xénopes F0.....	159
3.2.6	Suivi du développement et de la croissance des xénopes F1	161
3.2.7	Validations statistiques	161
3.3	Résultats	162
3.3.1	Mesures des concentrations réelles dans les milieux d'exposition.....	162
3.3.2	Effets sur le développement et la croissance des xénopes F0.....	163
3.3.2.1	Sur les malformations et la mortalité.....	163
3.3.2.2	Sur la métamorphose	164
3.3.3	Effets sur le profil transcriptionnel hépatique des femelles F0.....	166
3.3.4	Effets sur certains paramètres physiologiques des femelles F0	179
3.3.4.1	Perturbation du métabolisme hépatique.....	179
3.3.4.2	Hépatotoxicité.....	183
3.3.5	Effets sur la maturité sexuelle et la reproduction des xénopes F0	184
3.3.1	Effets sur le développement et la croissance des xénopes F1.....	186

3.4	Discussion.....	190
3.4.1	Effets sur la croissance et la métamorphose des têtards exposés	190
3.4.1.1	Survie.....	190
3.4.1.2	Malformations.....	191
3.4.1.3	Métamorphose	191
3.4.2	Effets métaboliques sur les femelles adultes exposés.....	193
3.4.2.1	Hypertrophie hépatique.....	193
3.4.2.2	Stéatose hépatique.....	193
3.4.2.3	Hépatotoxicité.....	195
3.4.2.4	Stimulation de l'activité mitochondriale.....	195
3.4.2.5	Modification de la transcription des défenses antioxydantes	196
3.4.2.6	Perturbation du métabolisme glucidique	197
3.4.2.7	Phénotype semblable à une stéatopathie non alcoolique.....	198
3.4.3	Effets sur la reproduction des parents et sur la descendance.....	199
3.4.3.1	Perturbation du comportement reproducteur des parents	199
3.4.3.2	Retard de la métamorphose de la descendance	200
3.4.3.3	Modification morphologique de la descendance.....	201
3.5	Conclusion	202

3.1 Objectif de l'étude et approche expérimentale

Cette partie de nos travaux a pour but d'étudier les mécanismes mis en jeu dans les perturbations physiologiques induites par une exposition chronique aux perturbateurs endocriniens, benzo[*a*]pyrène et triclosan. Nous nous sommes également intéressés aux effets multigénérationnels de ces deux molécules. L'étude multigénérationnelle des effets de la contamination par les perturbateurs endocriniens dans l'eau d'élevage a été conduite suivant une approche considérant des individus exposés tout au long de leur vie (génération F0) mais également leur progéniture non exposée (génération F1). Comme dans nos travaux précédents, nous avons adopté une démarche intégrative associant l'étude de données moléculaires, métaboliques et phénotypiques.

L'ensemble de nos analyses a été effectué sur la base d'une population de *Xenopus tropicalis* témoin et trois populations de xénopes exposées dès les premiers jours de leur vie à 50 ng.L⁻¹ de benzo[*a*]pyrène, de triclosan ou d'un mélange benzo[*a*]pyrène/triclosan (génération F0, Figure 3.1.A). Ces concentrations sont couramment retrouvées dans les eaux de surface (Lindström *et al.*, 2002; Wind *et al.*, 2004; Gasperi *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2011). Pour approfondir la compréhension des effets de ces molécules sur les traits d'histoire de vie des xénopes, les paramètres suivants ont été étudiés : l'apparition de malformations et la mortalité au cours de leur croissance (Figure 3.1.A.① et ②), l'âge, la taille et la masse des individus à la métamorphose (Figure 3.1.A.③, ④ et ⑤), le sex-ratio et l'âge des individus à la maturité sexuelle (Figure 3.1.A.⑥ et ⑦). Ensuite, les effets du B_aP et du TCS sur le transcriptome hépatique ont été étudiés par mRNAseq chez des femelles matures issues des quatre conditions d'exposition (Figure 3.1.A.⑧). Parallèlement à cela et en relation avec les résultats obtenus dans nos études précédentes (Chapitre 2), les effets des perturbateurs endocriniens sur certains paramètres physiologiques (Figure 3.1.A.⑨, ⑩, ⑪, ⑫ et ⑬) et sur l'intégrité du foie ont été évalués chez les mêmes femelles matures (Figure 3.1.A.⑭ et ⑮). Outre ces effets directs sur les xénopes exposés, nous avons étudié les effets multigénérationnels sur leur progéniture non exposée (génération F1, Figure 3.1.B). Pour conclure, le développement, la croissance et la métamorphose des têtards de la descendance F1 ont été étudiés, après reproduction des individus de la génération F0 (Figure 3.1.A.⑯ et ⑰ et Figure.3.1.B.①, ②, ③, ④ et ⑤).

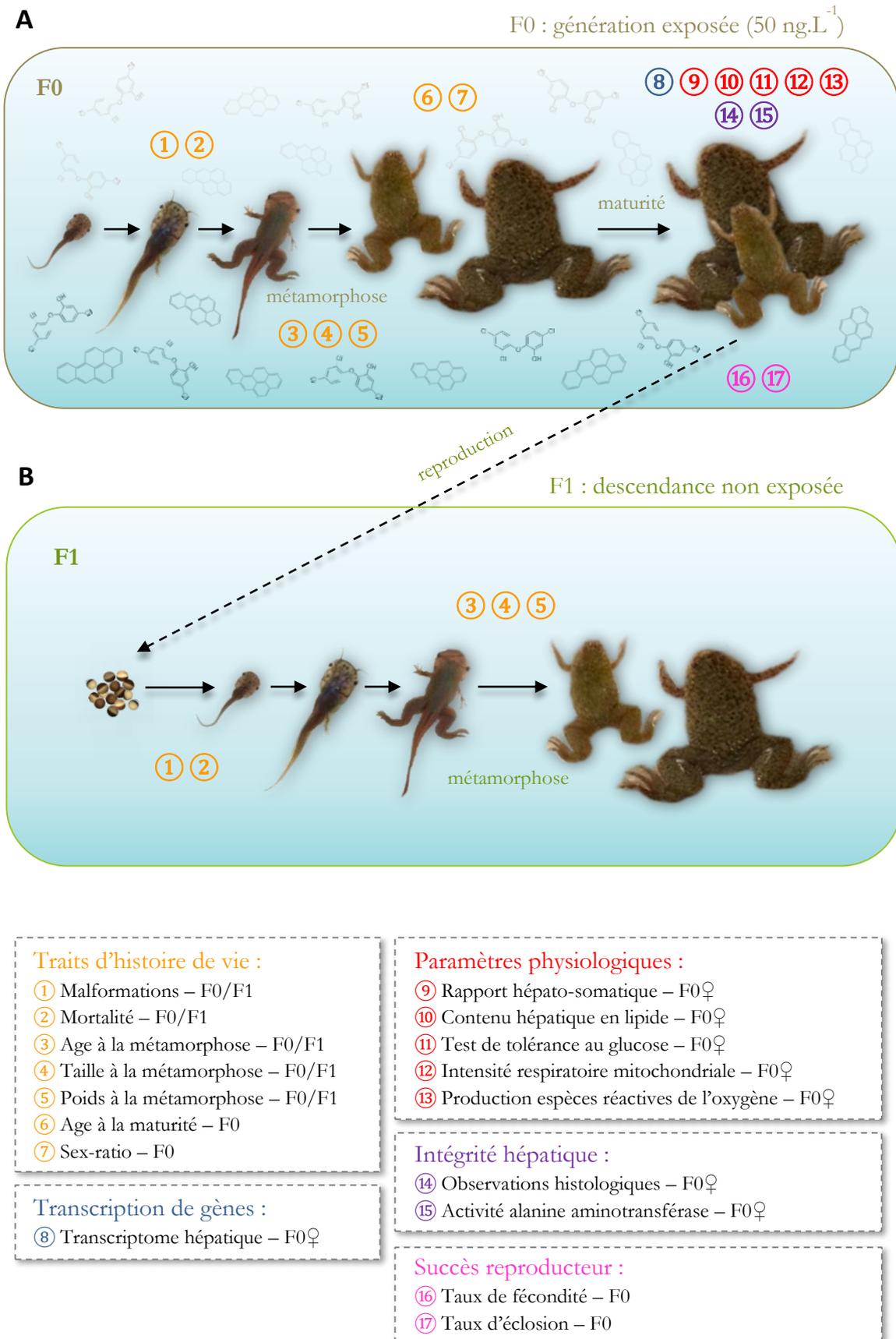


Figure 3.1 : Approche expérimentale adoptée pour l'étude des effets à long terme et multigénérationnels du BpA et du TCS (photographies C. Regnault).

3.2 Méthodologie

3.2.1 Maintenance des xénopes

Les xénopes (*Xenopus tropicalis*) de la génération parentale F0 provenaient du Centre de Ressources Biologiques Xénopes (CRB Xénopes) de l'Université de Rennes 1. Les têtards âgés de sept jours à l'achat étaient au stade pré-métamorphique, la période larvaire postembryonnaire durant laquelle le têtard est en croissance, sans modifications morphologiques apparentes (Delarue et Arnoult, 2004).

3.2.1.1 Conditions de maintenance des xénopes

Les xénopes ont été maintenus dans des aquariums en verre thermo-pliés (sans joints siliconés) d'une capacité de 10 L. L'eau utilisée pour la maintenance des têtards et des adultes était un milieu recomposé, le milieu MMR (*Marc's Modified Ringer's*). Ce milieu a été dilué dix fois (MMR 0,1X, Tableau 3.1) afin d'assurer la survie des xénopes. L'eau était thermostatée à 25 ± 1 °C par bain-marie et l'oxygénation assurée par un bullage artificiel modéré. La photopériode était de 12 h/12 h (nuit/jour). L'eau était renouvelée quotidiennement à hauteur d'un litre et entièrement renouvelée hebdomadairement. Ce rythme de renouvellement hydrique était assuré durant toute la durée d'exposition. L'aspiration d'eau était automatisée par pompe péristaltique.

Tableau 3.1 : Composition du milieu MMR 0,1X pour le maintien des xénopes

Nom IUCPA	Formule brute	Molarité (M)
Chlorure de calcium	CaCl ₂	2×10 ⁻⁴
Chlorure de magnésium	MgCl ₂	1×10 ⁻⁴
Chlorure de potassium	KCl	2×10 ⁻⁴
Chlorure de sodium	NaCl	1×10 ⁻²
Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES)	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	5×10 ⁻⁴ (pH 7,5)

Note : les composés sont dilués dans de l'eau déminéralisée.

Les xénopes sont des amphibiens grégaires qui nécessitent d'être maintenus en groupe. Suivant les recommandations du Centre de Ressource Biologique Xénope de Rennes, la densité de jeunes têtards âgés de deux semaines était de 50 individus pour 2 litres de milieu, correspondant à 2 aquariums par condition d'exposition, conditions décrites ci après (3.2.1.2). Afin de répondre au besoin en volume durant la croissance des individus, ces derniers ont été déplacés dans de plus grands aquariums avant le début de la phase de métamorphose (équivalant pour chaque condition à 2 aquariums de 30 individus âgés de 30 jours pour de 4 litres de milieu). En fin de métamorphose les xénopes ont été répartis dans de plus d'aquariums (équivalant pour chaque condition à 4 aquariums de 10 individus âgés de 150 jours pour de 4 litres de milieu) (Figure 3.1.1).

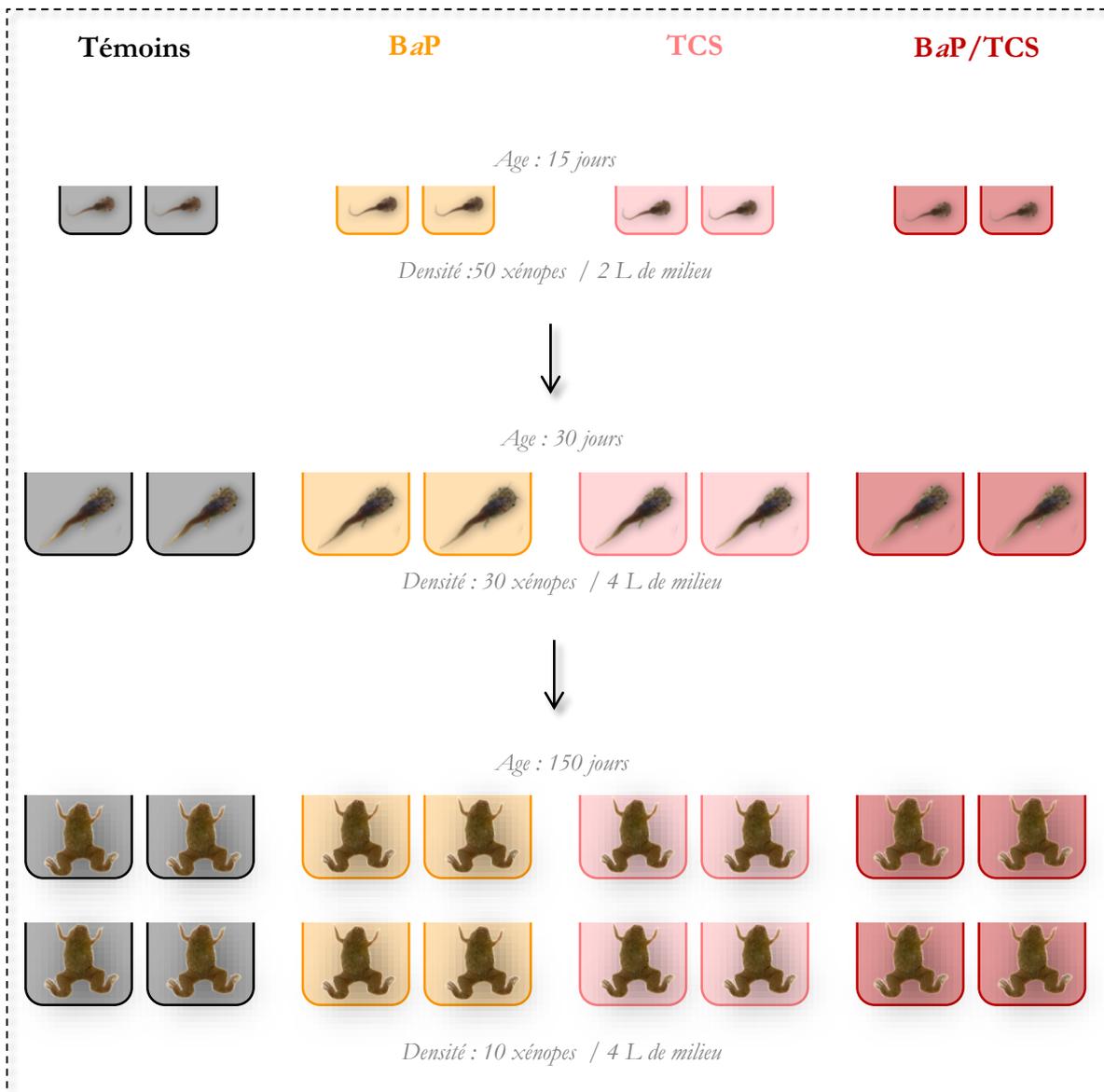


Figure 3.1.1 : Evolution de la densité de xénopes par aquariums au cours de l'exposition.

Les têtards microphages ont été nourris deux fois par jour, *ad libitum*, avec des granulés de nourriture pour amphibiens finement broyés (Aquatic 3, 4 mm, Special Diets Services) et amendés de poudre d'ortie biologique (*Urtica sp.*) préalablement fermentée et filtrée. Les xénopes postmétamorphiques ont été également nourris deux fois par jour, *ad libitum*, mais seulement avec les granulés dont le niveau de broyage a été ajusté à la taille de leur mâchoire tout au long de leur croissance. Afin de favoriser leur maturité sexuelle, le régime des xénopes adultes a été complété hebdomadairement par des larves de chironomes congelées (*Chironomus sp.*, Ocean nutrition). Les excédents de nourriture non consommée étaient nettoyés régulièrement par aspiration manuelle et le niveau d'eau était alors ajusté si nécessaire.

Le maintien des deux générations et l'exposition de la génération F0 aux perturbateurs endocriniens ont été effectués en collaboration avec la société de recherche et de services en écotoxicologie Rovaltain Research Company (Alixan, France)

3.2.1.2 Exposition des xénopes de la génération F0

Après une semaine d'acclimatation, les xénopes de la génération parentale F0 ont été exposés au BaP, au TCS et au mélange BaP/TCS. Une concentration moyenne hebdomadaire de 50 ng.L⁻¹ a été choisie pour ces expositions. Compte tenu de la périodicité et de la proportionnalité des changements d'eau (partiels quotidiens et totaux hebdomadaires), ces derniers ont été réalisés à partir de solutions mères de contaminants concentrées à 200 ng.L⁻¹. Pour les xénopes témoins, les polluants de la solution de changement d'eau ont été remplacés par leur solvant de dilution, le diméthylsulfoxyde (DMSO) à 0,004 %.

Un contrôle des concentrations de polluants présents dans les milieux au cours du temps a été réalisé. Pour cela, des milieux fraîchement préparés et contaminés par les solutions mères à 200 ng.L⁻¹ ont été placés dans les mêmes aquariums et les mêmes conditions de lumière et de température que les populations exposées lors de l'expérimentation. Des échantillons de 500 mL ont été prélevés après 0 h, 4 h et 24 h dans ces conditions. Afin d'évaluer l'absorption des contaminants par les xénopes, des prélèvements quotidiens pendant une semaine ont été effectués après introduction de 10 xénopes adultes dans le milieu. Le BaP et le TCS ont été extraits des milieux par

adsorption via le principe d'extraction par barreau aimanté absorbant *Twister*[®] (Gestel GmbH & Co. KG, Allemagne) puis dosés en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS/MS). Les échantillons ont été dosés par la société de recherche et de services en écotoxicologie Rovaltain Research Company (Alixan, France).

L'exposition des xénopes a duré 14 mois. En fin d'exposition les xénopes étaient âgés de 420 jours et les effectifs de chaque réplicats d'aquariums étaient demeurés inchangés depuis 293 jours (10 individus par aquarium). Deux femelles et un mâle par aquarium ont été échantillonnés aléatoirement pour chaque condition. Les xénopes sélectionnés ont alors été sacrifiés par commotion cérébrale et disséqués rapidement pour récupérer le foie. Le sang frais a été collecté par ponction intracardiaque. Les échantillons ont été pesés et conservés dans les meilleures conditions pour le déroulement des expérimentations décrites ci-dessous.

3.2.2 Suivi de la croissance des xénopes de la génération F0

Tout au long du stade têtard, l'apparition de malformations, la mortalité et la métamorphose ont été suivies pour l'ensemble des individus de la génération F0.

Le suivi des malformations concernait les individus au stade prémétamorphique. Il s'agissait donc principalement de l'émergence de courbures axiales, c'est-à-dire l'apparition d'un angle entre l'axe du rachis dans sa partie crâniale et l'axe caudal.

La métamorphose a été décrite pour chaque individu par la durée de la phase larvaire ainsi que par sa taille et sa masse à l'issue de la métamorphose. Enfin, un indice de corpulence (IC) a été déterminé selon la formule :

$$IC = (\text{masse fraîche en mg}) \times (\text{longueur du museau au cloaque en mm})^{-3} \quad (1)$$

3.2.3 Étude de la transcription des gènes hépatiques des xénopes femelles de la génération F0

Le transcriptome hépatique de femelles de la génération parentale F0 a été séquencé. Cette étape a été effectuée sur quatre femelles de chaque condition d'exposition. Pour cela, après sacrifice, le lobe antérieur droit du foie a été prélevé, puis immédiatement immergé dans l'azote liquide et stocké à -80°C . Les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit RNAqueous[®]-4PCR suivant les instructions établies par le fabricant (Ambion). Le contrôle de la qualité des ARN, la préparation des librairies d'ADN complémentaire (ADNc) à partir des ARN extraits et leur séquençage ont été réalisés en sous-traitance par l'entreprise de services génomiques Helixio (Groupe Hybrigenics, Saint Beauzire, France). La qualité des ARN extraits a été évaluée sur BioAnalyseur 2100 (Agilent Technologies). Les librairies d'ADNc servant de support au séquençage ont été générées à partir de 400 ng d'ARN à l'aide du kit *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation* (Illumina Inc). Les échantillons ont été séquencés par fragments simple brin de 75 paires de base (pb).

Le traitement bio-informatique des données de séquençage a été effectué via la plateforme Galaxy implantée sur un serveur du pôle Rhône-Alpes de bio-informatique (PRABI, <http://galaxy.prabi.fr/>, Figure 3.2). La première étape du traitement a été le nettoyage des données brutes du séquençage. La technologie de séquençage Illumina génère pour chaque base un score de qualité appelé score « Phred » rendant compte de la probabilité d'une mauvaise assignation de base nucléique pour une position donnée sur une séquence (Tableau 3.2). Il caractérise ainsi la qualité d'une séquence d'ADN (Illumina Inc., 2011).

Tableau 3.2 : Interprétation des scores de qualité Phred établis lors du séquençage

Score Phred	Probabilité de mauvaise assignation	Précision de l'identification d'une base
10	1 pour 10	90 %
20	1 pour 100	99 %
30	1 pour 1 000	99,9 %
40	1 pour 10 000	99,99 %
50	1 pour 100 000	99,999 %

Note : Les scores de qualité Phred sont reliés de façon logarithmique à la probabilité d'erreur d'identification d'une base.

Dans un premier temps et sur la base de ces scores de qualité, les données brutes générées par le séquençage ont été filtrées avec l'outil Trimmomatic (v0.32.1) implanté sur la plateforme Galaxy (Bolger *et al.*, 2014 ; Figure 3.2). Il s'agit d'un algorithme permettant d'éliminer du jeu de données les séquences ou les portions de séquences ne répondant pas aux seuils de qualité prédéfinis par l'utilisateur. Les paramètres choisis dans le cadre de cette étude sont présentés dans le tableau 3.3.

Tableau 3.3 : Paramètres qualitatifs appliqués au nettoyage des séquences brutes par l'outil Trimmomatic

Paramètre de qualité	Seuil établi	Action
Phred moyen sur une fenêtre glissante de 4 paires de bases	Phred < 17	Suppression de la séquence
Score Phred des bases en 5' et 3' considérées une par une	Phred < 20	Suppression des bases
Taille totale du fragment résultant	Phred < 50	Suppression de la séquence

La deuxième étape du traitement bio-informatique consiste en l'alignement des séquences filtrées sur un génome de référence, puis à l'assemblage et à la comparaison des taux de transcription des gènes selon les conditions d'expositions (Figure 3.2). Cette phase a été réalisée suivant la méthode développée par l'équipe de Cole Trapnell (Roberts *et al.*, 2011; Trapnell *et al.*, 2013). Dans un premier temps, les séquences filtrées de chaque échantillon ont été alignées à l'aide de l'outil TopHat 2 implanté sur Galaxy (Trapnell *et al.*, 2009) sur la séquence du génome de référence de *Xenopus tropicalis* (ftp://ftp.ensembl.org/pub/release-79/gtf/xenopus_tropicalis/Xenopus_tropicalis.JGI_4.2.79.gtf.gz, assemblage JGI4.2 avec la version 79 de l'annotation Ensembl). L'outil TopHat 2 (v0.6) présente l'avantage de prendre en compte les séquences potentiellement à cheval sur un site d'épissage, augmentant ainsi grandement le nombre de séquences alignées sur le génome et prises en compte dans la suite de l'analyse. L'objectif de notre étude n'étant pas de réannoter de nouveaux transcrits potentiels, les paramètres d'alignement ont été définis de manière stringente. Ainsi, les insertions et délétions n'ont pas été autorisées lors de l'alignement des séquences sur le génome. En outre, la fonction *coverage search* a été appliquée pour chacun des alignements, permettant ainsi de maximiser la spécificité des alignements. Les différents paramètres utilisés lors de cette étape sont présentés dans le tableau 3.4.

Tableau 3.4 : Paramètres appliqués à l'alignement des séquences sur le génome de référence par l'outil TopHat 2

Paramètre considéré	Seuil
Nombre de différence maximum avec la séquence de référence (mésappariement, insertions, délétions)	2
Nombre de mésappariements maximum	2
Taille minimum des introns (pb)	45
Taille maximum des introns (pb)	250 000
Nombre maximum d'alignements sur le génome ¹	1
Taille minimum de l'alignement de part et d'autre d'un potentiel site d'épissage (pb)	8
Nombre de mésappariements maximum dans les régions autour d'un site d'épissage	0

Note : ¹ Seul le meilleur alignement est pris en compte dans le fichier de sortie.

Les différents fragments de séquences alignées ont été assemblés avec l'outil Cufflinks (v0.0.7) également implanté sur la plateforme Galaxy (Figure 3.2). Cette étape a permis de générer un transcriptome hépatique par échantillon en utilisant le génome de *Xenopus tropicalis* comme carte de référence. Cufflinks comprend un script nommé Cuffmerge (v0.0.6) permettant de fusionner plusieurs assemblages issus de Cufflinks. Ainsi trois transcriptomes expérimentaux ont été générés. Il s'agit de la fusion des transcriptomes hépatiques des quatre femelles témoins avec les transcriptomes hépatiques des femelles exposées aux perturbateurs endocriniens seuls ou en mélange. En conséquence, ce sont les différentes conditions d'expositions qui sont à l'origine des trois différents transcriptomes expérimentaux générés (BaP, TCS et mélange). Ces transcriptomes expérimentaux présentent l'avantage de concentrer les efforts de calcul sur les transcrits réellement observés dans nos échantillons, et non sur l'ensemble des transcrits référencés chez *Xenopus tropicalis*, lors de la phase suivante de comparaison de la transcription des gènes entre les échantillons.

Les niveaux de transcription des gènes ont été calculés à partir des alignements effectués par TopHat 2 et comparés statistiquement à l'aide de l'outil Cuffdiff (v0.0.7) implanté sur Galaxy (Figure 3.2). Les niveaux de transcription ont été comparés gène par gène entre les quatre répliques issus des femelles témoins et les quatre répliques issues de femelles exposées aux perturbateurs endocriniens. Les gènes présentant un rapport de transcription supérieur à 1,8 ou inférieur à 0,55 ainsi qu'une q -valeur inférieure à 0,05 entre individus exposés et témoins ont été considérés comme différentiellement transcrits.

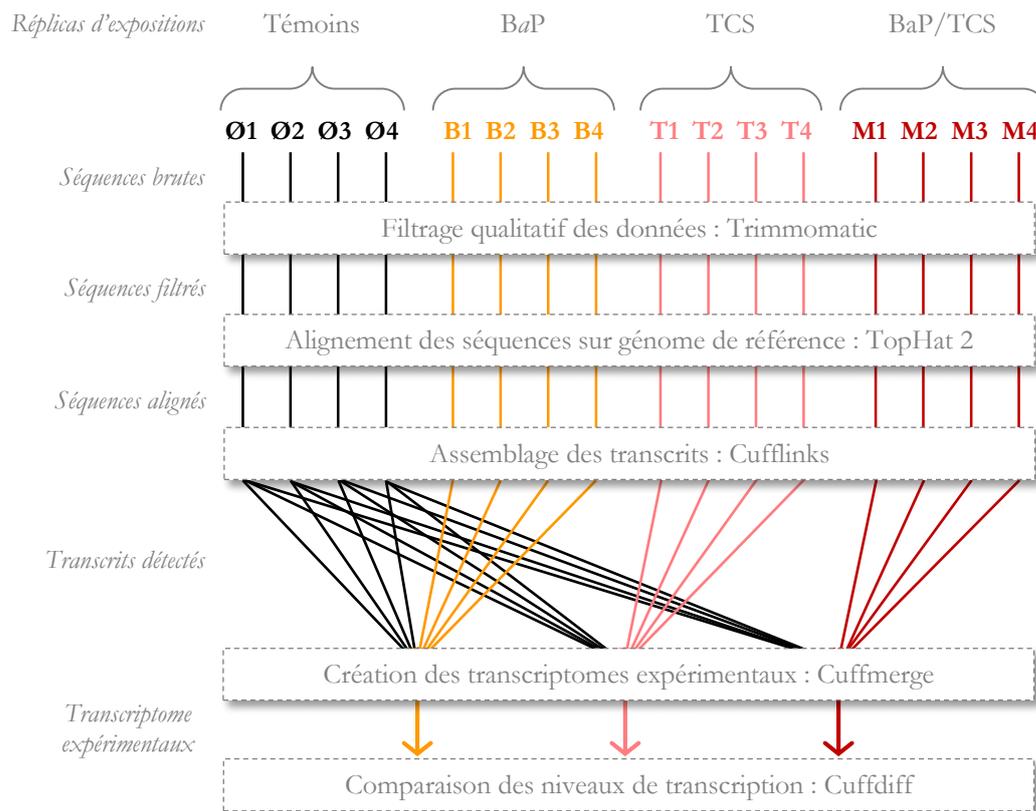


Figure 3.2 : Démarche expérimentale du traitement bio-informatique des données de séquençage sous Galaxy

L'outil bio-informatique DAVID (Bioinformatics Resources, v6.7) a été utilisé afin d'étudier de façon statistique l'enrichissement de certaines voies métaboliques au sein des données transcriptomiques (Huang *et al.*, 2009). Pour ce faire, le logiciel doit être renseigné avec deux listes de gènes : les gènes significativement sur ou sous-transcrits ainsi que l'ensemble des gènes détectés qui constitue le *background* ou fond de transcription. Cet outil n'étant pas renseigné avec le génome du xénope, l'ensemble des gènes détectés a dû être converti en gènes humains par homologie à l'aide de l'outil BioMart d'Ensembl (Vilella *et al.*, 2009). Cependant, il arrive que les homologies ne soient pas assez robustes ou que les gènes de xénope et d'humains associés n'aient pas la même fonction chez les deux organismes. Pour une meilleure validité de cette phase, toutes les associations de gènes ont donc été vérifiées une à une en s'appuyant sur les dernières mises à jour (août 2015) d'UniProt (Universal Protein Ressource ; UniProt consortium, 2015). L'outil DAVID génère une liste de catégories fonctionnelles de gènes enrichis définies par des termes Gene Ontology (GO). La significativité de l'enrichissement a été calculée à l'aide d'un test de Fisher ($p < 0,05$). Les

listes de termes GO qui en résultent peuvent être importantes, hautement redondantes, et donc difficiles à interpréter. Afin de simplifier l'analyse, l'outil en ligne REViGO a été utilisé. Cet outil simplifie des longues listes de termes GO et les résume en supprimant les termes redondants (Supek *et al.*, 2011). Pour discriminer suffisamment les principales catégories fonctionnelles de gènes enrichis dans notre jeu de données, une valeur de coupe stringente de 0,5 a été choisie.

3.2.4 Analyses phénotypiques des xénopes femelles de la génération F0

L'ensemble des analyses suivantes ont été effectuées seulement sur des individus de la génération parentale exposée F0, prélevés aléatoirement et dans des aquariums différents pour chaque condition.

3.2.4.1 Mesure de la glycémie

Immédiatement après le sacrifice des xénopes, la glycémie des individus disséqués a été mesurée par l'utilisation de bandelettes-test développées à cet effet (Accu-Chek[®], Roche) sur du sang frais, comme dans l'étude précédente. Ces bandelettes sont tapissées de quinoprotéines-glucose-déshydrogénases qui catalysent la conversion du glucose de l'échantillon sanguin en gluconolactone. Cette réaction produit un faible courant électrochimique proportionnel à la quantité de glucose, qui est ainsi mesuré par un lecteur.

3.2.4.2 Test de tolérance au glucose

Un test de tolérance au glucose a été mis en place dans le but d'évaluer la régulation de la glycémie par les xénopes. Ce test a été réalisé sur 4 femelles et 4 mâles de chaque condition, des individus ne participant ni à la campagne de sacrifice et collecte d'échantillon ni à la campagne de reproduction. Ainsi, du glucose a été injecté ($1 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de masse fraîche) au niveau de leurs sacs dorsaux lymphatiques et la glycémie a été mesurée périodiquement (0, 1 h, 2 h, 3 h et 4 h après injection) sur la section du premier doigt de la patte inférieure gauche (dépôt de sang frais sur les bandelettes-test Accu-Chek[®] comme décrit ci-dessus).

Un témoin expérimental a été effectué par injection de chlorure de sodium (1 mg.g⁻¹ de masse fraîche) ainsi qu'un suivi de glycémie identique. Aucun changement de la glycémie n'a été observé chez ce témoin. Cela a validé notre démarche et confirmé que les changements de glycémie étaient causés par l'apport de glucose exogène et non par un stress lié à l'expérimentation.

3.2.4.3 Mesure de l'activité de l'alanine aminotransférase sérique

L'augmentation de l'activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) est un marqueur de cytolysé hépatique. L'activité ALAT a été quantifiée suivant les instructions du kit *Alanine Aminotransferase Activity Assay* (Sigma-Aldrich) sur du sérum obtenu par centrifugation du sang frais (3000 × g pendant 10 min à 4 °C).

3.2.4.4 Calcul du rapport hépto-somatique

Le rapport hépto-somatique (RHS) représente le poids du foie exprimé en pourcentage par rapport au poids total du corps.

$$RHS = \text{masse}_{\text{foie}} \times \text{masse}_{\text{xénope}}^{-1} \times 100 \quad (2)$$

Ce rapport rend compte d'une hypertrophie ou d'une hypotrophie du foie. Il a été calculé sur les xénopes femelles disséquées de la génération F0.

3.2.4.5 Colorations histologiques du foie par l'hématoxyline-érythroisine et par l'huile rouge

La coloration hématoxyline-érythroisine est une coloration bichromatique composée d'un colorant nucléaire cationique basique, l'hématoxyline, et d'un colorant cytoplasmique anionique acide, l'érythroisine. Leurs propriétés chimiques leur procurent des affinités avec les éléments cellulaires différentes, permettant donc de visualiser et de discriminer les noyaux, les cytoplasmes et la matrice extracellulaire sur une coupe histologique. En revanche l'huile rouge est un colorant liposoluble utilisé pour mettre en évidence les lipides neutres cellulaires (triglycérides, cholestérol estérifié). Cette méthode nécessite donc une contre-coloration des coupes histologiques par l'hématoxyline afin de mieux identifier les contours nucléaires.

Après la dissection des xénopes, le lobe antérieur gauche du foie a été imprégné dans de l'OCT (*Optimal Cutting Temperature compound*, Labonord – VWR, Templemars, France) et instantanément immergé dans l'azote liquide puis conservé à -80°C . Les coupes de foie et les colorations hématoxyline-érythrosine et huile rouge ont été réalisées selon une méthode identique aux études précédentes. De même, le contenu hépatique en lipide a été quantifié à l'aide du logiciel GNU Image Manipulation Program (GIMP v2.8.6) sur une base de quatre photographies par coupe, comme décrit précédemment.

3.2.4.6 Évaluation de la capacité oxydative mitochondriale et de la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène

Les expérimentations suivantes ont été menées en collaboration avec le laboratoire de bioénergétique fondamentale et appliquée (LBFA, Université Grenoble-Alpes). Après le sacrifice, le foie entier de 4 femelles a été immédiatement prélevé et placé dans un tampon d'isolement des mitochondries à 4°C (Tableau 3.5).

Tableau 3.5 : Composition du tampon pour l'isolement des mitochondries de xénope

Nom IUCPA	Formule brute	Molarité (M)
α -D-glucopyranosyl-(1 \leftrightarrow 2)- β -D-fructofuranoside (saccharose)	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	$2,5 \times 10^{-1}$
Acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétraacétique (EGTA)	$\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_{10}$	1×10^{-3}
2-Amino-2-(hydroxyméthyl)propane-1,3-diol (Tris)	$\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	2×10^{-2} (pH 7,4)

Note : les composés sont dilués dans de l'eau déminéralisée.

Afin de préserver l'intégrité et la fonctionnalité des mitochondries, l'ensemble des étapes d'isolement ont été réalisées à 4°C . Dans le tampon, chaque foie a été émincé finement puis homogénéisé par potterisation (deux passages successifs) dans l'objectif de rompre les membranes cellulaires sans altérer les mitochondries. L'isolement des mitochondries a été réalisé par trois centrifugations différentielles ($800 \times g$; 10 min, $800 \times g$; 10 min et $1000 \times g$; 10 min) afin de sédimenter les débris cellulaires et nucléaires. Le surnageant contenant les mitochondries a été lavé deux fois par centrifugation ($8700 \times g$; 10 min) et resuspendu dans le tampon d'isolement. La teneur en protéines mitochondriales a été ensuite dosée par spectrophotométrie avec la méthode de Bradford en

utilisant la BSA (albumine sérique bovine) pour réaliser une gamme de concentrations connues, selon les instructions établies par le fabricant (Sigma-Aldrich).

La capacité oxydative mitochondriale a été mesurée par un oxymètre à sonde polarographique (électrode de Clark). Cet oxymètre est composé d'une chambre de mesure fermée hermétiquement, sous agitation constante et thermostatée à 25 °C, température de maintien des xénopes. L'électrode est formée d'une cathode de platine et d'une anode d'argent reliées par un « pont » de chlorure de potassium (KCl). L'oxygène présent dans la chambre de mesure, dissous dans le KCl, est alors ionisé en ion hydroxyde (OH⁻) au contact de la cathode suivant la réaction :



En revanche, il s'opère au contact de l'anode en argent la réaction suivante :



Il résulte de ces deux réactions un courant faible proportionnel à la concentration en dioxygène (O₂) présent dans le milieu. L'intensité de ce courant est mesurée en temps réel et permet ainsi d'apprécier la respiration mitochondriale caractérisée par une diminution de la concentration en dioxygène dans le milieu.

Pour la mesure de leur intensité respiratoire, les mitochondries ont été incubées dans la chambre de mesure dans un milieu dit respiratoire (Tableau 3.6, 1 mg de protéines mitochondriales par millilitre de milieu).

Tableau 3.6 : Composition du milieu respiratoire pour la mesure de la capacité oxydative mitochondriale

Nom du composé	Formule brute	Concentration
Chlorure de magnésium	MgCl ₂	2×10 ⁻³ M
Chlorure de potassium	KCl	1,2×10 ⁻¹ M
Phosphate de monopotassium	KH ₂ PO ₄	5×10 ⁻³ M
Albumine sérique bovine (BSA)	–	0,3 %
EGTA	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₁₀	1×10 ⁻³ M
HEPES	C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S	3×10 ⁻³ M (pH 7,4)

Note : les composés sont dilués dans de l'eau déminéralisée.

La respiration a été initiée par l'ajout d'un mélange de glutamate/malate/succinate (5 mM/2,5 mM/5 mM). Le glutamate et le malate sont des substrats associés au complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale alors que le succinate entre au niveau du complexe II. Ceci a permis la définition de l'état 2 respiratoire ou état non phosphorylant caractérisé par une faible consommation d'O₂ (Figure 3.3). Après deux minutes d'acquisition, de l'ADP a été ajoutée dans la chambre de mesure en quantité saturante (1 mM). Ceci nous a permis de caractériser l'état phosphorylant ou état 3 (Figure 3.3). Enfin, après deux minutes d'acquisition, l'ajout de 2,4-dinitrophénol (DNP, 60 µM) a défini l'état 5 de la respiration ou état découplant. Le DNP est en effet un agent découplant agissant comme transporteur de proton à travers les membranes biologiques. La consommation d'O₂ par les mitochondries est alors maximale (Figure 3.3).

Le rapport entre l'état 3 phosphorylant et l'état 2 non phosphorylant, aussi appelé rapport de contrôle respiratoire (RCR) a été calculé pour estimer le niveau de couplage mitochondrial qui est couramment utilisé pour évaluer la qualité des préparations mitochondriales.

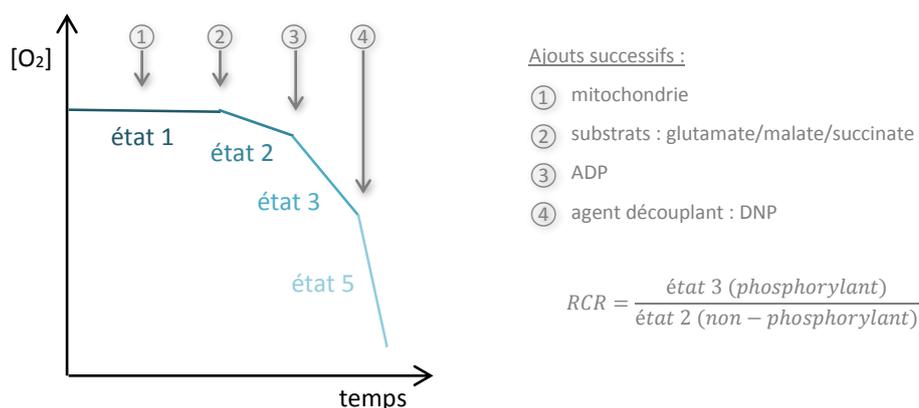


Figure 3.3 : Courbe théorique obtenue lors de l'évation de la capacité oxydative mitochondriale. ADP, adénosine diphosphate ; DNP, 2,4-dinitrophénol ; RCR, rapport de contrôle respiratoire.

La mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) a été effectuée sur les mêmes extraits de mitochondrie fraîchement isolées. Elle est basée sur le dosage du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) issu de la dismutation du radical superoxyde ($O_2^{\cdot -}$) générée par la superoxyde dismutase. Les mitochondries ont été mises en suspension dans un milieu respiratoire à 25 °C modifié (Tableau 3.7, 1 mg de protéines mitochondriales par millilitre). Un mélange de glutamate/malate a été utilisé comme substrat respiratoire. En présence de H_2O_2 , la peroxydase catalyse la formation de résorufine à partir de l'amplex red. La résorufine ainsi formée a été dosée par spectrophotométrie ($\lambda_{ex/em}$: 563/587 nm).

Tableau 3.7 : Composition du milieu respiratoire pour la mesure de la production d'espèces réactives de l'oxygène

Nom du composé	Formule brute	Concentration
Chlorure de magnésium	$MgCl_2$	2×10^{-3} M
Chlorure de potassium	KCl	$1,2 \times 10^{-1}$ M
Phosphate de monopotassium	KH_2PO_4	5×10^{-3} M
Albumine sérique bovine (BSA)	—	15 %
EGTA	$C_{14}H_{24}N_2O_{10}$	1×10^{-3} M
HEPES	$C_8H_{18}N_2O_4S$	3×10^{-3} M (pH 7,4)
10-acétyl-3,7-dihydroxyphenoxazine (amplex red)	$C_{14}H_{11}CNO_4$	2×10^{-6} M
Peroxydase de raifort	—	5 U.mL ⁻¹
Glutamate	$C_5H_9NO_4$	5×10^{-3} M
Malate	$C_4H_6O_5$	$2,5 \times 10^{-3}$ M

Note : les composés sont dilués dans de l'eau déminéralisée.

3.2.5 Age à la maturité sexuelle et reproduction des xénopes de la génération F0

L'âge à la maturité sexuelle des individus a été estimé par la durée entre la fin de la métamorphose et l'apparition des caractères sexuels secondaires, signes d'une maturité sexuelle aboutie. Les femelles sont reconnaissables par une taille plus importante, une physionomie plus ronde et surtout des papilles cloacales turgescentes. Les mâles sont au contraire plus petits, plus élancés, et développent des callosités nuptiales, c'est-à-dire des colorations brunâtres sur la partie interne et distale des membres antérieurs (Figure 3.4).

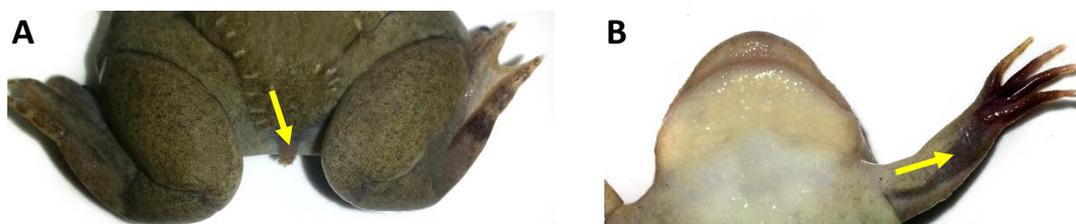


Figure 3.4 : Les caractères sexuels secondaires chez *Xenopus tropicalis*. **A.** Vue dorsale des papilles cloacales turgescentes chez une xénope femelle. **B.** Vue ventrale d'une callosité nuptiale chez un xénope mâle (photographies C. Regnault).

En fin de maturité, le sex-ratio a été calculé pour chacune des populations de xénopes témoins et exposés selon la formule classique :

$$\text{sexe - ratio} = \text{nombre de mâles} \times \text{nombre de femelles}^{-1} \quad (5)$$

La reproduction des xénopes de la génération F0 a eu lieu 14 mois après le début de leur exposition. Les pontes ont été obtenues par accouplement naturel après fécondation *in vivo* induite par des injections d'hormone chorionique gonadotrope (hCG, Merck). Afin ne pas complexifier le schéma expérimental, les accouplements ont été effectués entre des individus exposés au même traitement.

La veille de l'accouplement, cinq femelles et dix mâles par condition d'exposition ont reçu une injection de 50 U d'hCG au niveau des sacs dorsaux lymphatiques. Les mâles et les femelles sont restés séparés jusqu'au lendemain. Au matin, les individus ont subi une seconde

injection de 200 U d'hCG et les femelles ont été individualisées dans du milieu MMR 0,1X. Les mâles (deux par femelles) ont été ajoutés dès la libération des premiers ovocytes soit 2,5 heures après la dernière injection. Durant l'accouplement, le xénope mâle s'accroche à la femelle au niveau de la ceinture pelvienne. Ce processus, nommé amplexus peut durer quatre à six heures. À la fin de l'accouplement les géniteurs ont été retirés pour ne pas endommager les œufs. Le jour suivant, les œufs fécondés ont été séparés des autres. Les premiers sont reconnaissables par la forme caractéristique de l'embryon en développement qui apparaît telle une virgule pigmentée. En revanche les œufs non fécondés dégèrent et blanchissent rapidement (Figure 3.5).

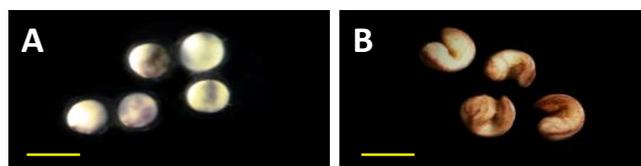


Figure 3.5 Discrimination des œufs non fécondés (A) et des embryons en cours de développement (B). Les barres d'échelle équivalent à 1 mm (photographies A. Tokmakov et D. Fisher).

Les œufs et les embryons ont été maintenus en milieu MMR 0,1X propre, dans les mêmes conditions de température, d'oxygénation et de lumière que décrites précédemment. Les têtards issus de parents exposés dans les mêmes conditions ont été regroupés pour former les nouvelles métapopulations F1.

Le succès de cette étape de reproduction a été qualifié par l'observation de la mise en place d'un amplexus et quantifié par le dénombrement des œufs pondus, des œufs fécondés et des œufs éclos par femelle ainsi que par le calcul du taux de fertilisation des œufs et du taux d'éclosion des œufs fertiles :

$$\text{taux de fertilisation} = \text{nombre d'œufs fertiles} \times \text{nombre d'œufs pondus}^{-1} \quad (6)$$

$$\text{taux d'éclosion} = \text{nombre d'œufs éclos} \times \text{nombre d'œufs fertiles}^{-1} \quad (7)$$

Les individus parentaux, injectés, n'ont participé à aucune campagne de sacrifice et de collecte d'échantillon.

3.2.6 Suivi du développement et de la croissance des xénopes de la génération F1

La mortalité, l'apparition de malformations et la métamorphose ont été suivies sur l'ensemble des individus de la génération F1, à la manière de la génération parentale F0.

3.2.7 Validations statistiques

À l'exception de l'étude transcriptomique dont les outils d'analyses intègrent des outils statistiques propres, des tests statistiques de comparaison des moyennes obtenues pour les individus témoins avec celles obtenues pour les individus exposés ont été réalisés. La normalité de la distribution des valeurs a été testée par un test de Shapiro-Wilk. Si p était supérieur à 0,05 alors l'hypothèse nulle selon laquelle les données étaient issues d'une population normalement distribuée n'a pas été rejetée. Le cas échéant, la significativité des différences entre les moyennes a été vérifiée avec un test paramétrique t de Student. Dans le cas contraire ou lorsque les échantillons étaient très petits (p. ex. $n = 4$), un test non paramétrique U de Mann-Whitney a été effectué. Que ce soit à l'issue d'un test t ou d'un test U , les différences ont alors été considérées significatives si p était inférieur à 0,05.

En outre, les courbes représentant, en fonction du temps, le pourcentage d'individus morts, métamorphosés ou mature des populations exposées ont été comparées avec la courbe des populations témoins correspondantes à l'aide d'un test de survie de Kaplan-Meyer. Ce dernier a ainsi permis de tester statistiquement des différences entre les courbes dans leur ensemble.

3.3 Résultats

La lecture des résultats est présentée par génération, en commençant par la génération parentale exposée puis la descendance non exposée. Les individus de la génération parentale F0 sont notés $F0.X$ avec X la condition d'exposition. De même, les individus de la génération F1 sont notés $F1.X$ avec X la condition d'exposition des géniteurs de la génération F0. Le terme X peut alors prendre quatre valeurs distinctes : \emptyset pour les témoins, B pour le BaP, T pour le TCS et M pour le mélange BaP/TCS (Figure 3.6).

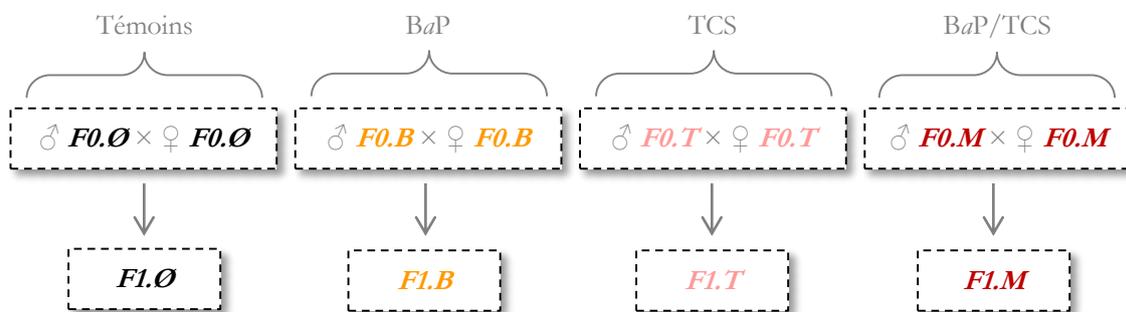


Figure 3.6 : Nomenclature adoptée pour l'identification des individus des générations F0 et F1 lors de ce chapitre

3.3.1 Mesures des concentrations réelles en BaP et TCS dans les milieux d'exposition

Les concentrations en BaP et en TCS mesurées les milieux sans xénopes sont proches des concentrations théoriques attendues (200 ng.L^{-1} après un renouvellement d'eau complet) et constantes pendant les 24 h. (Tableau 3.8). Les dosages réalisés quotidiennement sur une semaine après ajout de xénopes ont confirmé une concentration moyenne hebdomadaire en polluant d'environ 50 ng.L^{-1} .

Tableau 3.8 : Évolution aux cours du temps des concentrations de polluant dans les milieux contaminés

	Concentration dans le milieu (ng.L ⁻¹)		
	Temps depuis le renouvellement du milieu		
	Sans <i>Xenopus tropicalis</i>		
	1 h	4 h	24 h
BaP	201,9 ± 1,1	205,9 ± 6,7	210,1 ± 2,8
BaP en mélange	216,7 ± 0,1	216,9 ± 8,1	205,0 ± 2,3
TCS	239,7 ± 0,1	225,8 ± 2,2	222,4 ± 3,3
TCS en mélange	226,4 ± 0,3	233,1 ± 1,6	233,5 ± 5,3

Note : la concentration théorique attendue après un renouvellement d'eau est de 200 ng.L⁻¹. Les valeurs représentent une moyenne de deux dosages ± SEM.

3.3.2 Effets du BaP et du TCS sur le développement et la croissance des xénopes de la génération F0

3.3.2.1 Sur les malformations et la mortalité

Durant la phase têtard quelques individus malformés, exclusivement du type courbure axiale, ont été observés (Figure 3.7). Cependant ce suivi n'a révélé aucune différence statistique en lien avec la contamination aux perturbateurs endocriniens. En effet trop peu d'individus ont développé ce type de malformations (11,0 % du total d'individus à la métamorphose, toutes les expositions confondues). En outre, les individus F0.Ø (11,8 %) étaient également concernés (Tableau 3.9).

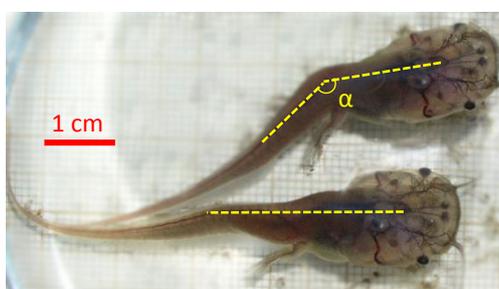


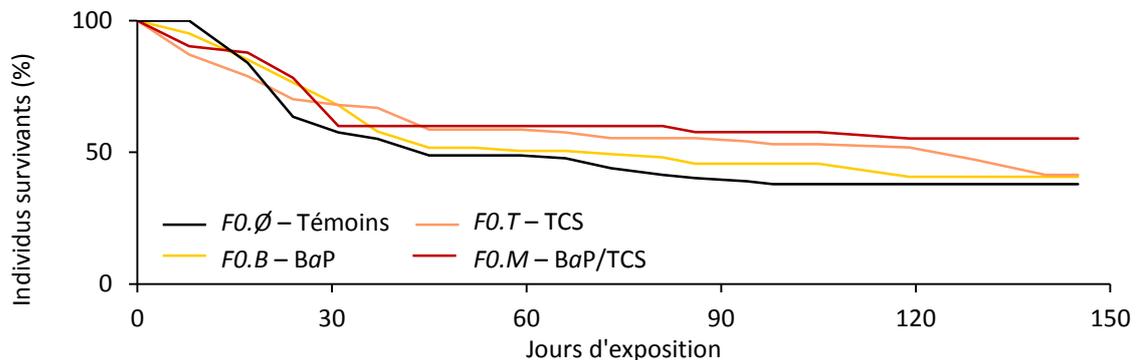
Figure 3.7 : Têtard malformé de type courbure axiale (en haut) et têtard sans malformation. L'angle α ($< 180^\circ$) de courbure est décrit par l'axe du rachis dans sa partie crâniale et l'axe caudal dans sa partie proximale (photographie C. Regnault).

Tableau 3.9 : Malformations du rachis chez les têtards exposés aux perturbateurs endocriniens

Exposition	Têtards malformés / têtards totaux ¹	%	Angle α de courbure ²
<i>F0.Ø</i> (témoins)	4 / 34	11,8	133,3° ± 6,6
<i>F0.B</i> (BaP)	4 / 38	10,5	127,4° ± 6,7
<i>F0.T</i> (TCS)	5 / 39	12,8	135,5° ± 6,5
<i>F0.M</i> (BaP/TCS)	3 / 34	8,8	127,7° ± 9,2

Notes : ¹Le nombre total équivaut au nombre de xénopes métamorphosés. ²L'angle α est décrit par l'axe du rachis dans sa partie crâniale et l'axe caudal dans sa partie proximale (Figure 3.8). Les valeurs d'angle expriment une moyenne ± SEM.

Au cours de la phase têtard, 62,1 %, 59,3 %, 58,6 % et 44,8 % des individus *F0.Ø*, *F0.B*, *F0.T* et *F0.M* sont morts (Figure 3.8). Malgré l'apparente meilleure survie des individus *F0.M* exposés au mélange de perturbateurs endocriniens, le suivi de la mortalité n'a pas révélé d'effet significatif des différentes expositions aux contaminants (test de survie de Kaplan-Meier). Aucune mortalité d'individus postmétamorphiques n'a été observée.

**Figure 3.8 : Survie des xénopes de la génération F0 au cours de l'exposition aux perturbateurs endocriniens**

3.3.2.2 Sur la métamorphose

Au total, 131 xénopes se sont métamorphosés au cours de notre expérimentation (Tableau 3.10). La métamorphose a été étudiée suivant différents paramètres tels que le temps de métamorphose. Cette durée est définie comme le nombre de jours entre le début de l'exposition et la fin de la métamorphose de la totalité des individus des quatre populations de xénopes *F0.Ø*, *F0.B*, *F0.T* et *F0.M* (Figure 3.9)

Tableau 3.10 : Effectifs de xénopes de la génération F0 ayant atteint et terminé leur métamorphose

Nombre de <i>Xenopus tropicalis</i> métamorphosés	
Exposition	Effectif
<i>F0.Ø</i> (témoins)	34
<i>F0.B</i> (BaP)	38
<i>F0.T</i> (TCS)	39
<i>F0.M</i> (BaP/TCS)	34
Total	131

En ce qui concerne le déclenchement de la métamorphose, les individus *F0.M* ont été les plus précoces. En effet, les premiers individus ont terminé leur métamorphose après 45 jours d'exposition alors que les premiers individus *F0.Ø*, *F0.B* et *F0.T* métamorphosés sont apparus après 66 jours d'exposition (Figure 3.9).

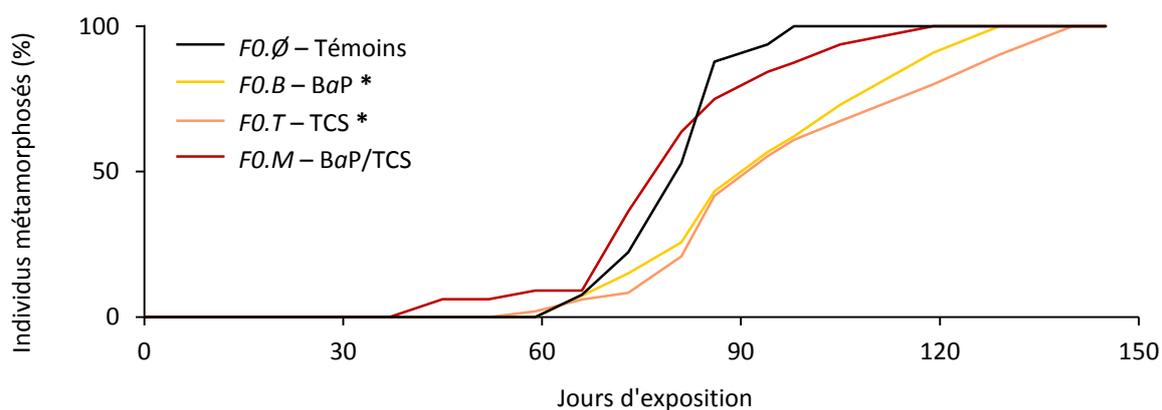


Figure 3.9 : Effets des perturbateurs endocriniens sur l'âge des xénopes de la génération F0 à la métamorphose. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le test de survie de Kaplan-Meier, les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin *F0.Ø* : *, $p < 0.05$.

Après 81 jours, plus de 50 % des individus *F0.Ø* et *F0.M* étaient métamorphosés. Ce score a été atteint seulement 15 jours plus tard pour les individus *F0.B* et *F0.T*. La durée nécessaire pour que les derniers individus se métamorphosent a été également très différente selon les conditions d'exposition, soit respectivement 98, 119, 129 et 140 jours pour les xénopes *F0.Ø*, *F0.M*, *F0.B* et *F0.T*. Enfin, le test de Kaplan-Meier a permis d'identifier un retard significatif de la métamorphose des individus *F0.B* et *F0.T* par rapport aux individus *F0.Ø* et *F0.M* (Figure 3.9).

La métamorphose a aussi été étudiée au travers des caractéristiques morphologiques des individus tout juste métamorphosés. Aucune différence significative n'a été observée quant à la taille des individus ($16,7 \pm 0,5$ mm du museau au cloaque), leur masse ($2\,066 \pm 87$ mg) ou leur indice de corpulence ($0,54 \pm 0,03$ mg.mm⁻³) (Tableau 3.11).

Tableau 3.11 : Mesures biométriques sur les xénopes métamorphosés de la génération F0

Exposition	<i>n</i>	Taille (mm)	Masse (mg)	Indice de corpulence (mg.mm ⁻³)
<i>F0.Ø</i> (témoins)	34	$17,9 \pm 0,9$	$2\,357 \pm 170$	$0,49 \pm 0,05$
<i>F0.B</i> (BaP)	38	$15,6 \pm 1,0$	$1\,800 \pm 182$	$0,59 \pm 0,06$
<i>F0.T</i> (TCS)	39	$15,7 \pm 0,9$	$1\,936 \pm 173$	$0,58 \pm 0,04$
<i>F0.M</i> (BaP/TCS)	34	$17,9 \pm 1,0$	$2\,217 \pm 156$	$0,48 \pm 0,05$

Note : *n* correspond au nombre de xénopes métamorphosés. La taille représente la distance museau/cloaque. Les valeurs de biométrie expriment une moyenne \pm SEM.

3.3.3 Effets du BaP et du TCS sur le profil transcriptionnel hépatique des femelles de la génération F0

Le séquençage des transcriptomes hépatiques des femelles *F0.Ø*, *F0.B*, *F0.T* et *F0.M* a produit en moyenne 34, 40, 37 et 47 millions de séquences par échantillon. Après le filtrage qualitatif des données, entre 92 % pour *F0.Ø*, *F0.B* et *F0.T* et 87 % *F0.M* pour de ces séquences ont été conservées pour la poursuite de l'analyse (Tableau 3.12). L'alignement des séquences sur le génome de référence a été relativement efficace, avec 80 % de séquences alignées pour *F0.Ø*, *F0.B* et *F0.T* et 72 % pour *F0.M*, représentant en moyenne 27, 32, 30 et 34 millions de séquences alignées à un site unique sur le génome.

L'analyse des niveaux différentiels de transcription des gènes a mis en évidence une transcription différentielle de 321 gènes chez les femelles *F0.B*, de 120 gènes chez les femelles *F0.T* et de 123 gènes chez les femelles *F0.M* ($0,56 >$ ratio de transcription $> 1,50$). Ceci a représenté respectivement 3,4 %, 1,3 % et 1,3 % du nombre total de gènes détectés dans les trois études (Figure 3.10.A). Si la majorité de ces gènes ont été sous-transcrits chez les femelles *F0.B* (60 %) ce n'est en revanche pas le cas chez les femelles *F0.T* (44 %) et *F0.M* (22 %). Les listes des gènes différentiellement transcrits ont présenté des similitudes entre les conditions d'exposition, avec 41, 19 et 32 gènes partagé par *F0.B/F0.T*, *F0.B/F0.M* et *F0.T/F0.M*. Ces gènes n'ont pas été en revanche très redondants puisque seulement neuf d'entre eux ont été retrouvés différentiellement transcrits de façon concomitante dans les transcriptomes issus des trois conditions d'exposition (Figure 3.10.B).

Tableau 3.12 : Données du séquençage, du filtrage qualitatif et de l'alignement des séquences.

F0.Ø (témoins)								
	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4	
	Nb de séquences	%						
Séquences non filtrées	32 595 287	100	29 184 085	100	37 961 365	100	35 090 894	100
Filtrage qualitatif	29 804 950	91,4	26 442 065	90,6	34 832 093	91,8	32 588 372	92,9
Séquences alignées sur le génome	26 164 764	80,3	22 776 915	78,0	30 693 296	80,9	28 321 971	80,7

F0.B (BaP)								
	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4	
	Nb de séquences	%						
Séquences non filtrées	33 955 202	100	32 985 664	100	45 972 211	100	45 387 426	100
Filtrage qualitatif	31 440 886	92,6	30 166 117	91,5	42 142 881	91,7	41 650 788	91,8
Séquences alignées sur le génome	27 279 109	80,3	26 508 155	80,4	37 022 121	80,5	36 474 734	80,4

F0.T (TCS)								
	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4	
	Nb de séquences	%						
Séquences non filtrées	33 437 275	100	34 470 720	100	38 497 903	100	43 375 936	100
Filtrage qualitatif	30 607 073	91,5	31 591 202	91,6	35 454 067	92,1	39 629 648	91,4
Séquences alignées sur le génome	26 886 447	80,4	27 696 308	80,3	31 008 582	80,5	34 608 663	79,8

F0.M (BaP/TCS)								
	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3		Réplica 4	
	Nb de séquences	%						
Séquences non filtrées	44 990 300	100	38 765 901	100	56 270 217	100	48 424 142	100
Filtrage qualitatif	33 213 290	87,6	33 213 290	85,7	49 315 490	87,6	42 218 754	87,2
Séquences alignées sur le génome	27 053 546	72,1	27 053 546	69,8	40 839 520	72,6	34 862 313	72,0

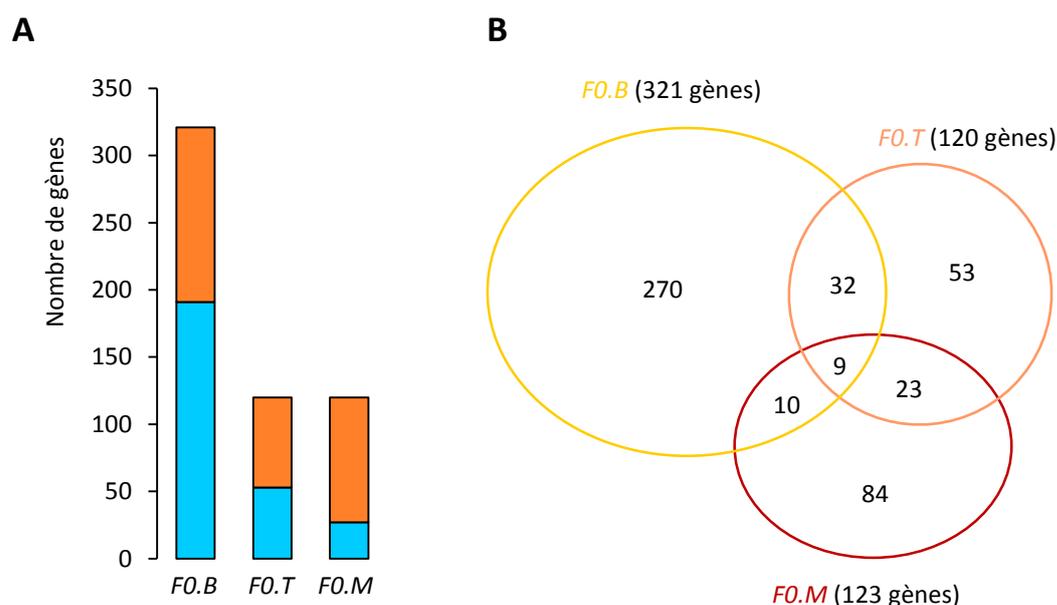


Figure 3.10 : Transcription différentielle des gènes chez les femelles exposées aux perturbateurs endocriniens. A. Comparaison du nombre de gènes sur-transcrits (orange, ratio de transcription $> 1,50$) et sous-transcrits (bleu, ratio de transcription $< 0,56$) dans les différentes conditions d'exposition. **B.** Diagramme de Venn représentant le nombre de gènes différentiellement transcrits en commun entre les différentes conditions étudiées. La surface des ellipses est proportionnel au nombre de gènes représentés.

Le détail de la transcription différentielle des gènes ainsi que leur homologue dans le génome d'*Homo sapiens* sont présentés dans leur totalité dans les annexes II, III et IV de ce mémoire de thèse. Sur les 9 310 gènes détectés sur le génome de *Xenopus tropicalis*, 8 330 gènes ont été convertis en leurs homologues sur le génome d'*Homo sapiens* (90 %). En revanche, la conversion de chacun des 481 gènes retrouvés différentiellement transcrits a été complète.

L'outil d'analyse d'enrichissement DAVID associé à la base de données métabolique KEGG n'a pas été aussi informatif que lors de notre première étude sur l'exposition à court terme des xénopes femelles au BaP (Chapitre 2.2). L'outil DAVID a donc été utilisé en association avec la base métabolique de termes GO. Les voies métaboliques enrichies dans notre jeu de données ont été résumées à l'aide de l'outil en ligne REViGO et sont présentées dans les tableaux 3.13 (F0.B), 3.14 (F0.M) et 3.15 (F0.T). Cette démarche par enrichissement, qui s'était révélée intéressante lors de notre première étude à court terme (Chapitre 2.2), est apparue ici moins fructueuse, un des problèmes associés à ces résultats provenant de la définition même de chaque terme GO. En effet, certains termes caractérisent des voies

métaboliques de précisions variables mais couramment étudiées en tant qu'entités propres (p. ex. *Apoptotic signaling pathway*, *Carboxylic acid biosynthetic process* ou *Steroid metabolic process*, Tableaux 3.12 et 3.13). À contrario, d'autres référencent des processus biologiques plus globaux, davantage génériques donc moins spécialisés (p. ex. *Excretion*, *Oxidation-reduction process*, *Homeostatic process* ou *Digestion*, Tableaux 3.12 et 3.14). Enfin, malgré l'utilisation de REViGO certains termes GO restent encore très imbriqués ou redondants voire totalement superposables (p. ex. *Neutral lipid metabolic process* et *Triglyceride metabolic process*, Tableau 3.14 ou encore *Regulation of secretion* et *Secretion*, Tableau 3.12 ou *Cellular di-, tri-valent inorganic cation homeostasis* et *Di-, tri-valent inorganic cation homeostasis*, Tableau 3.14). Cela s'observe enfin par le nombre de gènes différents concernés par l'enrichissement. Seulement 36 % des gènes (117) retrouvés différentiellement transcrits dans l'analyse du transcriptome des femelles *F0.B* ont participé à cet enrichissement des voies métaboliques. Ce taux est encore moindre en ce qui concerne les analyses des transcriptomes des femelles *F0.T* (23 %, 27 gènes) et *F0.M* (10 %, 12 gènes).

Le manque de représentativité de la démarche par enrichissement nous a encouragés à effectuer une analyse bibliographique et une assignation manuelle à différentes catégories fonctionnelles de chacun des 481 gènes retrouvés différentiellement transcrits dans l'analyse des trois transcriptomes *F0.B*, *F0.T* et *F0.M*.

Tableau 3.13 : Voies métaboliques enrichies parmi les gènes trouvés différentiellement transcrits entre les femelles témoins F0.Ø et les femelles exposées au BaP F0.B.

Voie métabolique		Nombre de gènes	Enrichissement	p-valeur (Fischer)	
Terme GO	Description				
Sur-transcrit	0002475	<i>Antigen processing and presentation via MHC class Ib</i>	8	41,73	0,04666
	0032230	<i>Positive regulation of synaptic transmission, GABAergic</i>	4	41,73	0,04666
	0007588	<i>Excretion</i>	4	11,05	0,02879
	0097190	<i>Apoptotic signaling pathway</i>	15	5,11	0,04173
	0051046	<i>Regulation of secretion</i>	5	4,89	0,01803
	0046903	<i>Secretion</i>	6	3,13	0,04067
	0045892	<i>Negative regulation of transcription, DNA-templated</i>	8	2,91	0,01853
	0043933	<i>Macromolecular complex subunit organization</i>	14	2,07	0,01516
Sous-transcrit	0006613	<i>Cotranslational protein targeting to membrane</i>	5	18,13	0,00010
	0006518	<i>Peptide metabolic process</i>	6	5,98	0,00292
	0006986	<i>Response to unfolded protein</i>	7	5,58	0,00138
	0046394	<i>Carboxylic acid biosynthetic process</i>	10	4,20	0,00054
	0006457	<i>Protein folding</i>	12	3,99	0,00017
	0008202	<i>Steroid metabolic process</i>	17	3,80	0,00113
	0055114	<i>Oxidation-reduction process</i>	25	2,52	0,00003
	0042592	<i>Homeostatic process</i>	19	2,23	0,00180

Tableau 3.14 : Voies métaboliques enrichies parmi les gènes trouvés différentiellement transcrits entre les femelles témoins F0.Ø et les femelles exposées F0.M.

Voie métabolique		Nombre de gènes	Enrichissement	p-valeur (Fischer)	
Terme GO	Description				
Sur-transcrit	0007292	<i>Female gamete generation</i>	5	9,11	0,00153
	0008202	<i>Steroid metabolic process</i>	7	5,47	0,04122

Tableau 3.15 : Voies métaboliques enrichies parmi les gènes trouvés différentiellement transcrits entre les femelles témoins F0.Ø et les femelles exposées au TCS F0.T.

Voie métabolique		Nombre de gènes	Enrichissement	p-valeur (Fischer)	
Terme GO	Description				
Sur-transcrit	0042743	<i>Hydrogen peroxide metabolic process</i>	3	22,28	0,00742
	0006641	<i>Triglyceride metabolic process</i>	3	14,85	0,01636
	0006638	<i>Neutral lipid metabolic process</i>	3	13,20	0,02049
	0006662	<i>Glycerol ether metabolic process</i>	3	12,29	0,02345
	0018904	<i>Organic ether metabolic process</i>	3	11,88	0,02500
	0006800	<i>Oxygen and reactive oxygen species metabolic process</i>	3	9,90	0,03509
	0031589	<i>Cell-substrate adhesion</i>	3	8,49	0,04650
	0008202	<i>Steroid metabolic process</i>	3	6,79	0,00160
Sous-transcrit	0030573	<i>Bile acid catabolic process</i>	2	97,03	0,01996
	0051238	<i>Sequestering of metal ion</i>	2	72,78	0,02653
	0007586	<i>Digestion</i>	3	17,47	0,01190
	0051235	<i>Maintenance of location</i>	6	12,84	0,02143
	0052548	<i>Regulation of endopeptidase activity</i>	3	10,40	0,03181
	0030005	<i>Cellular di-, tri-valent inorganic cation homeostasis</i>	4	7,76	0,01346
	0055066	<i>Di-, tri-valent inorganic cation homeostasis</i>	4	6,93	0,01822
	0006457	<i>Protein folding</i>	4	4,85	0,04558
0051726	<i>Regulation of cell cycle</i>	5	3,62	0,04421	

L'analyse gène par gène a révélé une cohorte importante de gènes liés à des voies métaboliques et des processus biologiques déjà rencontrés dans nos études précédentes. La liste des gènes, leur niveau de transcription et les voies métaboliques associées sont présentées dans les tableaux 3.16 (*F0.B*), 3.17 (*F0.T*) et 3.18 (*F0.M*). Les principales voies métaboliques affectées par les gènes retrouvés différemment transcrits par rapport aux témoins concernent celles des métabolismes lipidique et glucidique. Alors que la plupart des gènes (64 %) associés à ces voies sont apparus sous-transcrits dans le transcriptome *F0.B*, la grande majorité a été trouvée sur-transcrite dans les transcriptomes *F0.T* (80 %) et *F0.M* (86 %).

À l'exception du gène *G6PC* retrouvé sur-transcrit dans les trois transcriptomes *F0.B* ($\times 6,80$; Tableau 3.16) *F0.T* ($\times 2,54$; Tableau 3.17) et *F0.M* ($\times 1,85$; Tableau 3.18), les gènes impliqués dans le métabolisme glucidique n'interviennent pas directement dans les voies principales telles que la glycolyse ou la néoglucogenèse. Cependant, certains récepteurs nucléaires liés à la régulation de la néoglucogenèse ont été retrouvés fortement sur-transcrits chez les femelles exposées au BaP (*NR4A1*, $\times 6,67$ et *NR4A2*, $\times 13,99$; Tableau 3.16). Enfin, chez ces mêmes femelles, le gène *C/EBPa*, classé dans la catégorie « régulateur de transcription » et décrit comme régulateur de la néoglucogenèse, a été trouvé sous-transcrit (Tableau 3.16). Les autres gènes du métabolisme glucidique sont impliqués dans des branches secondaires telles que la voie des hétéroaminases (*GFPT1*, Tableau 3.16) ou des pentoses phosphates (*RGN*, Tableau 3.16 ; *ALDOA*, Tableau 3.17).

Les gènes classés dans la catégorie « métabolisme lipidique » interviennent majoritairement dans le métabolisme des acides gras et des triglycérides (*ACSS2.2*, *PNPLA3*, *FADS2*, *MGAT2*, *EVOLV2* et *CPT1B*, Tableau 3.16 ; *LIPE*, Tableaux 3.17 et 3.18 ; *FABP1*, Tableau 3.18). En moyenne ils sont apparus trois fois moins transcrits chez les femelles *F0.B* que chez les femelles témoins alors que chez les femelles *F0.T* et *F0.M*, au contraire, ils ont été trois fois plus transcrits. La deuxième voie représentée dans le métabolisme lipidique est la voie des stéroïdes elle-même subdivisée en voie des hormones stéroïdiennes (*HSD11B1*, Tableau 3.16 ; *AKR1D1*, Tableaux 3.16 et 3.17 ; *CYP3A5*, Tableaux 3.16 et 3.18) et voie des stérols (principalement cholestérol : *SCARB1*, *LSS* et *HDLBP*, Tableau 3.16 ; *DHCR7*, Tableau 3.17 ; *SCAP*, Tableau 3.18). Comme pour les gènes impliqués dans la voie des acides gras, les gènes associés à la voie du cholestérol ont été trouvés trois fois moins transcrits chez les femelles *F0.B* et trois fois plus transcrits chez les femelles *F0.T* et *F0.M* comparativement aux témoins.

La catégorie « système immunitaire » intègre principalement des gènes liés aux processus inflammatoires (*DUSP6*, *PDLA3*, *VASP*, *GADD45G*, *VEGFC*, *CD3E* et *SUSD1*, Tableau 3.16 ; *CD40*, Tableaux 3.16 et 3.18 ; *NFKBIZ*, Tableau 3.18). Aucun gène impliqué dans ces processus n'est apparu différenciellement transcrit chez les femelles *F0.T* mais ils ont en revanche été trouvés sous-transcrits chez les femelles *F0.B* et *F0.M*. Les autres gènes associés à cette catégorie concernent des réponses du système immunitaire inné (*FCN1*, Tableau 3.17), envers des pathogènes intracellulaires (*CARD9*, Tableau 3.18) ou des ARN viraux (*IFIT1*, Tableau 3.16). Ils sont apparus sur-transcrits dans les trois transcriptomes.

Dans l'ensemble des trois transcriptomes, deux gènes impliqués dans les fonctions mitochondriales ont été trouvés différenciellement transcrits. Chez les femelles exposées au BaP, la transcription de *BCSL1* a été multipliée 2,53 fois (Tableau 3.16) alors que chez les femelles exposées au TCS, la transcription d'*UPC2* a été divisée 3,33 fois (Tableau 3.17). De manière intéressante, chez les femelles exposées au mélange BaP/TCS, *BCSL1* a également été retrouvé sur-transcrit ($\times 2,55$) et *UPC2* sous-transcrit ($\div 5,26$, Tableau 3.18).

Certaines catégories sont présentes dans deux transcriptomes et absentes dans le troisième. C'est notamment le cas des gènes associés au réticulum endoplasmique et des gènes impliqués dans les jonctions cellulaires. Les premiers sont apparus sous-transcrits dans les transcriptomes *F0.B* et *F0.T* et non différenciellement transcrits dans le transcriptome *F0.M*. Cette catégorie regroupe des gènes impliqués dans la fixation ou dans la translocation et le transport de protéines ou de vésicules au sein du réticulum endoplasmique (*TRAM1*, *SSR1*, *SEC61B*, *AHSA1*, *HERPUD1*, *IER3IP1*, *REEP6* et *SSR4*, Tableaux 3.16 ; *BET1*, *HSPA5*, *HSP90B1* et *CALR*, Tableaux 3.16 et 3.17). La transcription des gènes différenciellement transcrits et impliqués dans les jonctions cellulaires a été significativement diminuée chez les femelles *F0.B* et *F0.M* (*GJB2* et *VMP1*, Tableau 3.16 ; *CLDN6.2*, Tableau 3.18) et absents des femelles *F0.T*.

Enfin, deux gènes impliqués dans des processus apoptotiques ont été trouvés plus de deux fois sur-transcrits chez les femelles exposées au BaP (*FAS* et *RBBP6*, Tableau 3.16).

Tableau 3.16 : Ratio de transcription (RT) et catégorie associée de gènes sous-transcrits (bleu) et sur-transcrits (orange) issus du transcriptome hépatique des femelles *F0.B*.

No Ensembl <i>X. tropicalis</i>	Nom	RT	Description	Catégorie	Référence
ENSXETG00000008199	<i>GFPT1</i>	0,24	<i>Glutamine-Fructose-6-Phosphate Transaminase 1</i>	Métabolisme glucidique	(Buse, 2006)
ENSXETG00000004127	<i>RGN</i>	0,41	<i>Regucalcin (Senescence Marker Protein-30)</i>	Métabolisme glucidique	(Yamaguchi, 2014)
ENSXETG00000002876	<i>IGF3</i>	0,48	<i>Insulin-like growth factor 3</i>	Métabolisme glucidique	(Li <i>et al.</i> , 2012)
ENSXETG00000000579	<i>NR4A1</i>	6,67	<i>Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A, Member 1</i>	Métabolisme glucidique	(Li <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000024588	<i>G6PC</i>	6,80	<i>Glucose-6-Phosphatase, Catalytic</i>	Métabolisme glucidique	(Regnault <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000031753	<i>NR4A2</i>	13,99	<i>Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2</i>	Métabolisme glucidique	(Li <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000001195	<i>SCARB1</i>	0,14	<i>Scavenger Receptor Class B, Member 1</i>	Métabolisme lipidique	(Xin <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000004291	<i>ACSS2.2</i>	0,24	<i>Acyl-Coa Synthetase Short-Chain 2.2</i>	Métabolisme lipidique	(Li <i>et al.</i> , 2010)
ENSXETG00000004865	<i>PNPLA3</i>	0,26	<i>Patatin-like phospholipase domain containing 3</i>	Métabolisme lipidique	(Maglio <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000016587	<i>HMGCS1</i>	0,31	<i>3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa Synthase 1 (Soluble)</i>	Métabolisme lipidique	(Le Jossic-Corcus <i>et al.</i> , 2005)
ENSXETG00000009043	<i>FADS2</i>	0,34	<i>Fatty Acid Desaturase 2</i>	Métabolisme lipidique	(Arendt <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000009121	<i>MGAT2</i>	0,34	<i>Mannosyl-Glycoprotein Beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase</i>	Métabolisme lipidique	(Okuma <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000024641	<i>ELOVL2</i>	0,35	<i>Elovl Fatty Acid Elongase 2</i>	Métabolisme lipidique	(Xue <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000004899	<i>LSS</i>	0,41	<i>Lanosterol Synthase</i>	Métabolisme lipidique	(Dean <i>et al.</i> , 1967)
ENSXETG00000012164	<i>HDLBP</i>	0,43	<i>High Density Lipoprotein Binding Protein (Vigilin)</i>	Métabolisme lipidique	(Fidge, 1999)
ENSXETG00000026269	<i>AKR1D1</i>	0,44	<i>Aldo-Keto Reductase Family 1, Member D1</i>	Métabolisme lipidique	(Lake <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000008941	<i>HSD11B1</i>	0,46	<i>Hydroxysteroid (11-Beta) Dehydrogenase 1</i>	Métabolisme lipidique	(Moon <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000024487	<i>ACER2</i>	2,24	<i>Alkaline Ceramidase 2</i>	Métabolisme lipidique	(Mao and Obeid, 2008)
ENSXETG00000019540	<i>SPHK1</i>	2,27	<i>Sphingosine kinase 1</i>	Métabolisme lipidique	(Kwong <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000033940	<i>CYP3A5</i>	2,58	<i>Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 5</i>	Métabolisme lipidique	(Willrich <i>et al.</i> , 2008)
ENSXETG00000015426	<i>CPT1B</i>	2,84	<i>Carnitine Palmitoyltransferase 1B</i>	Métabolisme lipidique	(Xie <i>et al.</i> , 2010)
ENSXETG00000031916	<i>FAS</i>	2,11	<i>Fas cell surface death receptor precursor</i>	Processus apoptotique	(Estep <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000024429	<i>RBBP6</i>	2,36	<i>Retinoblastoma Binding Protein 6</i>	Processus apoptotique	(Pretorius <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000021871	<i>DUSP6</i>	0,47	<i>Dual Specificity Phosphatase 6</i>	Système immunitaire	(Matsumoto <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000004650	<i>PDLA3</i>	0,28	<i>Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 3</i>	Système immunitaire	(Zhang <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000018239	<i>VASP</i>	0,48	<i>Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein</i>	Système immunitaire	(Lastra <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000026537	<i>GADD45G</i>	2,15	<i>Growth Arrest And Dna-Damage-Inducible, Gamma</i>	Système immunitaire	(Xie <i>et al.</i> , 2010)
ENSXETG00000002447	<i>VEGFC</i>	2,65	<i>Vascular Endothelial Growth Factor C</i>	Système immunitaire	(Coulon <i>et al.</i> , 2012)
ENSXETG00000010119	<i>CD3E</i>	3,15	<i>T-cell surface glycoprotein CD3 epsilon chain</i>	Système immunitaire	(VanSaun <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000002215	<i>SUSD1</i>	3,33	<i>Sushi domain containing 1</i>	Système immunitaire	(Hall <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000033362	<i>CD40</i>	3,34	<i>CD40 antigen precursor</i>	Système immunitaire	(Souza <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000021822	<i>IFIT1</i>	3,97	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1</i>	Système immunitaire	(Younossi <i>et al.</i> , 2009)

Tableau 3.16 (suite) : Ratio de transcription (RT) et catégorie associée de gènes sous-transcrits (bleu) et sur-transcrits (orange) issus du transcriptome hépatique des femelles F0.B.

No Ensembl <i>X. tropicalis</i>	Nom	RT	Description	Catégorie	Référence
ENSXETG00000017861	<i>NFAT5</i>	0,33	<i>Nuclear Factor Of Activated T-Cells 5, Tonicity-Responsive</i>	Régulateur transcription	(Neuhofer, 2010)
ENSXETG00000018291	<i>C/EBPa</i>	0,33	<i>Ccaat/Enhancer Binding Protein Alpha</i>	Régulateur transcription	(Guzmán <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000020266	<i>BACH1</i>	2,84	<i>Basic Leucine Zipper Transcription Factor 1</i>	Régulateur transcription	(Inoue <i>et al.</i> , 2010)
ENSXETG00000016838	<i>HSPA5</i>	0,06	<i>Heat Shock 70Kda Protein 5 (Glucose-Regulated Protein, 78Kda)</i>	Réticulum endoplasmique	(Gawrieh <i>et al.</i> , 2010)
ENSXETG00000005359	<i>HSP90B1</i>	0,12	<i>Heat Shock Protein 90Kda Beta (Grp94), Member 1</i>	Réticulum endoplasmique	(Dai <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000007937	<i>CALR</i>	0,33	<i>Calreticulin</i>	Réticulum endoplasmique	(Michalak <i>et al.</i> , 1996)
ENSXETG00000015948	<i>TRAM1</i>	0,33	<i>Translocation Associated Membrane Protein 1</i>	Réticulum endoplasmique	(Tang <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000027380	<i>BET1</i>	0,40	<i>Blocked Early In Transport 1 Homolog</i>	Réticulum endoplasmique	(Suga <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000020431	<i>SSR1</i>	0,40	<i>Signal Sequence Receptor, Alpha</i>	Réticulum endoplasmique	(Kajimoto <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000027356	<i>SEC61B</i>	0,41	<i>Sec61 Beta Subunit</i>	Réticulum endoplasmique	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000011083	<i>AHSA1</i>	0,43	<i>Activator Of Heat Shock 90Kda Protein Atpase Homolog 1</i>	Réticulum endoplasmique	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000026099	<i>HERPUD1</i>	0,43	<i>Homocysteine-Inducible, Endoplasmic Reticulum Stress-Inducible, Ubiquitin-Like Domain Member 1</i>	Réticulum endoplasmique	(Ho and Chan, 2015)
ENSXETG00000021523	<i>IER3IP1</i>	0,45	<i>Immediate Early Response 3 Interacting Protein 1</i>	Réticulum endoplasmique	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000003708	<i>REEP6</i>	0,45	<i>Receptor Accessory Protein 6</i>	Réticulum endoplasmique	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000000730	<i>SSR4</i>	0,46	<i>Signal Sequence Receptor, Delta</i>	Réticulum endoplasmique	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000013844	<i>BCS1L</i>	2,53	<i>Bcs1-Like</i>	Fonction mitochondriale	(de Lonlay <i>et al.</i> , 2001)
ENSXETG00000026112	<i>GJB2</i>	0,47	<i>Gap Junction Protein, Beta 2, 26Kda</i>	Jonction cellulaire	(Harris and Locke, 2009)
ENSXETG00000010736	<i>VMP1</i>	0,49	<i>Vacuole Membrane Protein 1</i>	Jonction cellulaire	(Sauermann <i>et al.</i> , 2007)
ENSXETG00000007462	<i>VIM</i>	1,88	<i>Vimentin</i>	Métabolisme du collagène	(Challa and Stefanovic, 2011)
ENSXETG00000018279	<i>SLC7A10</i>	0,19	<i>Solute Carrier Family 7</i>	Autre	(Blackett and Sanghera, 2013)
ENSXETG00000004725	<i>TTR</i>	0,22	<i>Transthyretin</i>	Autre	(Bell <i>et al.</i> , 2010)
ENSXETG00000002592	<i>TXN</i>	0,29	<i>Thioredoxin</i>	Autre	(Duan <i>et al.</i> , 2010)
ENSXETG00000008940	<i>LAMB3</i>	0,34	<i>Laminin, Beta 3</i>	Autre	(Gorden <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG000000031495	<i>ACOX3</i>	0,44	<i>Acyl-Coenzyme A Oxidase</i>	Autre	(Mličková <i>et al.</i> , 2004)
ENSXETG00000002877	<i>PRMT1</i>	0,47	<i>Protein Arginine Methyltransferase 1</i>	Autre	(Park <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000010361	<i>PRDX4</i>	0,49	<i>Peroxiredoxin 4</i>	Autre	(Nabeshima <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000007561	<i>CAT</i>	2,06	<i>Catalase</i>	Autre	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000012083	<i>PANK4</i>	2,15	<i>Pantothenate Kinase 4</i>	Autre	(Li <i>et al.</i> , 2005)
ENSXETG00000024628	<i>HBG2</i>	3,18	<i>Hemoglobin, Gamma G</i>	Autre	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
ENSXETG00000025663	<i>HBA3</i>	3,57	<i>Hemoglobin Alpha 3 Subunit</i>	Autre	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
ENSXETG00000024626	<i>HBD</i>	6,18	<i>Hemoglobin, Delta</i>	Autre	(Liu <i>et al.</i> , 2011)

Tableau 3.17 : Ratio de transcription (RT) et catégorie associée de gènes sous-transcrits (bleu) et sur-transcrits (orange) issus du transcriptome hépatique des femelles *F0.T*.

No Ensembl <i>X. tropicalis</i>	Nom	RT	Description	Catégorie	Référence
ENSXETG00000020674	<i>ALDOA</i>	2,34	<i>Aldolase A, Fructose-Bisphosphate</i>	Métabolisme glucidique	(Shiokawa <i>et al.</i> , 2002)
ENSXETG00000024588	<i>G6PC</i>	2,54	<i>Glucose-6-Phosphatase, Catalytic</i>	Métabolisme glucidique	(Regnault <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000026269	<i>AKR1D1</i>	0,44	<i>Aldo-Keto Reductase Family 1, Member D1</i>	Métabolisme lipidique	(Lake <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000008945	<i>DHCR7</i>	2,75	<i>7-Dehydrocholesterol Reductase</i>	Métabolisme lipidique	(Gibson <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000012042	<i>LIPE</i>	3,24	<i>Lipase, Hormone-Sensitive</i>	Métabolisme lipidique	(Miksztoiwicz <i>et al.</i> , 2012)
ENSXETG00000001938	<i>FABP1</i>	4,17	<i>Fatty Acid Binding Protein 1</i>	Métabolisme lipidique	(Guzmán <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000013316	<i>BIRC7</i>	2,72	<i>baculoviral LAP repeat containing 7</i>	Processus apoptotique	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000002075	<i>KLF2</i>	2,52	<i>Kruppel-Like Factor 2</i>	Régulateur transcription	(Chen <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000007937	<i>CALR</i>	0,44	<i>Calreticulín</i>	Réticulum endoplasmique	(Michalak <i>et al.</i> , 1996)
ENSXETG00000016838	<i>HSPA5</i>	0,10	<i>Heat Shock 70Kda Protein 5 (Glucose-Regulated Protein, 78Kda)</i>	Réticulum endoplasmique	(Gawrieh <i>et al.</i> , 2010)
ENSXETG00000005359	<i>HSP90B1</i>	0,19	<i>Heat Shock Protein 90Kda Beta (Grp94), Member 1</i>	Réticulum endoplasmique	(Dai <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG000000027380	<i>BET1</i>	0,43	<i>Blocked Early In Transport 1 Homolog</i>	Réticulum endoplasmique	(Suga <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000026447	<i>UCP2</i>	0,30	<i>Uncoupling Protein 2 (Mitochondrial, Proton Carrier)</i>	Fonction mitochondriale	(Rousset <i>et al.</i> , 2004)
ENSXETG00000030649	<i>FCN1</i>	2,75	<i>Fcn1 Protein</i>	Système immunitaire	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000002877	<i>PRMT1</i>	0,46	<i>Protein Arginine Methyltransferase 1</i>	Autre	(Park <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000007787	<i>MPO</i>	2,67	<i>Myeloperoxidase</i>	Autre	(Rensen <i>et al.</i> , 2008)

Tableau 3.18 : Ratio de transcription (RT) et catégorie associée de gènes sous-transcrits (bleu) et sur-transcrits (orange) issus du transcriptome hépatique des femelles *F0.M*.

No Ensembl <i>X. tropicalis</i>	Nom	RT	Description	Catégorie	Référence
ENSXETG00000024588	<i>G6PC</i>	1,85	<i>Glucose-6-Phosphatase, Catalytic</i>	Métabolisme glucidique	(Regnault <i>et al.</i> , 2014)
ENSXETG00000026763	<i>CDIPT</i>	0,45	<i>Cdp-Diacylglycerol--Inositol 3-Phosphatidyltransferase</i>	Métabolisme lipidique	(Thakur <i>et al.</i> , 2011)
ENSXETG00000002292	<i>ACLY</i>	2,86	<i>Atp Citrate Lyase</i>	Métabolisme lipidique	(Pan <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000001938	<i>FABP1</i>	3,76	<i>Fatty Acid Binding Protein 1</i>	Métabolisme lipidique	(Guzmán <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000033940	<i>CYP3A5</i>	3,75	<i>Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 5</i>	Métabolisme lipidique	(Willrich <i>et al.</i> , 2008)
ENSXETG00000020354	<i>SCAP</i>	3,60	<i>Srebf Chaperone</i>	Métabolisme lipidique	(Moon <i>et al.</i> , 2012)
ENSXETG00000012042	<i>LIPE</i>	3,59	<i>Lipase, Hormone-Sensitive</i>	Métabolisme lipidique	(Miksztoiwicz <i>et al.</i> , 2012)
ENSXETG00000013316	<i>BIRC7</i>	4,21	<i>Baculoviral LAP repeat containing 7</i>	Système immunitaire	(UniProt consortium, 2015)
ENSXETG00000032514	<i>NFKBIZ</i>	2,12	<i>Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells Inhibitor, Zeta</i>	Système immunitaire	(Wu <i>et al.</i> , 2013)
ENSXETG00000000740	<i>CARD9</i>	2,43	<i>Caspase Recruitment Domain Family, Member 9</i>	Système immunitaire	(Ruland, 2008)
ENSXETG00000033362	<i>CD40</i>	4,02	<i>CD40 antigen precursor</i>	Système immunitaire	(Souza <i>et al.</i> , 2015)
ENSXETG00000013844	<i>BCS1L</i>	2,55	<i>Bcs1-Like</i>	Fonction mitochondriale	(de Lonlay <i>et al.</i> , 2001)
ENSXETG00000026447	<i>UCP2</i>	0,19	<i>Uncoupling Protein 2 (Mitochondrial, Proton Carrier)</i>	Fonction mitochondriale	(Rousset <i>et al.</i> , 2004)
ENSXETG00000027547	<i>CLDN6.2</i>	0,41	<i>Claudin 6, Gene 2</i>	Jonction cellulaire	(Meertens <i>et al.</i> , 2008)
ENSXETG00000027478	<i>ANXA1</i>	0,44	<i>Annexin A1</i>	Autre	(Locatelli <i>et al.</i> , 2014)

3.3.4 Effets du BaP et du TCS sur certains paramètres physiologiques des femelles de la génération F0

3.3.4.1 Perturbation du métabolisme hépatique

La pesée du foie et le calcul du rapport hépato-somatique ont montré une hypertrophie significative du foie des xénopes *F0.B* (1,7 fois), *F0T* (1,4 fois) et *F0.M* (1,3 fois) par rapport aux témoins *F0.Ø* (Figure 3.11).

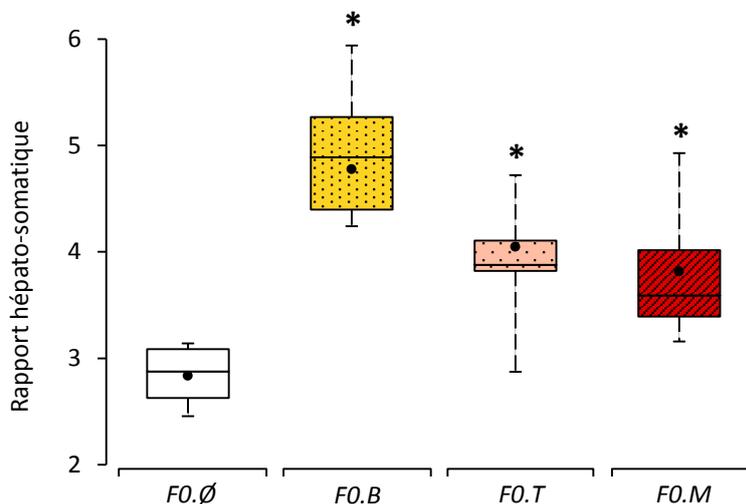


Figure 3.11 : Modification du rapport hépato-somatique chez les xénopes femelles exposées aux perturbateurs endocriniens. Les moyennes sont représentées par les points et les barres verticales mènent jusqu'aux valeurs minimale et maximale. Les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin *F0.Ø* : *, $p < 0,05$.

Les colorations des coupes histologiques de foie par l'huile rouge ont mis en évidence une stéatose hépatique significative chez les xénopes femelles exposées aux perturbateurs endocriniens (Figure 3.12). Le contenu hépatique en lipide a été respectivement multiplié 1,4 fois, 1,3 fois et 1,2 fois chez les femelles *F0.B*, *F0T* et *F0.M* par rapport aux témoins *F0.Ø* (Figure 3.13).

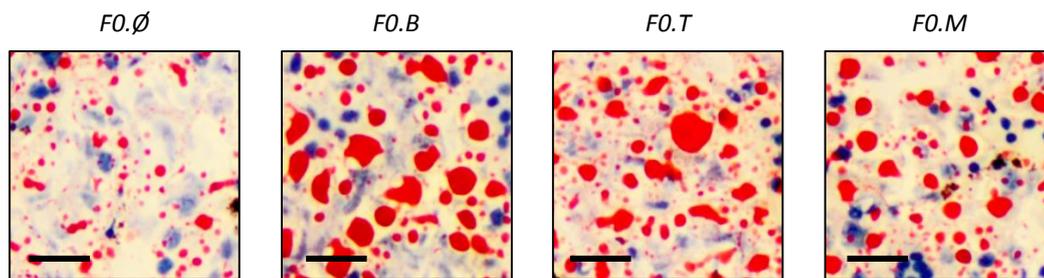


Figure 3.12 : Coloration huile rouge et mise en évidence du contenu hépatique en lipides neutres dans le foie des xénopes femelles témoins et exposées aux PE. Les lipides apparaissent sous forme de gouttelettes rouges. Les barres d'échelle correspondent à 30 μ m

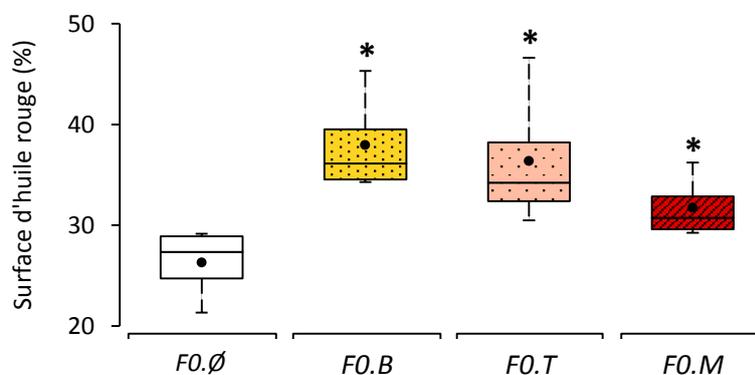


Figure 3.13 : Pourcentage surfacique d'huile rouge après coloration ORO dans le foie des xénopes femelles témoins et exposées aux PE. Les moyennes sont représentées par les points et les barres verticales mènent jusqu'aux valeurs minimale et maximale. Les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin FO.Ø : *, $p < 0,05$.

Les mesures de glycémie en fin d'exposition n'ont révélé aucun effet significatif des perturbateurs endocriniens (Figure 3.14). En revanche, lors du test de tolérance au glucose, le ratio entre la glycémie maximale atteinte et glycémie de base a été significativement plus élevé chez les xénopes femelles exposées FO.B ($\times 5,6$), FO.T ($\times 4,6$) et FO.M ($\times 5,7$) par rapport aux témoins FO.Ø ($\times 3,5$) (Figure 3.15.A). Cela s'est traduit par une augmentation significative (1,8 à 2,4 fois) des aires définies par les courbes de glycémie (Figure 3.15.B).

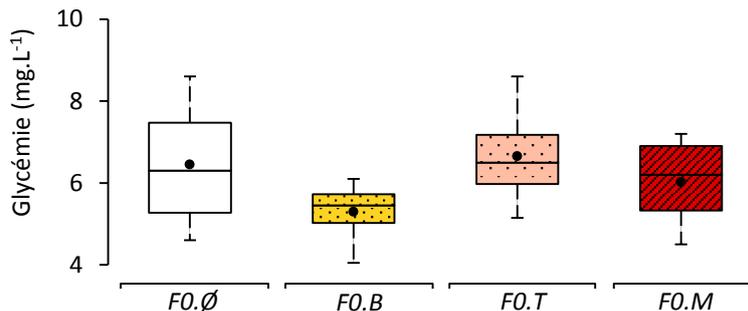


Figure 3.14 : Glycémie des xénopes femelles témoins et exposées aux perturbateurs endocriniens. Les moyennes sont représentées par les points et les barres verticales mènent jusqu'aux valeurs minimale et maximale.

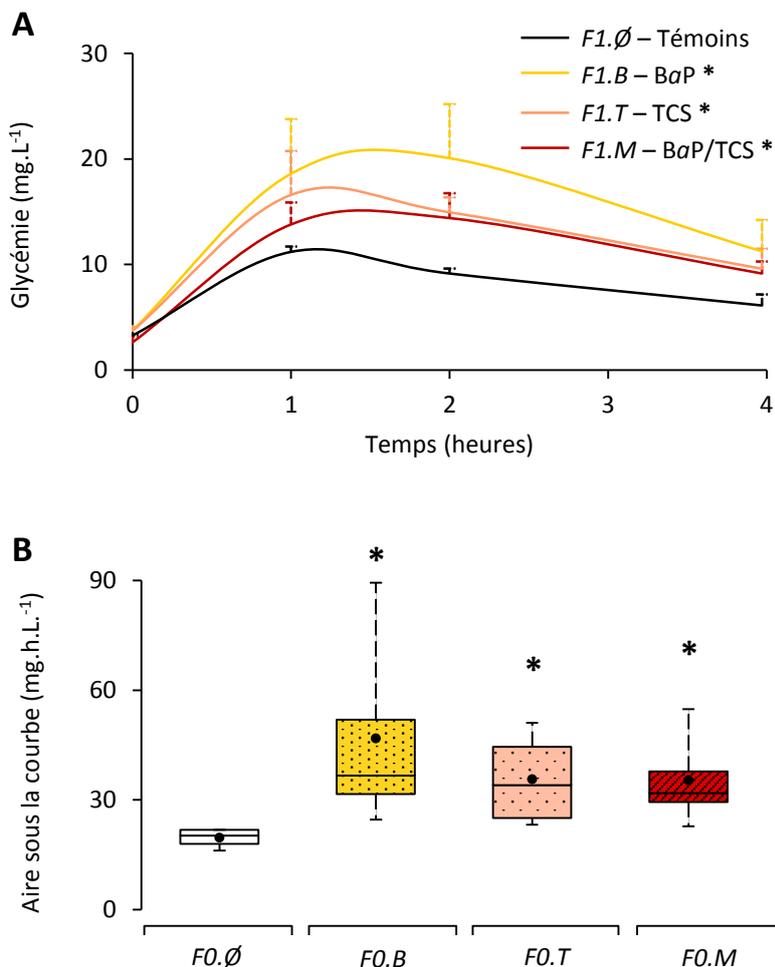


Figure 3.15 : Réponses au test de tolérance au glucose des xénopes femelles témoins et exposées aux PE. A. Courbes cinétiques de la glycémie après injection de glucose (1 mg.g^{-1}) B. Aires sous les courbes de glycémie. Les moyennes sont représentées par les points et les barres verticales mènent jusqu'aux valeurs minimale et maximale. Les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin $FO.\emptyset$: *, $p < 0,05$.

Les mesures de consommation mitochondriale de dioxygène sont présentées dans le tableau 3.19. La capacité oxydative mitochondriale lors de l'ajout des substrats respiratoires (état 2) a été significativement plus importante chez les xénopes femelles exposées aux perturbateurs endocriniens *F0.B* (3,6 fois), *F0.T* (2,0 fois) et *F0.M* (1,6 fois) que chez femelles témoins. Par rapport aux autres femelles, la consommation de dioxygène des mitochondries des femelles *F0.B* a été significativement augmentée (1,7 fois) lors des états phosphorylant (état 3) et découplé (état 5), suggérant un découplage mitochondrial plus important. Enfin, les contrôles respiratoires (RCR, état 3/état 2) issus des quatre conditions d'exposition ont été élevés et ont témoigné de la qualité et de la fonctionnalité de nos préparations mitochondriales. En revanche, les RCR calculés pour les mitochondries des femelles *F0.B*, *F0.T* et *F0.M* ont été significativement moins élevés que pour les femelles *F0.Ø*, témoignant d'une altération des mitochondries par l'exposition aux perturbateurs endocriniens.

Tableau 3.19 : Intensité respiratoire mitochondriale des xénopes femelles témoins et exposées aux PE

Exposition	Consommation de dioxygène ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$)			RCR
	État 2	État 3	État 5	
<i>F0.Ø</i> (témoins)	$0,40 \pm 0,02$	$3,90 \pm 0,49$	$4,18 \pm 0,65$	$9,72 \pm 0,83$
<i>F0.B</i> (BaP)	$1,41 \pm 0,38^*$	$6,00 \pm 0,26^*$	$7,68 \pm 0,48^*$	$5,32 \pm 1,01^*$
<i>F0.T</i> (TCS)	$0,80 \pm 0,10^*$	$3,68 \pm 0,97$	$4,18 \pm 1,25$	$4,43 \pm 0,78^*$
<i>F0.M</i> (BaP/TCS)	$0,65 \pm 0,05^*$	$3,45 \pm 0,53$	$4,80 \pm 1,21$	$5,52 \pm 0,93^*$

Note : État 2, après ajout des substrats respiratoires glutamate/malate/succinate ; État 3, état phosphorylant après ajout d'ADP ; État 5, état découplé après ajout de 2,4-dinitrophénol ; RCR, rapport de contrôle respiratoire état 3/état 2. Les valeurs expriment une moyenne \pm SEM. Les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin *F0.Ø* : *, $p < 0.05$.

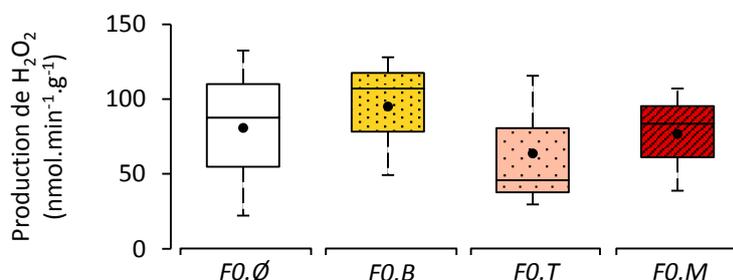


Figure 3.16 : Production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les xénopes femelles témoins et exposées aux PE. Les ROS sont représentées par la mesure quantitative en H_2O_2 . Les moyennes sont représentées par les points et les barres verticales mènent jusqu'aux valeurs minimale et maximale.

Aucun effet des perturbateurs endocriniens n'a été observé quant à la production mitochondriale d'espèces réactives de l'oxygène représentées par la mesure quantitative en H_2O_2 (Figure 3.16).

3.3.4.2 Hépatotoxicité

Les observations histologiques des foies colorés à l'hématoxyline-érythrosine ont révélé une désorganisation du tissu hépatique des xénopes femelles exposées aux perturbateurs endocriniens (Figure 3.17). Ces déstructurations ont été caractérisées par une détérioration des jonctions intercellulaires et une irrégularité de l'apparence cytoplasmique. Par ailleurs, l'activité de l'alanine aminotransférase sérique, utilisée comme marqueur de lyse hépatocellulaire, a été significativement augmentée chez les femelles *F0.B* (3,2 fois), *F0.T* (2,8 fois) et *F0.M* (2,8 fois) par rapport aux femelles témoins (Figure 3.18). Ceci confirme l'hépatotoxicité observée histologiquement.

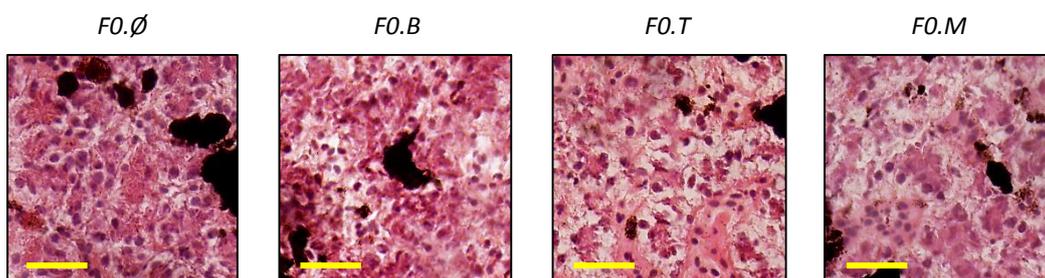


Figure 3.17 : Coloration hématoxyline-érythrosine et mise en évidence d'une altération de l'organisation histologique du foie des xénopes femelles exposées aux PE. Les zones sombres correspondent aux pigments synthétisés par des mélanomacrophages. Les barres d'échelle correspondent à 50 μm .

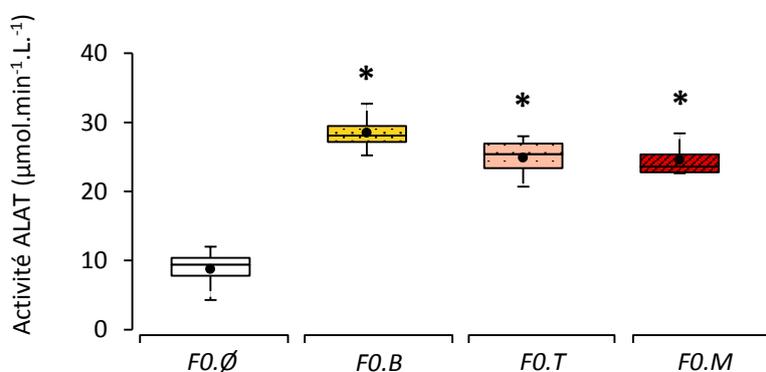


Figure 3.18 : Activité de l'alanine aminotransférase (ALAT) sérique des xénopes femelles témoins et exposées aux PE. Les moyennes sont représentées par les points et les barres verticales mènent jusqu'aux valeurs minimale et maximale. Les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin *F0.Ø* : *, $p < 0,05$.

3.3.5 Effets du BaP et du TCS sur la maturité sexuelle et la reproduction des xénopes de la génération F0

L'apparition des caractères sexuels secondaires (callosités nuptiales mâles ou papilles cloacales turgescentes femelles) a été suivie comme marquage de la maturité sexuelle des xénopes. Ils ont été observés vers le 145^{ème} jour après la métamorphose (140^{ème} pour les mâles, 148^{ème} pour les femelles), indépendamment des conditions d'exposition (Figure 3.19).

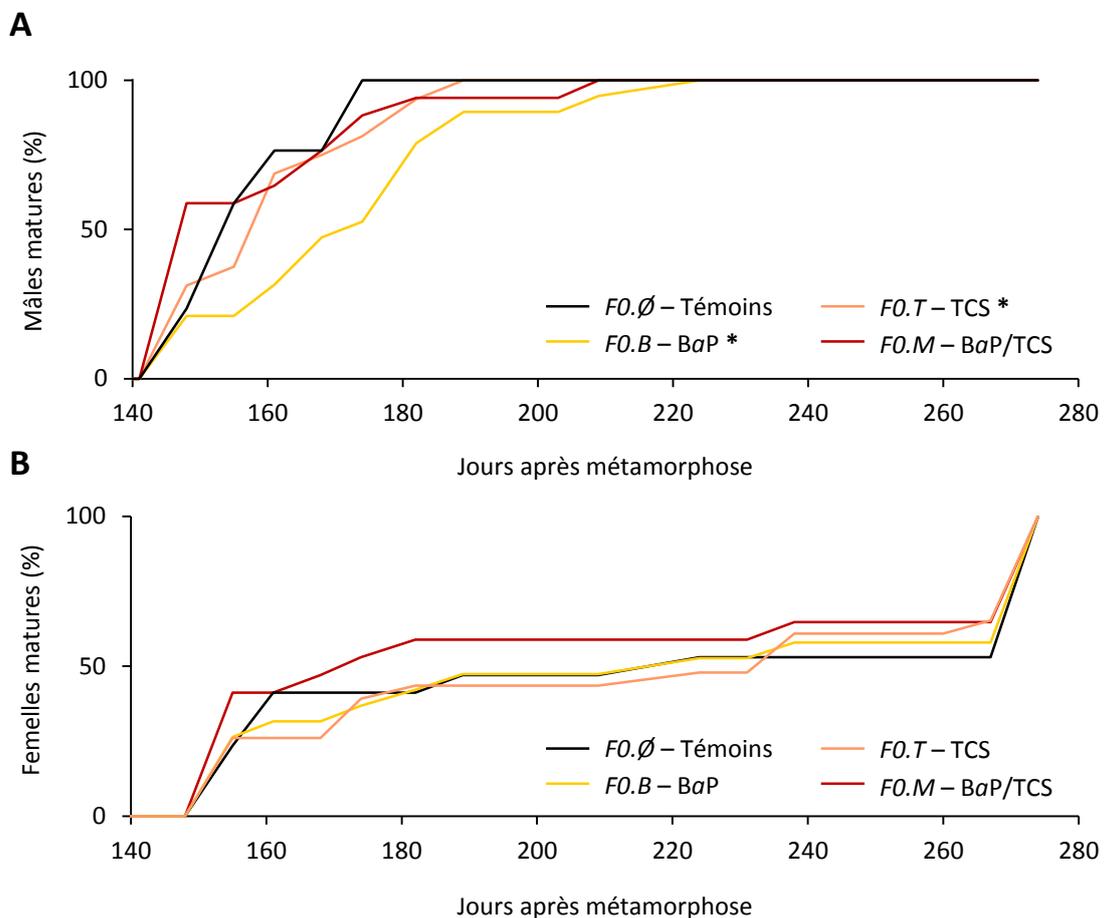


Figure 3.19 : Effets des perturbateurs endocriniens sur l'âge de la maturité des mâles (A) et des femelles (B) xénopes de la génération F0. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le test de Kaplan-Meier, les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin $F0.\emptyset$: *, $p < 0.05$.

Les mâles ont atteint la maturité sexuelle plus rapidement que les femelles. D'une part, la moitié des mâles ont été matures 158 jours après métamorphose contre 215 jours pour les femelles. D'autre part, le dernier mâle mature était âgé de 224 jours postmétamorphose alors que la dernière femelle mature était âgée de 274 jours postmétamorphose (Figure 3.19). Les mâles ont été particulièrement plus synchrones que les femelles. En effet, il s'est écoulé seulement 29 jours entre le premier mâle observé et 75 % de la population de mâles matures. À titre de comparaison, 126 jours ont été nécessaires pour atteindre 75 % de la population de femelles matures (Figure 3.19). Enfin, le test de Kaplan-Meier n'a révélé aucune différence significative de l'évolution de la maturité sexuelle des femelles en fonction de l'exposition. En revanche, un retard significatif de la maturité des mâles exposés a été observé.

À la fin de la maturité, le sex-ratio des quatre populations $F0.\emptyset$, $F0.B$, $F0.T$ et $F0.M$ a été calculé. Il est apparu étonnamment stable (1:1) pour les populations $F0.\emptyset$, $F0.B$ et $F0.M$. En revanche la population $F0.T$ s'est révélée légèrement plus féminisée (0,9:1). Cependant cette différence n'est pas statistiquement significative puisqu'elle est simplement portée par une plus grande variabilité entre les différentes sous-populations associées aux différents aquariums (Tableau 3.20).

Tableau 3.20 : Sex-ratio des populations de xénopes de la génération F0

Exposition	<i>n</i> total	<i>n</i> mâles	<i>n</i> femelles	Sex-ratio
$F0.\emptyset$ (témoins)	34	17	17	1,00 ± 0,00
$F0.B$ (BaP)	38	19	19	1,00 ± 0,00
$F0.T$ (TCS)	39	16	23	0,89 ± 0,27
$F0.M$ (BaP/TCS)	34	17	17	1,00 ± 0,00

Note : *n* correspond au nombre de xénopes ayant atteint la maturité sexuelle. Les valeurs de de sex-ratio expriment une moyenne ± SEM.

La reproduction des individus de la génération F0 a été réalisée à partir de cinq femelles et dix mâles provenant de chacune des quatre conditions d'exposition. La stimulation par l'hormone hCG s'est révélée hétérogène en fonction du sexe et de la condition d'exposition. Les quarante mâles participants à la reproduction ont répondu favorablement à la stimulation par un comportement de recherche du partenaire femelle et par l'initiation des ampléxus. Ce n'est en revanche pas le cas de trois femelles $F0.T$ et d'une femelle $F0.M$. Cela s'est alors traduit par un rejet des mâles et des ampléxus (Tableau 3.21).

En outre, les pontes ont été significativement moins importantes (5 à 6 fois moins d'œufs que les femelles témoins) pour les femelles *F0.T* que pour les autres populations. Ces faibles pontes ont été associées à un faible taux de fertilisation des œufs (3 fois plus faible que *F0.Ø*, statistiquement non significatif). Le taux d'éclosion des œufs fertiles issus des accouplements de xénopes exposés aux perturbateurs endocriniens ont été significativement plus faibles que celui des pontes de xénopes témoins. De cette suite d'effets a résulté un faible nombre de têtards libres issus de xénopes exposés aux perturbateurs endocriniens : respectivement 1,3 fois, 19,2 fois et 1,9 fois moins de têtards *F1.B*, *F1.T* et *F1.M* que de têtards *F1.Ø* (Tableau 3.21).

Tableau 3.21 : Effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction des xénopes de la génération F0

Exposition (ampléxus réussis)	Œufs pondus	Taux de fertilisation	Œufs fécondés	Taux d'éclosion ¹	Œufs éclos
<i>F0.Ø</i> (5/5)	6623 (1325 ± 133)	0,29 (0,31 ± 0,10)	1910 (382 ± 107)	0,95 (0,76 ± 0,17)	1811 (362 ± 103)
<i>F0.B</i> (5/5)	6843 (1369 ± 179)	0,21 (0,24 ± 0,13)	1462 (292 ± 145)	0,93 (0,55 ± 0,20)*	1362 (272 ± 139)
<i>F0.T</i> (2/5)	1150 (575 ± 26)*	0,10 (0,11 ± 0,08)	118 (59 ± 42)*	0,80 (0,40 ± 0,28)*	94 (47 ± 33)*
<i>F0.M</i> (4/5)	8693 (2173 ± 367)	0,13 (0,12 ± 0,07)	1128 (282 ± 183)	0,85 (0,56 ± 0,17)*	962 (241 ± 168)

Note : ¹Le taux d'éclosion concerne seulement les œufs fécondés. Les données représentent la résultante pour l'ensemble de chaque population alors que les valeurs entre parenthèses expriment une moyenne ± SEM par ampléxus réussi. Les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin *F0.Ø* : *, $p < 0.05$.

3.3.1 Effets du BaP et du TCS sur le développement et la croissance des xénopes de la génération F1

La mortalité a été très importante (60 à 70 %) durant le premier mois de la vie des xénopes de la génération F1. Elle a ensuite fortement diminué au fur et à mesure de la croissance des têtards et s'est enfin stoppée lorsque les individus ont fini leur métamorphose. La mortalité des individus *F1.M* a été plus précoce et celle des individus *F1.T* plus tardivement stabilisée, mais ces différences ne se sont pas révélées significatives selon le test de survie de Kaplan-Meier (Figure 3.20)

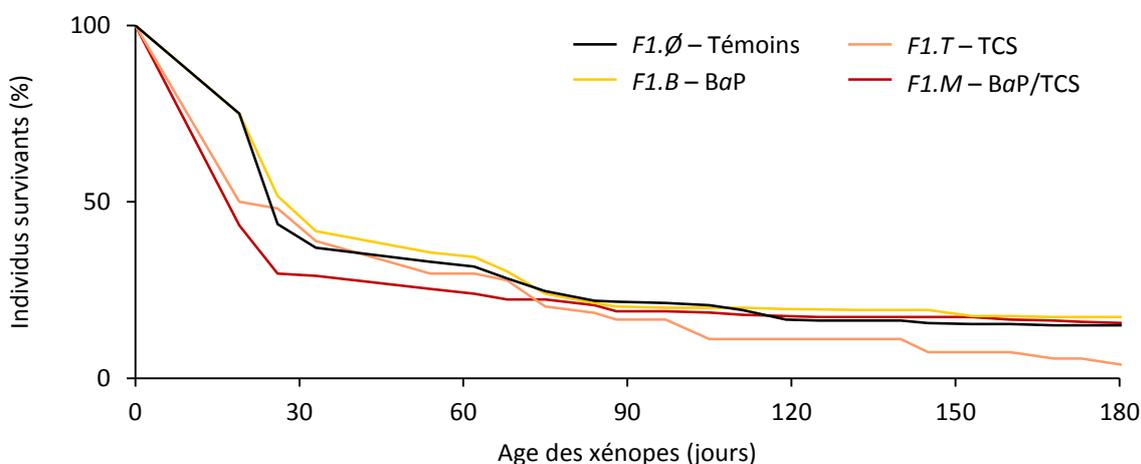


Figure 3.20 : Survie des xénopes de la génération F1 au cours de l'exposition aux perturbateurs endocriniens

Les premiers individus à se métamorphoser étaient âgés de 26 jours. Ce commencement a été synchrone pour l'ensemble des populations. En revanche, les individus $F1.B$, $F1.T$ et $F1.M$ issus de parents exposés aux perturbateurs endocriniens ont mis plus de temps avant d'être tous métamorphosés. Alors que la moitié des individus $F1.\emptyset$ était métamorphosée au jour 80, il a fallu attendre 10 jours supplémentaires pour atteindre le même résultat avec les populations $F1.B$, $F1.T$ et $F1.M$. Ce retard de métamorphose des individus $F1.B$ et $F1.M$ a été significatif selon le test de Kaplan-Meier. Ce n'a cependant pas été le cas des individus $F1.T$ qui, compte tenu de leur faible effectif, sont passés de 50 % à 100 % de xénopes métamorphosés entre les jours 90 et 100 suite à la métamorphose de trois individus seulement. Ce croisement entre les courbes $F1.\emptyset$ et $F1.T$ explique l'absence de significativité (Figure 3.21).

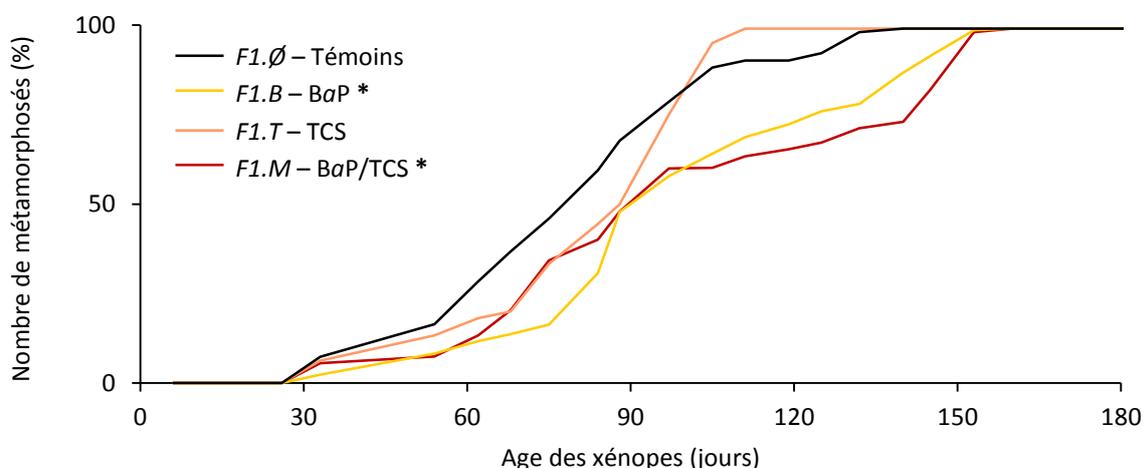


Figure 3.21 : Effets des perturbateurs endocriniens sur l'âge des xénopes de la génération F1 à la métamorphose. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le test de survie de Kaplan-Meier, les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin *F1.Ø* : *, $p < 0.05$.

L'observation de la taille et de la masse des individus issus de xénopes témoins, *F1.Ø*, a montré de fortes similitudes avec les moyennes observées chez les individus parentaux, *F0.Ø* (Tableaux 3.22 et Figure 3.22). Cependant les individus issus de xénopes exposés aux PE, *F1.B*, *F1.T* et *F1.M* se sont révélés significativement plus petits (1,1 fois) et plus légers (1,3 à 1,4 fois) à la métamorphose que les individus issus de xénopes non exposés *F1.Ø* (Tableau 3.22 et Figure 3.22). L'exposition aux perturbateurs endocriniens des individus parentaux n'a en revanche eu aucun effet sur la corpulence de leur descendance (relation taille-masse) (Tableau 3.22).

Tableau 3.22 : Mesures biométriques sur les xénopes métamorphosés de la génération F1

Exposition	<i>n</i>	Taille (mm)	Masse (mg)	Indice de corpulence (mg.mm ⁻³)
<i>F1.Ø</i> (témoins)	46	18,0 ± 0,4	2 573 ± 122	0,45 ± 0,02
<i>F1.B</i> (BaP)	63	15,9 ± 0,3*	1 805 ± 98*	0,42 ± 0,01
<i>F1.T</i> (TCS)	10	16,0 ± 0,7*	1 800 ± 165*	0,45 ± 0,03
<i>F1.M</i> (BaP/TCS)	32	16,5 ± 0,6*	1 963 ± 153*	0,43 ± 0,01

Note : *n* correspond au nombre de xénopes métamorphosés. La taille représente la distance museau/cloaque. Les valeurs de biométrie expriment une moyenne ± SEM. Les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin *F1.Ø* : *, $p < 0.05$.

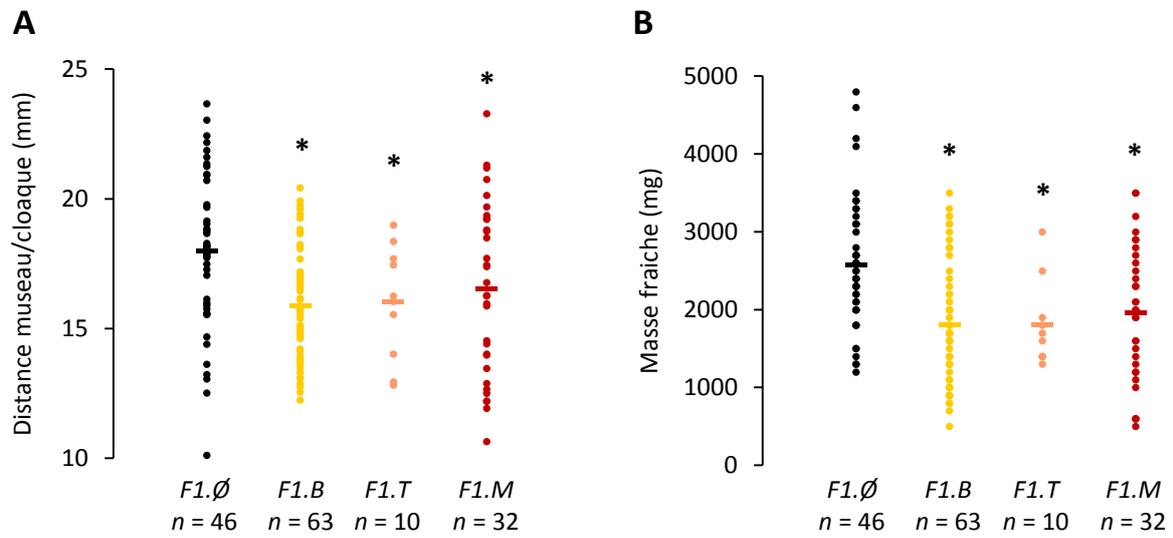


Figure 3.22 : Taille (A) et masse (B) des xénopes de la génération F1 à la métamorphose. Les barres horizontales représentent la moyenne de la population. Les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin F1.∅ : *, $p < 0.05$.

3.4 Discussion

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à l'étude chez l'amphibien modèle *Xenopus tropicalis* des effets du benzo[*a*]pyrène et du triclosan, à une concentration et une durée d'exposition cohérentes avec l'environnement. De manière significative, les résultats obtenus ont mis en évidence une modification de la croissance des têtards, une diminution de la capacité de reproduction des adultes, des perturbations physiologiques chez les femelles adultes mais aussi des changements sur la descendance non exposée.

3.4.1 Effets du BaP et du TCS sur la croissance et la métamorphose des têtards exposés

3.4.1.1 Survie

Notre étude s'est recentrée sur des concentrations couramment retrouvées dans les eaux de surfaces (50 ng.L^{-1}) et des temps d'exposition longs, du stade de têtard prémétamorphique (15 jours après éclosion) jusqu'au stade adulte mature sexuellement. Dans la littérature, quelques études décrivent des expositions de têtards au BaP ou au TCS mais rarement à des faibles concentrations (Saka, 2004; Rankouhi *et al.*, 2005). En effet, ces études sur amphibiens exposés au BaP ou au TCS n'excédaient pas 16 jours (Sadinski *et al.*, 1995) et 32 jours (Fort et Pawlowski, 2011) et étaient basées sur des expositions aiguës dont résultaient des effets de toxicité directe comme une augmentation de la mortalité (Fernandez et L'Haridon, 1992; Fraker et Smith, 2004; Mouchet *et al.*, 2005; Smith et Burgett, 2005; Brown *et al.*, 2013). L'absence de mortalité pour des concentrations inférieures à $50 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de BaP et $2,3 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de TCS (Fernandez et L'Haridon, 1992; Smith et Burgett, 2005) confirme que nous n'ayons pas observé de mortalité significative chez les têtards exposés aux concentrations choisies pour notre étude.

3.4.1.2 Malformations

Nous n'avons pas non plus trouvé de différences statistiques quant à l'apparition de malformations durant la croissance des têtards. Des malformations de l'axe du rachis sont apparues, mais aucune malformation de l'intestin, du crâne, des yeux ni de formation d'œdèmes n'ont été observées. Ces malformations sont décrites par le test de tératogénèse FETAX (pour *Frog Embryo Teratogenesis Assay Xenopus*) et elles sont classiquement retrouvées lors des expositions à des perturbateurs endocriniens (Mouche *et al.*, 2011). Ce test de toxicité développementale est établi pour des individus au stade embryonnaire, or nos expositions ont débuté sur des têtards libres, donc tardivement au regard de l'organogénèse et des potentiels effets toxiques associés. Ceci expliquerait le manque de diversité quant aux malformations rencontrées lors de nos expositions. Par ailleurs, le fait que nous ayons observé des malformations de l'axe du rachis chez les têtards témoins supposerait que cet effet n'ait pas porté par l'exposition aux perturbateurs endocriniens et qu'il s'agirait du taux naturel de malformation. Ce type de malformations bénignes est en effet courant dans les élevages de xénopes (Centre d'élevage du xénope de Renne, communication personnelle). Contrairement à de nombreuses malformations persistantes après la métamorphose (Plowman *et al.*, 1994), la courbure axiale semble s'être résorbée avec la queue puisque aucune malformation n'a été observée sur les grenouillettes ni sur aucun adulte.

3.4.1.3 Métamorphose

Dans notre étude, les premiers effets significatifs observés dans les populations de *Xenopus tropicalis* ont été les retards de métamorphoses des individus exposés uniquement au BaP ou au TCS. Ce type d'effet a déjà été démontré chez *X. laevis* exposé 16 jours au BaP à $7,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Sadinski *et al.*, 1995). Sans pouvoir en apporter la certitude, Sadinsky *et al.* (1995) ont alors émis l'hypothèse d'une perturbation de la métamorphose par les dommages à l'ADN causés par le BaP. En outre, des travaux plus récents suggèrent des interactions entre les récepteurs thyroïdiens et AhR, le récepteur aux hydrocarbures aromatiques polycycliques, lors d'expositions à des dioxines (Ghisari *et al.*, 2015). Les récepteurs thyroïdiens sont fortement impliqués dans le déroulement de la métamorphose des anoues. Cette dernière est divisée en trois périodes successives : prémétamorphique (têtard dépourvu de pattes), prométamorphique (avec des pattes postérieures) et enfin climax métamorphique

(achèvement des membres, modifications ostéologiques, développement pulmonaire, réduction intestinale et disparition de la queue ; Delarue et Arnoult, 2004; Veldhoen *et al.*, 2006). Alors que les têtards évoluent d'une période à l'autre, leur niveau de récepteurs thyroïdiens et l'expression des hormones thyroïdiennes augmentent (Schreiber *et al.*, 2001; Balch *et al.*, 2006). Deux études se sont particulièrement intéressées au niveau de transcription des récepteurs thyroïdiens chez des têtards exposés à de faibles concentrations de TCS ($0,3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Les résultats ont démontré que les réponses étaient spécifiques puisque le récepteur aux hormones thyroïdiennes $TR\beta$ a été trouvé sous-transcrit chez des têtards de *Lithobates atesbeianus* et sur-transcrits chez des têtards de *Pseudacris regilla*. Ainsi, le retard de métamorphose observé chez les individus exposés au BaP ou au TCS pourrait être lié à une perturbation du système thyroïdien.

Ces hypothèses ne sont cependant pas vérifiables à partir de nos données. En dépit de cela, la métamorphose reste un paramètre facilement quantifiable de la réponse des têtards aux stress chimiques (Brodeur *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). Dans notre étude, un écart de deux semaines a été observé entre le jour où 50 % des individus témoins étaient métamorphosés et le jour où 50 % des individus exposés au BaP ou au TCS étaient métamorphosés. Cette différence est biologiquement et écologiquement considérable. Les adultes *Xenopus tropicalis* sont inféodés au milieu aquatique, l'achèvement de leur métamorphose n'est donc pas associé au passage du milieu aquatique au milieu terrestre. Par ailleurs, les xénopes tendraient à choisir des mares permanentes comme sites de pontes (Kalk, 1960). Ce n'est en revanche pas le cas de nombreuses espèces d'anoures qui nécessitent une sortie de l'eau avant l'assèchement des mares temporaires (Brodeur *et al.*, 2013). Si ce décalage temporel de la métamorphose s'avérait transposable à d'autres espèces, les conséquences seraient probablement catastrophiques pour leurs populations. De plus, chez les anoures (xénope compris), le stade têtard semble plus vulnérable à la prédation et à la virulence des ranavirus que le stade adulte (Lannoo, 2005; Gray et Chinchar, 2015). Un retard de métamorphose serait donc dommageable dans de telles situations. Dans notre étude, les perturbations de la durée de métamorphose induites par chacun des deux polluants individuellement n'ont pas été retrouvées chez les xénopes exposées au mélange. L'évolution des concentrations du BaP et du TCS au cours du temps n'a pas semblé être affectée par la présence simultanée de ces deux polluants dans le milieu. Ainsi, la perte d'effets du mélange de polluant que nous observons ne semblerait pas imputée à une modification de leur dynamique au sein du milieu.

3.4.2 Effets métaboliques du BaP et du TCS sur les femelles adultes exposés

3.4.2.1 Hypertrophie hépatique

L'évaluation des perturbations métaboliques résultant des expositions aux perturbateurs endocriniens s'est focalisée usuellement sur le foie, organe majeur de la physiologie des vertébrés. Il assure en effet un rôle crucial dans le métabolisme des glucides, lipides et protéines mais également dans le métabolisme des xénobiotiques par la clairance hépatique. Constituant une cible pour de nombreuses molécules, il est susceptible de changer de taille lors d'une exposition à une substance toxique (Barka et Popper, 1967; Xu *et al.*, 2005). Le rapport hépato-somatique est alors utilisé comme indicateur de stress à des contaminants chimiques sur le terrain. Bien qu'il existe des effets saisonniers ou immunologiques sur l'élargissement du foie, cet indicateur est considéré comme fiable par de nombreux auteurs (Pinkney *et al.*, 2001; Yang et Baumann, 2006; Lenhardt *et al.*, 2009; Raut et Angus, 2010; Teubner *et al.*, 2014). Une augmentation du rapport hépato-somatique, autrement dit une hypertrophie hépatique a été montrée *in natura* sur des poissons d'eau douce exposés aux hydrocarbures aromatiques polycycliques (Pinkney *et al.*, 2001) ou au TCS (Raut et Angus, 2010). Dans notre étude en conditions contrôlées et affranchies des contraintes saisonnières et circadiennes, une augmentation significative du rapport hépato-somatique a également été trouvée chez les femelles exposées au BaP, au TCS et au mélange BaP/TCS.

3.4.2.2 Stéatose hépatique

Teubner *et al.* (2014) ont corrélé l'hypertrophie du foie avec une augmentation du contenu hépatique en lipides. Dans notre étude, une telle augmentation a été observée chez les femelles exposées, avec l'induction d'une importante stéatose hépatique. Ce type de perturbation avait déjà été rencontré lors de nos études à court terme (Chapitre 2). Par ailleurs, une étude récente a démontré que le BaP induisait une accumulation de lipides dans les hépatocytes via le récepteur *Ahr* (Neuschäfer-Rube *et al.*, 2015). À l'instar de nos études à court terme, l'augmentation du taux de lipides dans le foie retrouvé dans notre étude a été

associée avec une forte perturbation de la transcription d'une cohorte de gènes jouant un rôle dans le métabolisme lipidique et plus particulièrement le métabolisme des acides gras. Parmi eux, le gène codant pour la phospholipase *patatin-like phospholipase domain containing 3* (*PNPLA3*) est apparu sous-transcrit chez les xénopes exposés au BaP. Il s'agit d'une phospholipase impliquée dans l'hydrolyse des triglycérides dont la sous-expression est associée chez l'Homme à une accumulation de graisse dans le foie (Maglio *et al.*, 2014). En outre, le gène codant pour la *lipase* (*LIPE*), une enzyme catalysant aussi l'hydrolyse des triglycérides mais également l'hydrolyse des lipoprotéines de basse densité (LDL) et de haute densité (HDL), a été trouvé sur-transcrit chez les xénopes femelles exposées au TCS et au mélange BaP/TCS. Or, l'activité de *LIPE* hépatique a été positivement corrélée de manière significative avec la sévérité de la stéatose hépatique chez l'Homme (Miksztowicz *et al.*, 2012). Chez ces mêmes femelles, nous avons également observé une augmentation de la transcription du gène *fatty acid binding protein* (*FABP1*) qui semble être associé à la teneur en triglycérides hépatiques chez les mammifères, car une concentration plus faible en triglycérides a été trouvée chez des souris déficientes en *FABP1* (Guzmán *et al.*, 2013). *FABP1* n'a pas été retrouvé différenciellement transcrit chez les xénopes femelles exposées au BaP. En revanche il a été montré que l'expression de ce gène était réprimée par le facteur de transcription *ccaat/enhancer binding protein alpha* (*C/EBPα*) retrouvé sous-transcrit chez les xénopes femelles exposées au BaP. Chez les femelles exposées au mélange BaP/TCS seulement, une sous-transcription du gène *Cdp-Diacylglycerol--Inositol 3-Phosphatidyltransferase* (*CDIPT*) a été trouvée. Ce gène joue un rôle majeur dans la synthèse de phosphatidylinositol. Or, il a été démontré chez le poisson un lien entre une altération de la synthèse de phosphatidylinositol et l'induction d'une stéatose hépatique via une déficience en *CDIPT* (Thakur *et al.*, 2011). Enfin, le gène *aldolase A* (*ALDOA*) est apparu sur-transcrit chez les femelles exposées au TCS. L'*ALDOA* est un lien entre le métabolisme glucidique et la synthèse de triglycérides via le glycérol (Brunengraber *et al.*, 2003; Mirhaghpour *et al.*, 2015). Cela fait écho aux résultats de nos études à court terme puisque ce gène était également apparu sur-transcrit chez les xénopes mâles exposés au BaP et au TCS (Chapitre 2.3).

3.4.2.3 Hépatotoxicité

L'accumulation de lipides dans le foie est une source de cytotoxicité. Cette lipo-hépatotoxicité est d'ailleurs largement décrite dans la littérature (Feldstein *et al.*, 2004; Yamaguchi *et al.*, 2007). À la manière de ce que nous avons observé lors de nos études à court terme (Chapitre 2), l'exposition au BaP et au TCS a entraîné une désorganisation du tissu hépatique caractérisée par des jonctions cellulaires histologiquement moins franches. Ces observations ont été étayées par une élévation de l'activité de l'alanine-aminotransférase, un marqueur de lésions hépatiques, mais également par la sous-transcription de gènes impliqués dans les interactions inter-cellulaires. Les gènes codant pour la *vacuole membrane protein 1 (VMP1)* impliquée dans les jonctions serrées (Sauermaun *et al.*, 2007) et pour la *gap junction protein beta 2 (GJB2)*, une connexine impliquée dans les jonctions communicantes (Harris et Locke, 2009) sont apparus sous-transcrits chez les femelles exposées au BaP. En outre, le gène codant pour la *claudin 6 (CLDN6.2)* a aussi été trouvé sous-transcrit chez les femelles exposées au mélange BaP/TCS.

3.4.2.4 Stimulation de l'activité mitochondriale

Dans les hépatocytes, les acides gras libres sont soit oxydés soit estérifiés en triglycérides qui sont stockés ou incorporés dans des lipoprotéines de très basse densité (VLDL) puis excrétés (Ferré et Fougelle, 2010; Choi et Ginsberg, 2011). Le principal site cellulaire de la combustion des acides gras est la mitochondrie qui effectue le processus de β -oxydation (Pessayre *et al.*, 1999). La stéatose se traduit donc par un déséquilibre entre l'apport en acides gras et leur élimination dans les VLDL ou par β -oxydation (Ferré et Fougelle, 2010). L'oxydation des acides gras est couplée à la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) en NADH et de la flavine adénine dinucléotide (FAD) en FADH_2 . Les formes réduites sont ensuite oxydées via la chaîne respiratoire mitochondriale et disponibles à nouveau pour d'autres cycles d'oxydation. Au cours de leur ré-oxydation, NADH et FADH_2 transfèrent leurs électrons aux complexes de la chaîne respiratoire. Une partie de ces électrons réagit avec l'oxygène pour former des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Pessayre *et al.*, 1999; Begriche *et al.*, 2013). La production de ROS est donc inhérente à l'oxydation des acides gras et au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Plusieurs études chez les vertébrés ont observé une augmentation de la production mitochondriale de ROS

en association avec l'émergence d'une stéatose (Crescenzo *et al.*, 2008; Vial *et al.*, 2011; Lockman *et al.*, 2012; Begriche *et al.*, 2013). Nous n'avons pas retrouvé cette augmentation dans nos données. En revanche nous avons observé une élévation significative de la respiration des mitochondries isolées de foie de xénopes exposées aux perturbateurs endocriniens. Une telle augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire pourrait être associée à l'augmentation de l'oxydation des acides gras par les mitochondries (Begriche *et al.*, 2013). Cette hypothèse est étayée par la sur-transcription significative du gène codant pour l'enzyme *carnitine palmitoyltransferase 1B (CPT1B)* retrouvée chez les xénopes femelles exposées au BaP. En effet, les acides gras à chaîne courte et à chaîne moyenne intègrent librement les mitochondries mais l'entrée des acides gras à chaîne longue dépend de plusieurs enzymes, incluant la *CPT1B* (Begriche *et al.*, 2013). L'absence d'une surproduction de ROS en réponse à la hausse de l'activité mitochondriale pourrait supposer un système antioxydant suffisamment efficace. Cependant la production de ROS a été étudiée sur des mitochondries isolées, il est délicat de la relier avec les modifications de transcription des gènes du foie. En revanche une hypothèse pourrait être la présence dans le foie des amphibiens de pigments produits par les mélano-macrophages (Barni *et al.*, 2002). Nous avons pu observer ces formations pigmentées sur les coupes histologiques (Figure 3.17). L'isolement des mitochondries n'a pas permis de s'affranchir des pigments. Ils étaient donc présents dans le milieu réactionnel. Or, plusieurs études ont démontré que ces pigments contenaient de la mélanine et que cette dernière possédait une action antioxydante proche de celle de la superoxyde dismutase (Geremia *et al.*, 1989; Scalia *et al.*, 1990; Boncompagni *et al.*, 2004; Prota, 2012). La mélanine aurait alors pu agir comme système antioxydant et inhiber la production de ROS lors de nos mesures.

3.4.2.5 Modification de la transcription des défenses antioxydantes

Des études récentes ont démontré le rôle de la famille des protéines de découplage (*UCP*, pour *uncoupling protein*) sur le contrôle du couplage entre la respiration et la phosphorylation de l'ADP par la création d'un *shunt* entre les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (Rousset *et al.*, 2004). Au sein de cette famille, *UCP2* semble particulièrement impliquée dans la diminution des dommages oxydatifs (Rousset *et al.*, 2004). Curieusement, au niveau du foie dans sa globalité, le gène codant pour cette enzyme est apparu sous-transcrit chez les femelles exposées au BaP et au mélange BaP/TCS. Par ailleurs,

le gène codant pour la *tocopherol (alpha) transfer protein-like (TTPAL)* et celui codant pour la *glutathione peroxidase 4 (GPX4)* ont été respectivement trouvés sous-transcrits chez les individus exposés au BaP et au mélange. Ce sont également des gènes impliqués dans la défense contre le stress oxydant. L'inhibition de ces gènes, comme des *UCP*, n'est pas forcément associée à une augmentation de la production de ROS (Shabalina et Nedergaard, 2011). En revanche, outre les pigments de mélanine, nous avons retrouvé une sur-transcription du gène codant pour la *catalase (CAT)* chez les xénopes femelles exposées au BaP. En résumé, l'augmentation de l'activité respiratoire mitochondriale serait une adaptation métabolique pour lutter contre l'accumulation de graisse dans le foie et la production de ROS inhérente à cette augmentation pourrait être palliée par un système antioxydant faisant notamment intervenir la mélanine ou la catalase.

3.4.2.6 Perturbation du métabolisme glucidique

La stéatose hépatique est couramment associée à un syndrome d'insulino-résistance (Ferré et Fougère, 2010). Nous avons observé des perturbations équivalentes dans nos études à court terme (Chapitre 2). Dans cette étude, le métabolisme glucidique est également apparu modifié chez les xénopes femelles exposées aux perturbateurs endocriniens. D'une part, le retour à une glycémie normale lors d'une injection de glucose s'est révélé plus lent, suggérant une moins bonne tolérance au glucose. D'autre part la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des glucides s'est également révélée perturbée. Le gène codant pour la *glucose-6-phosphatase (G6PC)* a notamment été trouvé sur-transcrit chez les femelles exposées aux perturbateurs endocriniens. Il s'agit d'une hydrolase majeure de l'homéostasie du glucose puisqu'elle catalyse l'hydrolyse du glucose-6-phosphate en glucose et phosphate, l'étape finale des voies de la néoglucogenèse et de la glycogénolyse (Ghosh *et al.*, 2002). À travers ces deux voies métaboliques régulées par l'insuline, *G6PC* participe à la production de glucose à partir de composés non glucidiques ou de glycogène. Les récepteurs nucléaires de la famille *NR4A* ont été décrits comme des activateurs de la néoglucogenèse (Pei *et al.*, 2006). Dans notre étude, les gènes *NR4A1* et *NR4A2* sont apparus sur-transcrits chez les femelles exposées au BaP. L'incapacité de l'insuline à réprimer la néoglucogenèse alors que la lipogenèse semble fortement activée pourrait refléter une perte de la sensibilité du foie à l'insuline (Ferré et Fougère, 2010).

3.4.2.7 Phénotype semblable à une stéatopathie non alcoolique

Pris dans leur ensemble, nos résultats reflètent donc une importante perturbation métabolique et suggèrent l'émergence d'une stéatose hépatique accompagnée d'une hépatotoxicité et d'une modification de l'homéostasie du glucose chez les femelles exposées aux perturbateurs endocriniens. Ce sont trois caractéristiques d'une stéatopathie non alcoolique (NAFLD, pour *non alcoholic fatty liver disease*) (Naik *et al.*, 2013). La mise en place d'un phénotype semblable avait précédemment été mise en évidence lors de nos études à court terme (Chapitre 2). Le spectre pathologique de la NAFLD comprend en réalité une série progressive de désordres hépatiques partant de la stéatose bénigne à la stéato-hépatite maligne pouvant dégénérer en une fibrose, une cirrhose, ou éventuellement en un carcinome hépatocellulaire (Arciello *et al.*, 2013; Naik *et al.*, 2013). La progression entre une simple stéatose hépatique et une stéato-hépatite non alcoolique (NASH, pour *non-alcoholic steatohepatitis*) s'explique par l'émergence d'un processus inflammatoire, d'un stress oxydatif et/ou d'une fibrogenèse hépatique (Day et James, 1998; Day, 2006). De manière intéressante, plusieurs gènes impliqués dans l'inflammation du foie ont été trouvés différentiellement transcrits chez les xénopes femelles exposées au BaP. Toutes ces modifications transcriptionnelles ont également été décrites chez les mammifères comme associées à la progression de la NAFLD en NASH (*CD3E* (VanSaun *et al.*, 2013), *CD40* (Sookoian *et al.*, 2010), *FAS* (Estep *et al.*, 2015), *GADD45G* (Xie *et al.*, 2010), *PDLA3* (Zhang *et al.*, 2015), *SUSD1* (Hall *et al.*, 2014), *VASP* (Lastra *et al.*, 2015), *VEGFC* (Coulon *et al.*, 2012)). Chez ces mêmes xénopes femelles exposées au BaP, la sous-transcription a été observée pour une cohorte de gènes impliqués dans la fixation ou dans la translocation et le transport de protéines ou de vésicules au sein du réticulum endoplasmique. Or, le stress du réticulum endoplasmique a été décrit comme une conséquence des perturbations associées à la NASH (Naik *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2015). Enfin, toujours chez les femelles exposées au BaP, la majorité des gènes trouvés différentiellement transcrits et codant pour des enzymes impliquées dans la lipogenèse sont curieusement apparus sous-transcrits (*ACSS2.2*, *EVOLV2*, *FADS*, *HMGCS1*, *MGAT2*). Néanmoins, ce type de sous-régulation inversement corrélé avec l'apparente atteinte du foie a été défini chez l'Homme par une NASH avancée, et l'engagement de la maladie dans une fibrose (Nagaya *et al.*, 2010). Par conséquent, nos résultats semblent indiquer un désordre métabolique plus marqué de type NASH, chez les femelles exposées au BaP que chez les autres femelles.

3.4.3 Effets du BaP et du TCS sur la reproduction des parents et sur la descendance non exposée

3.4.3.1 Perturbation du comportement reproducteur des parents

Dans cette étude, nous nous sommes également intéressés aux effets multigénérationnels du BaP et du TCS sur la progéniture non exposée des xénopes parents exposés. Pour cela nous avons reproduit les individus de la génération F0. Des amplexus ont été obtenus avec succès pour chacune des femelles témoins et chacune des femelles exposées au BaP. En revanche, trois femelles sur cinq exposées au TCS et une femelle sur cinq exposées au mélange BaP/TCS n'ont pas répondu à la stimulation hormonale. Ceci s'est traduit par un rejet des mâles par les femelles et la rupture des amplexus. Le TCS est un composé diphényléther halogéné décrit comme un perturbateur endocrinien ayant une faible activité œstrogénique (Ishibashi *et al.*, 2004). Or d'autres perturbateurs endocriniens œstrogéniques comme l'éthinylestradiol et d'autres composés diphényléther halogénés comme les polybromodiphényléthers ont été décrits chez les amphibiens comme des perturbateurs du comportement reproducteur (Ganser, 2009; Hoffmann et Kloas, 2012; Bhandari *et al.*, 2015). Par leur action sur les récepteurs cérébraux de l'œstrogène ou sur le noyau ambigu (noyau moteur commun des nerfs crâniens glosso-pharyngien et pneumogastrique), ces différents composés inhiberaient le chant nuptial des xénopes mâles. Par ailleurs, différentes études ont montré des modifications du comportement copulatoire (perte d'intérêt ou au contraire agressivité) chez des souris femelles exposées aux polybromodiphényléthers (Chung *et al.*, 2001; Faass *et al.*, 2013). Ils affecteraient alors indirectement la reproduction des femelles par un rejet des mâles exposés au profit des mâles témoins. Dans notre étude, ce rejet s'est traduit par un effondrement radical du succès reproducteur des individus exposés au TCS. *In natura*, cela affecterait le recrutement (le repeuplement des populations par les juvéniles) et participerait au déclin des populations d'amphibiens (Hoffmann et Kloas, 2012).

3.4.3.2 Retard de la métamorphose de la descendance

Des perturbations liées au BaP et au TCS ont également été retrouvées chez la descendance des individus exposés. En effet, nous avons observé un retard de la métamorphose des individus (F1) issus des xénopes (F0) exposés. Après leur métamorphose, ces xénopes sont aussi apparus significativement plus petits et plus légers. Ces aspects multigénérationnels très mal connus chez les amphibiens, ont été en revanche mieux décrits chez les poissons. Si la descendance n'a pas été exposée durant son développement, chaque individu l'a été via les gamètes parentaux. Or, plusieurs travaux ont montré que les polluants environnementaux lipophiles tels que des hydrocarbures aromatiques polycycliques halogénés étaient transportés avec les réserves lipidiques dans les ovaires et s'accumulaient dans les ovocytes en développement (Miller, 1993; Brooks *et al.*, 1997; Reynaud *et al.*, 2012). En outre, le statut hormonal et énergétique de la femelle durant le développement de l'ovocyte serait également un paramètre déterminant de la qualité des œufs et de la croissance des embryons puis des larves (Brooks *et al.*, 1997). Ceci est d'autant plus important que chez les vertébrés non mammaliens, l'énergie pour le développement de l'embryon est fournie par la femelle sous la forme de vitellus dont le constituant majeur est la vitellogénine, une lipoprotéine (Dawson, 1998). Ainsi, le retard de croissance dans la descendance pourrait trouver son origine dans les perturbations marquées observées dans la génération parentale. Ce type d'effet parental a par ailleurs été observé chez le crapaud *Anaxyrus americanus* exposé au mercure (Bergeron *et al.*, 2011; Todd *et al.*, 2011, 2012). Ces travaux ont montré que l'exposition parentale au mercure perturbe la durée et le succès de métamorphose de la descendance F1 non exposée (p. ex. la durée de résorption de la queue, croissance, malformation et survie) à un degré plus élevé que l'exposition directe des têtards par l'alimentation (Bergeron *et al.*, 2011). Les effets parentaux des contaminants semblent d'autant plus sévères qu'ils agissent à des étapes plus sensibles du développement (p. ex. la gamétogenèse) que les contaminants alimentaires (Schwindt, 2015). En outre, ces études ont montré que l'effet parental de diminution de masse à la métamorphose était encore observable après la première année de croissance postmétamorphique de la génération F1 (Todd *et al.*, 2012), paramètre que nous pourrions vérifier d'ici quelques mois.

3.4.3.3 Modification morphologique de la descendance

Les différences de taille observées, dans notre étude, entre les individus issus de parents témoins et de parents exposés au B_aP et au TCS sont significatives mais restent relativement faibles. *In natura* et en milieu contaminé, ces effets pourraient cependant être exacerbés puisque le retard de métamorphose avait été observé dans la génération parentale. Les effets parentaux et les effets développementaux liés à une exposition directe pourraient alors se superposer. Dans leur étude, Hayes *et al.* (2006) avaient également observé un retard de métamorphose et une diminution de la taille de *Lithobates pipiens* exposés directement à un mélange de pesticides. Leur étude décrit parfaitement les effets de ce type de modifications et leurs implications sur les populations d'amphibiens. Les grenouilles sont des prédateurs limités par l'ouverture de leur bouche. Une plus petite taille à la métamorphose amoindrirait donc la diversité et la disponibilité de la nourriture de ces grenouilles nouvellement métamorphosées. De plus, les individus plus petits seraient plus susceptibles de convenir aux prédateurs également limités par l'ouverture de leur bouche (p. ex. les serpents). Leurs chances de survie à l'hivernage seraient également diminuées par ces perturbations morphologiques. Enfin, si les différences de tailles se maintenaient malgré la croissance des individus, elles pourraient également modifier leur fécondité puisque chez de nombreuses espèces, les femelles auraient tendance à choisir des mâles plus grands (Hayes *et al.*, 2006). En effet, les mâles plus petits auraient de plus grandes difficultés à maintenir un amplexus.

3.5 Conclusion

Nos travaux concernant l'exposition chronique du *Xenopus tropicalis* aux perturbateurs endocriniens benzo[*a*]pyrène et triclosan, à des concentrations cohérentes avec celles observées dans l'environnement, ont mis en évidence leur influence sur la croissance des têtards et la physiologie des femelles adultes. Chez les têtards, la métamorphose a été retardée. Chez la femelle adulte, une induction de troubles métaboliques du foie marqués, associés à une hépatotoxicité et à des phénotypes semblables à une insulino-résistance et une stéatopathie non alcoolique a été observé. Aussi, chez les femelles exposées au BaP, un stress du réticulum endoplasmique et un processus inflammatoire ont semblé survenir, suggérant une évolution de la perturbation métabolique vers un phénotype semblable à une stéato-hépatite non alcoolique. Nous avons mis également en évidence des conséquences multigénérationnelles, modifiant le développement et la croissance de la descendance non exposée diminuant en particulier la taille des individus juvéniles. L'influence de l'état métabolique des parents ainsi que l'exposition des cellules germinales aux polluants, via l'exposition parentale, pourrait en être l'origine.

Il apparaît donc à l'issu de nos travaux pris dans leur ensemble que le benzo[*a*]pyrène et le triclosan pourraient participer au déclin des populations d'amphibiens par des modifications profondes du métabolisme hépatique et du comportement reproducteur chez l'adulte et par un affaiblissement morphologique des juvéniles devenant des proies accessibles à plus de prédateurs.

4 Synthèse générale

4.1	Rappel des objectifs de la thèse.....	205
4.2	Rappel des principaux résultats	206
4.2.1	Conséquences de l'exposition à court terme.....	206
4.2.2	Conséquences de l'exposition à long terme	207
4.2.3	Expositions court terme <i>versus</i> expositions long terme	207
4.2.4	Conséquences sur le déclin des populations d'amphibiens	209
4.3	Perspectives de la thèse	213
4.3.1	Pour l'étude des conséquences sur la génération exposée F0	213
4.3.1.1	Sur le métabolisme énergétique.....	213
4.3.1.2	Sur le système reproducteur.....	216
4.3.1.3	Réversibilité des perturbations	217
4.3.2	Pour l'étude des conséquences sur la descendance non exposée F1	218
4.3.3	Vers une validation des observations sur des espèces de terrain	218
4.4	Conclusion finale	220

4.1 Rappel des objectifs de la thèse

Parmi les milieux d'eau douce, les zones humides sont des écosystèmes particulièrement sensibles aux pollutions puisqu'elles constituent des zones de récupération et d'accumulation de xénobiotiques. Une contamination faible mais chronique de l'eau par une multitude de molécules, y compris des perturbateurs endocriniens, est observée. Le questionnement lié au rôle joué par les perturbateurs endocriniens dans l'effondrement massif des populations d'amphibiens est un enjeu d'actualité car plusieurs études ont démontré des atteintes de leur reproduction en milieux naturels contaminés. Ainsi, chez les amphibiens, les perturbateurs endocriniens sont massivement étudiés pour leur capacité à interférer avec le développement et la métamorphose des têtards par une perturbation de l'axe thyroïdien (Crump *et al.*, 2002; Opitz *et al.*, 2005; Tietge *et al.*, 2005; Opitz, Hartmann, *et al.*, 2006; Opitz, Lutz, *et al.*, 2006; Jagnytsch *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006; Kashiwagi *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2014; Hammond *et al.*, 2015) ou à interférer avec le développement de la reproduction et la différenciation sexuelle à travers leurs interactions avec l'axe gonadotrope (Hayes *et al.*, 2002; Mosconi *et al.*, 2002; Urbatzka *et al.*, 2006, 2007; Cevalco *et al.*, 2008; Hayes *et al.*, 2010b; Hayes *et al.*, 2011; León-Olea *et al.*, 2014; Orton et Tyler, 2015). Toutefois, alors qu'une préoccupation croissante suggère qu'ils peuvent également induire des troubles métaboliques chez les vertébrés, ce phénomène demeure méconnu chez les amphibiens (Casals-Casas et Desvergne, 2011).

L'objectif de cette thèse a été de faire évoluer la compréhension des effets de l'exposition des amphibiens à de faibles concentrations de perturbateurs endocriniens. Afin d'avoir une vision globale, une démarche intégrative a été adoptée, prenant en compte différents niveaux d'organisation biologique, depuis les mécanismes moléculaires jusqu'à la physiologie de l'organisme. Pour conduire ce projet nous avons choisi la grenouille modèle de laboratoire *Xenopus tropicalis* et nous avons sélectionné deux molécules polluantes d'origine urbaine et couramment retrouvées dans les milieux aquatiques : le benzo[*a*]pyrène et le triclosan. L'originalité principale de ce projet a résidé dans l'étude de la réponse du xénope aux doses environnementales de perturbateurs endocriniens seuls et en mélange à court et à long terme ainsi que dans l'identification des altérations multigénérationnelles associées.

4.2 Rappel des principaux résultats

4.2.1 Conséquences de l'exposition aux perturbateurs endocriniens à court terme

Lors d'expositions aiguës (mais compatibles avec les concentrations rencontrées dans les biotopes), le benzo[a]pyrène et le triclosan ont été rapidement bioconcentrés et métabolisés par les xénopes mâles et femelles. Toutefois, ces phénomènes n'ont pas été associés à une modification de la transcription hépatique des gènes impliqués dans les voies de détoxification. Ces gènes, codant pour des enzymes de biotransformation des composés endogènes et des xénobiotiques, favorisent généralement l'élimination de ces derniers par les organismes. Leur induction est donc classiquement recherchée en écotoxicologie aquatique comme un biomarqueur d'exposition. L'absence d'une modification de leur transcription dans notre étude a montré que l'utilisation de ces biomarqueurs était inappropriée chez les amphibiens. Il est donc nécessaire de trouver de nouveaux signaux d'alerte sensibles et précoces reflétant une réponse biologique des amphibiens aux perturbateurs endocriniens environnementaux.

Dans notre étude, les deux perturbateurs endocriniens et leur mélange ont induit une profonde altération de la physiologie hépatique globale. Elle s'est traduite par des phénotypes semblables à une insulino-résistance voire une stéatopathie non alcoolique (stéatose, hépatotoxicité, ...) découlant de modifications transcriptionnelles importantes des métabolismes glucidique et lipidique.

Parallèlement à cette perturbation du métabolisme hépatique, le système immunitaire des xénopes mâles exposés au triclosan et au mélange des deux molécules a été modifié. La transcription des peptides antimicrobiens a été augmentée et de l'activité phagocytaire splénique stimulée.

4.2.2 Conséquences de l'exposition aux perturbateurs endocriniens à long terme

Lors d'expositions chroniques à des concentrations environnementales faibles, le benzo[*a*]pyrène et le triclosan ont induit un retard important de la métamorphose des têtards exposés.

Au stade adulte, les deux molécules et leur mélange ont provoqué des perturbations importantes de la physiologie hépatique des femelles exposées. En effet, des perturbations transcriptionnelles des métabolismes glucidique et lipidique associées à l'émergence d'une stéatose hépatique et d'une hépatotoxicité ont suggéré la mise en place de phénotypes semblables à une stéatopathie non alcoolique (NAFLD) chez les femelles exposées. De plus, lors de l'étude transcriptionnelle, sont apparus un stress du réticulum endoplasmique ainsi qu'un processus inflammatoire chez les femelles exposées au benzo[*a*]pyrène, évoquant l'évolution du désordre métabolique vers une stéato-hépatite non alcoolique (NASH). Enfin, l'exposition au triclosan a semblé modifier le comportement sexuel des xénopes adultes. Ceci s'est traduit par une diminution importante de leur succès reproducteur.

Outre les effets directs sur le métabolisme et la reproduction des individus exposés, le benzo[*a*]pyrène, le triclosan et leur mélange ont également affecté leur descendance non exposée. Ces effets multigénérationnels se sont manifestés chez les individus issus de parents exposés par un retard de la métamorphose des têtards et par une moindre taille et une moindre masse en fin de métamorphose.

4.2.3 Expositions court terme *versus* expositions long terme

Chez les vertébrés, les perturbateurs endocriniens ont été étudiés pour leurs actions par le biais des récepteurs nucléaires d'hormones, y compris les récepteurs des œstrogènes, des androgènes, de la progestérone, des hormones thyroïdiennes, et des rétinoïdes. Ils ont alors été associés au développement de cancers, d'infertilité, d'obésité, de diabète et de troubles neurologiques (Schug *et al.*, 2011; Patterson *et al.*, 2015). Pour répondre à ces préoccupations, les études antérieures se sont majoritairement portées sur la définition des effets immédiats des perturbateurs endocriniens. Cependant, de plus en plus d'études prennent en compte la nature persistante de ces contaminants et montrent que des

expositions longues peuvent initier des phénotypes distincts de ceux observés lors d'expositions aiguës (Kuba *et al.*, 2010; Clarke *et al.*, 2012; Patterson *et al.*, 2015).

Il est intéressant de noter que dans nos travaux, des phénotypes très semblables à une NAFLD ont été observés chez les xénopes exposés à court et à long terme au benzo[*a*]pyrène, au triclosan et à leur mélange. Nos résultats confirment la littérature très récente qui révèle l'importance des contaminants environnementaux dans l'induction des NAFLD et des NASH chez des vertébrés non obèses. Les termes TAFLD (*toxicant-associated fatty liver disease*) et TASH (*toxicant-associated steatohepatitis*) ont d'ailleurs été inventés pour refléter le lien entre les expositions aux xénobiotiques et les syndromes métaboliques (Arciello *et al.*, 2013; Wahlang *et al.*, 2013; Al-Eryani *et al.*, 2015). En effet, de récentes études préoccupantes suggèrent que chez les vertébrés, et notamment chez l'Homme, l'augmentation de l'exposition aux perturbateurs endocriniens pourrait être associée à l'augmentation de l'incidence des principales maladies des pays industrialisés, en particulier des troubles métaboliques que sont l'obésité, le diabète et le syndrome métabolique (Casals-Casas et Desvergne, 2011). Parmi les différents mécanismes d'action proposés, les perturbateurs endocriniens pourraient se lier spécifiquement à des récepteurs nucléaires (p. ex. les récepteurs des hormones stéroïdes ou des hormones thyroïdiennes) et moduler les voies hormonales correspondantes. Il en résulterait des modifications de l'adipogenèse ou de la voie de signalisation de l'insuline (Casals-Casas et Desvergne, 2011).

Nos analyses transcriptomiques ont montré que les perturbations provoquées lors des expositions courtes ou longues, correspondent à la modification transcriptionnelle de gènes différents mais appartenant à des voies métaboliques semblables. Ceci semble indiquer la robustesse de nos résultats concernant la réponse des xénopes à l'exposition aux benzo[*a*]pyrène, au triclosan et à leur mélange.

Cependant, ces similitudes doivent être nuancées par le fait que nos études se sont principalement concentrées sur un organe, le foie, et que nous n'avons pas abordé les effets potentiels sur d'autres organes voire d'autres systèmes tel le système reproducteur. Par ailleurs, l'analyse fine des transcriptomes a suggéré une évolution possible du phénotype des femelles exposées de manière chronique au benzo[*a*]pyrène. Si la pression chimique avait été maintenue plus longuement, l'évolution du syndrome métabolique aurait peut-être induit des phénotypes plus contrastés entre les expérimentations à court et long terme.

D'un point de vue logistique, les expérimentations à long terme sont évidemment moins aisées à mettre en place. Néanmoins, elles sont certainement plus représentatives des phénomènes rencontrés *in natura* (contaminations chroniques : concentrations faibles et temps d'exposition longs). Elles permettent également d'étudier les effets multigénérationnels avec plus de réalisme puisque les individus sont exposés durant les périodes critiques de leur développement, y compris la gamétogenèse. Ainsi, malgré les similitudes des phénotypes apparents à l'issue dans nos travaux, il serait imprudent de vouloir substituer les démarches à long terme par celles à court terme pour de prochaines investigations.

4.2.4 Conséquences sur le déclin des populations d'amphibiens

Les contaminants environnementaux sont une des causes principales du déclin des populations d'amphibiens dans le monde. Nos études ont révélé de multiples effets sur les traits d'histoire de vie ou la physiologie des xénopes au stade têtard et au stade adulte pouvant l'expliquer.

Chez les têtards exposés, le benzo[*a*]pyrène et le triclosan ont induit un retard significatif de la métamorphose. Pour les amphibiens, l'allongement de la phase larvaire impliquerait une plus longue exposition à la prédation et une plus grande susceptibilité à la virulence des agents pathogènes du type ranavirus ou à la dessiccation si la ponte était effectuée dans une mare temporaire (Lannoo, 2005; Gray et Chinchar, 2015). Concernant la descendance non exposée, ce retard s'est accompagné d'une diminution de la taille et de la masse des xénopes. *In natura*, ces modifications morphologiques pourraient favoriser leur prédation et compromettre leur nutrition (Hayes *et al.*, 2006a). Les effets du benzo[*a*]pyrène et du triclosan sur la métamorphose ont donc été doubles : directs en retardant la métamorphose des têtards exposés, indirects en impactant le développement de la progéniture non exposée. En revanche nous ignorons si les effets auraient été convolués, cumulés, lors d'une exposition de la progéniture.

A court terme, chez l'adulte mâle, les expositions à des concentrations fortes en triclosan et en mélange benzo[*a*]pyrène/triclosan ont modifié les activités clés du système immunitaire inné. Cette immunostimulation induite par les perturbateurs endocriniens pourrait témoigner d'une réponse quantitativement et qualitativement inappropriée. Cette dernière ne permettrait pas de faire face de façon efficace à une infection par un agent

pathogène (Reynaud et Deschaux, 2006). Or, la *Global Amphibian Assessment* identifie les maladies infectieuses comme la principale menace pour les espèces d'amphibiens en danger critique d'extinction (IUCN, 2008). Les agents infectieux comme les ranavirus ou le champignon *Batrachochytrium dendrobatidis* ainsi que leurs effets sur les populations sont constatés partout dans le monde (Alford, 2010). L'augmentation des expositions aux perturbateurs endocriniens comme le triclosan pourrait donc rendre les amphibiens encore plus sensibles à ces maladies infectieuses.

L'exposition à long terme au triclosan a eu de fortes répercussions sur le succès reproducteur des xénopes exposés. Comme d'autres molécules organohalogénées, le triclosan a modifié le comportement copulateur des amphibiens. Il pourrait augmenter l'agressivité des femelles ou inhiber les chants nuptiaux des mâles (Chung *et al.*, 2001; Ganser, 2009; Faass *et al.*, 2013). Associées aux altérations de la métamorphose, ces perturbations pourraient amoindrir le recrutement dans les populations. Le terme « recrutement » désigne le nombre de juvéniles qui sont ajoutés à une population par la reproduction et qui atteignent la maturité sexuelle (Ricklefs et Miller, 2005). La baisse du recrutement est donc une cause directe de l'effondrement des populations d'amphibiens.

Enfin, une perturbation marquée du métabolisme hépatique a été observée chez les xénopes femelles exposées au benzo[*a*]pyrène, au triclosan et à leur mélange à long terme. Cette perturbation, semblable à une NAFLD, a paru s'aggraver en NASH chez les femelles exposées à long terme au benzo[*a*]pyrène. Si l'évolution de ces phénotypes se confirmait lors d'expositions plus longues *in natura*, l'accentuation des désordres métaboliques pourrait grandement altérer les fonctions hépatiques des amphibiens. Le foie est l'organe majeur de la régulation du cholestérol à partir duquel sont synthétisées les hormones stéroïdiennes dans les gonades ou les glandes surrénales. Le catabolisme de ces hormones stéroïdiennes est aussi effectué dans le foie (Waxman, 1992). Il est également l'organe de biosynthèse de la vitellogénine, la macromolécule précurseur du vitellus, la réserve énergétique utilisée dans les œufs et consommée par les embryons au cours de leur développement (DiCroce *et al.*, 1997; Denslow *et al.*, 1999). Ainsi, les syndromes métaboliques du foie pourraient fortement compromettre la régulation du système reproducteur.

En résumé, le benzo[*a*]pyrène et le triclosan pourraient participer au déclin des amphibiens en altérant le recrutement dans les populations, car ils sont susceptibles d'augmenter la sensibilité de la population étudiée aux agents pathogènes et de perturber le métabolisme hépatique des amphibiens adultes (Figure 4.1).

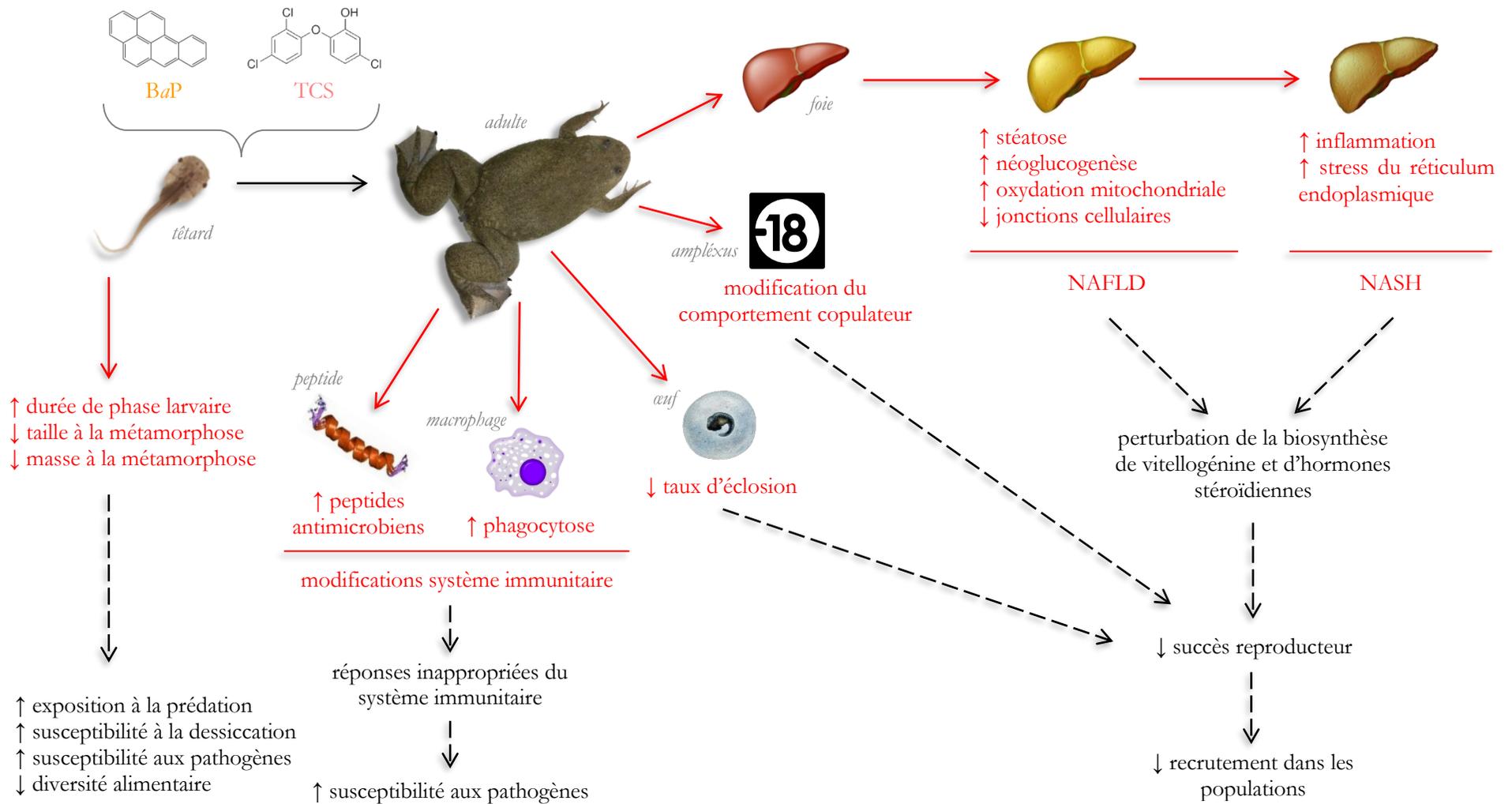


Figure 4.1 : Bilan des perturbations physiologiques induites par les perturbateurs endocriniens benzo[a]pyrène et triclosan (en rouge) pouvant impacter les populations d'amphibiens.

4.3 Perspectives de la thèse

Nos résultats confirment l'intérêt de prendre en compte les effets des perturbateurs endocriniens sur le métabolisme global des amphibiens. En effet, chez les vertébrés, le métabolisme énergétique joue un rôle central et ses perturbations peuvent notamment modifier le système reproducteur (Monget *et al.*, 1998). De plus il apparaît pertinent de réaliser des études à long terme et d'inclure l'observation de la descendance des individus exposés pour apprécier les perturbations mises en jeu sur plusieurs générations, et leurs conséquences pouvant entraîner le déclin des populations.

4.3.1 Perspectives pour l'étude des conséquences de l'exposition aux perturbateurs endocriniens sur la génération exposée F0

4.3.1.1 Sur le métabolisme énergétique

Les expositions à long terme des xénopes au benzo[*a*]pyrène, au triclosan et à leur mélange ont révélé l'émergence d'un phénotype semblable à une NAFLD chez les femelles exposées. L'analyse transcriptomique a suggéré un stress du réticulum endoplasmique et une inflammation reflétant l'évolution de la NAFLD en NASH. Cette analyse a également révélé la sous-transcription de gène impliqué dans la lipogenèse. Ce type de sous-régulation inversement corrélé avec l'apparente atteinte du foie a été défini chez l'Homme comme une « NASH avancée », et l'évolution de la maladie en fibrose (Nagaya *et al.*, 2010). Une analyse histologique de coupe de foie par une coloration trichome de Masson permettrait de vérifier si cette étape s'est déjà mise en place dans nos échantillons. En effet cette méthode permet de différencier les fibres de collagène dans un tissu, notamment dans le cas d'une fibrose (Kleiner *et al.*, 2005). Par ailleurs, le réticulum endoplasmique est impliqué dans la dégradation des protéines via le protéasome dont le dysfonctionnement a été associé au stress du réticulum endoplasmique (Otoda *et al.*, 2013). La baisse de l'activité du protéasome a été ainsi reliée à l'aggravation de nombreux désordres métaboliques comme l'obésité ou la stéatose hépatique mais également à une augmentation du stress oxydatif et de la sévérité de la NAFLD (Donohue *et al.*, 2004; Tomaru *et al.*, 2012; Waller-Evans *et al.*, 2013). En

collaboration avec l'Université de Pau, nous avons entrepris de mesurer l'activité du protéasome du foie des xénopes femelles de la génération F0. Les premiers résultats sont très encourageants car ils montrent une baisse significative de l'activité protéasomale chez les femelles exposées aux perturbateurs endocriniens par rapport aux femelles témoins (Figure 4.2). De plus, l'effet plus important chez les femelles *F0.B* exposées au BaP étaye notre hypothèse d'une aggravation de la NAFLD en NASH chez ces femelles.

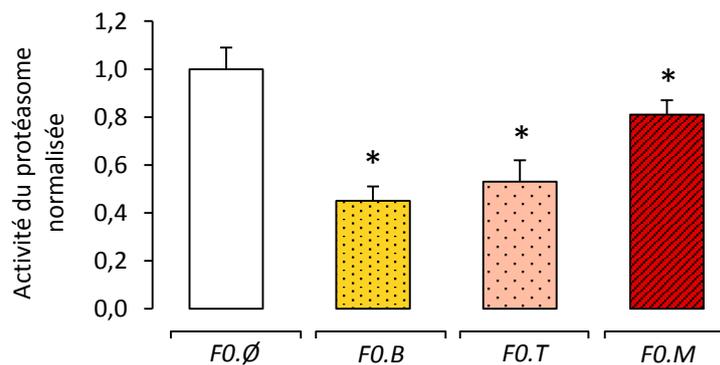


Figure 4.2 : Activité du protéasome hépatique des xénopes femelles de la génération F0. Activité normalisée par rapport aux témoins. Les données représentent les valeurs moyennes \pm écart-type, les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin *F0.Ø* : *, $p < 0,05$.

Les expositions à long terme ont révélé une modification de la capacité respiratoire des mitochondries isolées des xénopes femelles. De plus le gène de la *carnitine palmitoyltransferase 1B (CBT1B)*, enzyme impliquée dans le passage des acides gras à chaîne longue du cytosol à la matrice mitochondriale (Begrache *et al.*, 2013), a été retrouvé sur-transcrit chez les femelles xénopes exposées à long terme au BaP. Nous avons hypothétiquement associé cette hausse de la respiration mitochondriale et de la transcription de *CBT1B* à une adaptation métabolique pour lutter contre l'accumulation de graisse dans le foie. Cette adaptation pourrait être médiée par une activation de la β -oxydation, la principale voie métabolique de dégradation des acides gras. Nous pourrions valider fonctionnellement notre hypothèse en mesurant l'activité des enzymes clés de cette voie comme l'*acyl-coenzyme A déshydrogénase* ou la *3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase* également retrouvées surexprimées chez des patients atteints de NAFLD (Kohjima *et al.*, 2007). La voie de dégradation des lipides par la β -oxydation produit de l'acétylcoenzyme A qui entre dans la première étape du cycle de Krebs, où il est condensé à l'oxaloacétate en citrate. Or, lorsque la néoglucogénèse est active dans le foie, l'oxaloacétate est détourné puis converti en phosphoénolpyruvate par la

phosphoénolpyruvate carboxykinase (PCK1) pour aboutir finalement à la synthèse de glucose. Le cycle de Krebs s'avère donc central dans les voies métaboliques apparues altérées par les perturbateurs endocriniens dans notre étude. Pour compléter la compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces perturbations, il serait intéressant d'étudier le cycle de Krebs en mesurant les activités des enzymes impliquées. En collaboration avec l'Université de Pau, cette étude a été initiée chez les femelles de la génération exposée F0. Les résultats préliminaires montrent une baisse significative de l'activité de l'aconitase hépatique chez les femelles exposées aux perturbateurs endocriniens par rapport aux femelles témoins (Figure 4.3). Dans le cycle de Krebs, l'aconitase intervient dans la phase qui suit la condensation de l'acétylcoenzyme A et de l'oxaloacétate en citrate, c'est-à-dire dans la déshydratation du citrate. Dans la littérature, une baisse de son activité est associée au diabète mais également au stress oxydatif mitochondrial (Crescenzo *et al.*, 2008; Montez *et al.*, 2012).

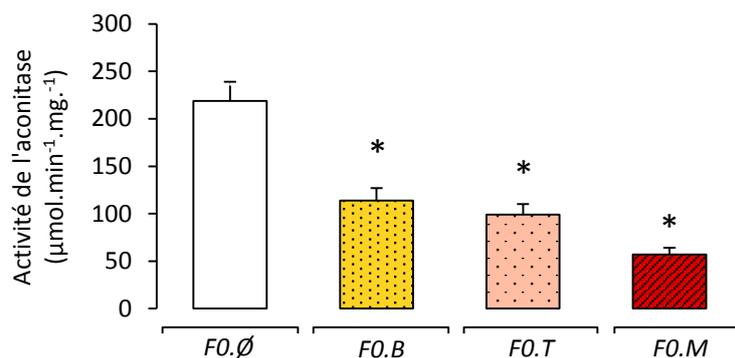


Figure 4.3 : Activité de l'aconitase des xénopes femelles de la génération F0. Activité hépatique exprimée en µmol de NADPH réduites par minute et par mg de protéines. Les données représentent les valeurs moyennes ± écart-type, les astérisques indiquent une différence significative avec la population témoin F0.Ø : *, $p < 0.05$.

Le foie, organe central du métabolisme énergétique est impliqué dans les principales voies de régulation des glucides et des lipides. Ainsi, son rôle dans la mise en place de perturbations métaboliques comme les NAFLD est prépondérant. Cependant, les NAFLD sont couramment associées à de l'insulino-résistance et un phénotype semblable a été observé dans nos travaux (Korenblat *et al.*, 2008; Saponaro *et al.*, 2015). La capacité à maintenir des taux de glycémie normaux implique une interaction complexe entre la sécrétion d'insuline par le pancréas et la réactivité à l'insuline des muscles squelettiques, du foie, et du

tissu adipeux (Wei *et al.*, 2008). Il a été montré que la graisse dans le pancréas était associée à un défaut de sécrétion de l'insuline et une induction de processus apoptotiques (Lim *et al.*, 2011; Saponaro *et al.*, 2015). D'autre part les triglycérides intramyocellulaires ont été associés à une insulino-résistance et une altération de l'absorption du glucose dans les muscles squelettiques (Boden *et al.*, 2001; Saponaro *et al.*, 2015). Afin d'améliorer la compréhension du phénotype semblable à de l'insulino-résistance que nous avons observée, il serait important de doser l'insuline plasmatique et d'étudier la transcription des gènes impliqués dans les voies de production, de sécrétions et de signalisation de l'insuline dans le pancréas et dans le muscle squelettique. Pour compléter ces données, nous pourrions effectuer des mesures du contenu musculaire en lipides et en glycogène. Ces mesures pourraient être réalisées de manière histologique (coloration ORO pour les lipides et acide périodique de Schiff (PAS) pour le glycogène) ou biochimique (méthodes acide sulfurique/vanilline pour les lipides et anthrone pour le glycogène) (Kaufmann, 2010).

L'investigation des perturbations du métabolisme hépatique chez les mâles est en cours de réalisation. De manière intéressante les premiers résultats n'ont montré aucune différence significative du rapport hépato-somatique des mâles exposés par rapport aux mâles témoins. De même, les expositions aux benzo[*a*]pyrène, au triclosan et à leur mélange n'ont pas modifié la réponse des mâles au test de tolérance au glucose. Une analyse du transcriptome hépatique associée à une étude du système reproducteur pourrait apporter des éléments de réponses quant aux différences de perturbations du métabolisme suivant le sexe des xénopes.

4.3.1.2 Sur le système reproducteur

Les analyses des transcriptomes hépatiques des femelles exposées aux perturbateurs endocriniens ont mis en évidence une modification de la transcription de gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des stéroïdes et notamment des stérols. Ceci pourrait avoir des répercussions sur la biosynthèse des hormones stéroïdiennes. Chez les amphibiens, l'œstrogène principal est le 17 β -œstradiol et les principaux androgènes synthétisés sont la testostérone et l'androstanolone (Kloas *et al.*, 2009). La conversion de la testostérone en androstanolone est catalysée par la *3- α -5- α -steroid-4-dehydrogenase* (*SRD5A1* et *SRD5A2*), et la conversion de la testostérone en 19-hydroxytestostérone, puis en 19-oxotestostérone et

enfin en 17β -œstradiol sont catalysées par l'aromatase (*CYP19A1*) (Kanehisa *et al.*, 2012). Aucune modification de la transcription de ces gènes clés de la biosynthèse de ces hormones stéroïdiennes n'a été mise en évidence chez les mâles exposés à court terme. Néanmoins il serait intéressant de quantifier leur transcription par une approche gène ciblé du type RT-qPCR sur des extraits d'ARN des gonades des xénopes exposés à long terme. En effet, ces expositions longues ont intégré la période critique de l'organogenèse des gonades et aurait pu la modifier par une interaction entre les perturbateurs endocriniens et les récepteurs aux hormones stéroïdiennes (Hayes *et al.*, 2006b; Kloas et Lutz, 2006; Hayes *et al.*, 2010a). Les données transcriptionnelles pourraient être complétées par une quantification du niveau de ces hormones par leur dosage plasmatique. Cette dernière méthode permettrait également de confirmer notre hypothèse d'une modification du comportement sexuel lié au triclosan. Nous pourrions également doser les hormones avec ou sans stimulation des xénopes à l'hCG (comme lors de la reproduction) et vérifier si cette stimulation se reporte uniformément sur les niveaux d'hormones indépendamment des expositions.

Enfin, par une approche histologique nous pourrions aussi évaluer si l'exposition au benzo[*a*]pyrène et au triclosan à long terme induirait une atteinte de l'intégrité des gonades comme cela a déjà été montré avec l'atrazine sur les testicules (Hayes *et al.*, 2011). Ces investigations pourraient être réalisées par une coloration HE de coupes de testicules. Elles permettraient également d'apprécier la maturité des gamètes par une observation et un comptage des cellules dans les différents stades de la spermatogenèse.

Ces réponses apporteraient une meilleure compréhension du rôle des perturbateurs endocriniens dans le déclin des populations des amphibiens car elles permettraient de mieux définir la part du métabolisme et celle du système reproducteur dans les perturbations observées.

4.3.1.3 Réversibilité des perturbations

Chez les vertébrés supérieurs, les stades de développement des syndromes métaboliques NAFLD et NASH sont réversibles (Garcia-Caraballo *et al.*, 2013; Gorden *et al.*, 2015). Les phénotypes observés chez les xénopes exposés étant semblables, ils pourraient également être réversibles lorsque la pression chimique est supprimée. Afin de valider cette hypothèse, nous avons maintenu depuis un an des xénopes de la génération parentale dans

un milieu propre. Par une approche à la fois histologique (HE, ORO, trichome de Masson) et moléculaire (RT-qPCR) nous pourrions comparer les réponses obtenues lors de l'exposition avec les réponses après une année de dépuration.

4.3.2 Perspectives pour l'étude des conséquences de l'exposition aux perturbateurs endocriniens sur la descendance non exposée F1

À l'heure actuelle, les xénopes de la descendance F1 entament leur maturation. L'exposition de la génération parentale au benzo[*a*]pyrène et au triclosan a mis en évidence des modifications significatives de la métamorphose et de la morphologie de la progéniture. Afin d'évaluer la persistance de perturbations après la maturité sexuelle, nous pourrions évaluer leur statut métabolique et reproducteur par la mise en place de tests identiques à ceux réalisés sur la génération F0 (transcription de gènes, histologie, test de tolérance au glucose, dosage hormonaux, ...).

Théoriquement, les xénopes de la génération F1 ont été furtivement exposés lors de la gamétogenèse des individus parentaux. Afin d'apprécier l'existence d'effet trans-générationnel, il serait intéressant de faire se reproduire les individus de la génération F1, et de suivre le développement et la croissance de cette génération F2 qui n'aurait jamais été en contact avec les contaminants, même dans cette étape de la gamétogenèse.

4.3.3 Vers une validation des observations sur des espèces de terrain

Les expérimentations en laboratoire autorisent une simplification de l'environnement (régulation de la température, de l'humidité et des paramètres chimiques du milieu) qui apporte généralement une meilleure reproductibilité des données (Alford, 2010). Le corollaire est que la perte de complexité implique également une perte de représentativité écologique. En conséquence, les validations expérimentales nécessitent d'être éprouvées sur le terrain.

Notre étude avait comme objectif de définir les mécanismes liés à la réponse des amphibiens à une exposition à de faibles concentrations de perturbateurs endocriniens. Pour permettre les analyses mécanistiques nous avons choisi comme espèce l'amphibien modèle *Xenopus tropicalis* dont le génome est séquencé et assemblé (Hellsten *et al.*, 2010). Avant d'envisager l'expérimentation sur le terrain, il est nécessaire de valider les résultats obtenus chez les xénopes avec une autre espèce d'anoure plus représentative des espèces rencontrées *in natura*. C'est pourquoi, une étude portant sur les effets des perturbateurs endocriniens sur le métabolisme hépatique de la grenouille verte *Pelophylax kl. esculentus* est en cours de réalisation. Des tests de tolérance au glucose ont été effectués sur des grenouilles vertes, mâles et femelles, exposées pendant 18 heures à $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ de l'une des six différentes molécules décrites comme perturbatrices endocriniennes : les HAP benzo[*a*]pyrène et benzo[*b*]fluoranthène, l'antibactérien organochloré triclosan, l'anti-inflammatoire non stéroïdien ibuprofène, l'insecticide phénylpyrazole fipronil et le composé organique aromatique bisphénol A. Les résultats préliminaires sont très prometteurs puisqu'ils ont montré une tendance à un allongement de la durée du retour à une glycémie normale après une injection de glucose, suggérant une moins bonne tolérance au glucose (Figure 4.4 ; Veyrenc *et al.*, *in prep*).

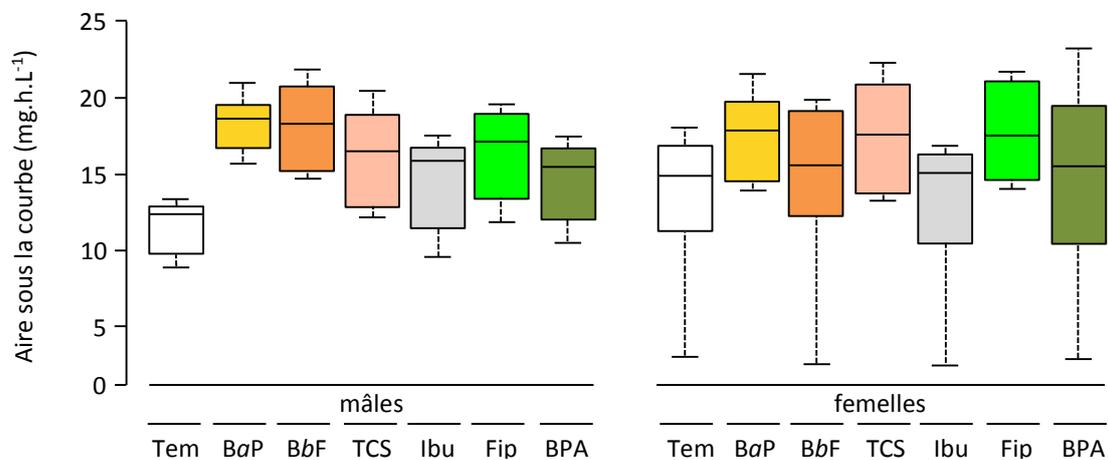


Figure 4.4 : Aire sous les courbes de réponse au test de tolérance au glucose chez *Pelophylax kl. esculentus* exposé au perturbateurs endocriniens. Tem, témoin ; BaP, benzo[*a*]pyrène ; BbF, benzo[*b*]fluoranthène ; TCS, triclosan ; Ibu, ibuprofène ; Fip, fipronil ; BPA, bisphénol A. Les moyennes sont représentées par les barres horizontales et les barres verticales mènent jusqu'aux valeurs minimale et maximale.

La meilleure description des perturbations provoquées par une exposition aux perturbateurs endocriniens devrait nous permettre de définir des biomarqueurs utilisables sur le terrain en milieu contaminé.

4.4 Conclusion finale

Cette thèse met en évidence le potentiel du triclosan et du benzo[*a*]pyrène à perturber la physiologie des amphibiens, et ce même à des concentrations réalistes d'un point de vue environnemental. Les travaux effectués ont plus particulièrement mis en exergue le rôle du métabolisme hépatique dans les effets des perturbateurs endocriniens sur les amphibiens. Les observations faites sur les individus exposés à long terme et sur leur descendance apportent en outre des débuts de réponse quant aux rôles de la contamination chronique des milieux sur le déclin des populations d'amphibiens.

Pour conclure, l'approche adoptée, conjuguant l'étude de mécanismes moléculaires, des altérations tissulaires, des perturbations fonctionnelles et des modifications du succès reproducteur, révèle l'intérêt de ce type d'étude intégrative dans l'identification et la compréhension des effets des perturbateurs endocriniens sur les organismes. Plus largement, cette thèse soulève des perspectives intéressantes en écotoxicologie comme en toxicologie dans le cadre de l'étude des effets des perturbateurs endocriniens sur les animaux. En effet, étant donné l'interdépendance des grandes voies physiologiques, nos travaux confirment la nécessité d'étudier la perturbation des voies métaboliques comme facteur pouvant expliquer les effets délétères des perturbateurs endocriniens sur les organismes. Ainsi cette thèse soulève pour la toute première fois la question de l'implication d'une dérégulation du métabolisme dans le phénomène de déclin des populations d'amphibiens.

5 Références bibliographiques

A

Aas E, Baussant T, Balk L, Liewenborg B, Andersen OK. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: a laboratory experiment with Atlantic cod. *Aquat. Toxicol.* 2000; 51: 241–258.

Agüera A, Fernández-Alba AR, Piedra L, Mézcua M, Gómez MJ. Evaluation of triclosan and biphenylol in marine sediments and urban wastewaters by pressurized liquid extraction and solid phase extraction followed by gas chromatography mass spectrometry and liquid chromatography mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2003; 480: 193–205.

Ahne W, Bremont M, Hedrick RP, Hyatt AD, Whittington RJ. Iridoviruses associated with epizootic haematopoietic necrosis (EHN) in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 1997; 13: 367–373.

Ahola M, Nordstrom M, Banks PB, Laanetu N, Korpimäki E. Alien mink predation induces prolonged declines in archipelago amphibians. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2006; 273: 1261–1265.

Alford RA. Declines and the global status of amphibians. In: *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Society of environmental toxicology and chemistry (SETAC); 2010. p. 13–45.

Altig R, Whiles MR, Taylor CL. What do tadpoles really eat? Assessing the trophic status of an understudied and imperiled group of consumers in freshwater habitats. *Freshw. Biol.* 2007; 52: 386–395.

Amador J. Animal mythic symbol in the rock art of the sonoran desert. *Non Publ.* 2015

AmphibiaWeb. AmphibiaWeb: Information on amphibian biology and conservation. 2015

Anderson JS. The Rise of Amphibians: 365 Million Years of Evolution. *Copeia* 2011; 2011: 473–475.

Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol.* 2010; 11: R106.

Andreone F, Mercurio V, Mattioli F. Between environmental degradation and international pet trade: conservation strategies for the threatened amphibians of Madagascar. *Atti Soc. Ital. Sci. Nat. E Mus. Civ. Storia Nat. Milan* 2006; 95: 81–96.

Ang S-L, Low KC. The Chinese and their daily motivation—The Brunei case study. *J. Res. Int. Bus. Manag.* 2012; 2: 39–50.

Anthony CD, Hickerson CAM, Venesky MD. Responses of juvenile terrestrial salamanders to introduced (*Lithobius forficatus*) and native centipedes (*Scolopocryptops sexspinosus*). *J. Zool.* 2007; 271: 54–62.

Aranami K, Readman JW. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater. *Chemosphere* 2007; 66: 1052–1056.

Araújo MB, Thuiller W, Pearson RG. Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *J. Biogeogr.* 2006; 33: 1712–1728.

Arciello M, Gori M, Maggio R, Barbaro B, Tarocchi M, Galli A, et al. Environmental Pollution: A Tangible Risk for NAFLD Pathogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2013; 14: 22052–22066.

Arendt BM, Comelli EM, Ma DWL, Lou W, Teterina A, Kim T, et al. Altered hepatic gene expression in nonalcoholic fatty liver disease is associated with lower hepatic n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *Hepatology* 2015; 61: 1565–1578.

Arfé B. Oral and Written Discourse Skills in Deaf and Hard of Hearing Children: The Role of Reading and Verbal Working Memory. *Top. Lang. Disord.* 2015; 35: 180–197.

Aroor AR, James TT, Jackson DE, Shukla SD. Differential Changes in MAP Kinases, Histone Modifications, and Liver Injury in Rats Acutely Treated With Ethanol. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2010; 34: 1543–1551.

Association épiscopale liturgique pour les pays francophones, <http://www.aelf.org/bible-liturgie>.

Azzout-Marniche D, Bécard D, Guichard C, Foretz M, Ferré P, Fougelle F. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.* 2000; 350: 389–393.

B

Baan R, Grosse Y, Straif K, Secretan B, Ghissassi F El, Bouvard V, et al. A review of human carcinogens—Part F: Chemical agents and related occupations. *Lancet Oncol.* 2009; 10: 1143–1144.

Babbitt KJ, Baber MJ, Brandt LA. The effect of woodland proximity and wetland characteristics on larval anuran assemblages in an agricultural landscape. *Can. J. Zool.-Rev. Can. Zool.* 2006; 84: 510–519.

Babbitt KJ, Meshaka WE. Benefits of eating conspecifics: Effects of background diet on survival and metamorphosis in the Cuban Treefrog (*Osteopilus septentrionalis*). *Copeia* 2000: 469–474.

Badawy MI, Wahaab RA, Abou Waly HF. Petroleum and chlorinated hydrocarbons in water from Lake Manzala and associated canals. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1995; 55: 258–263.

Bado-Nilles A, Techer R, Porcher JM, Geffard A, Gagnaire B, Betouille S, et al. Detection of immunotoxic effects of estrogenic and androgenic endocrine disrupting compounds using splenic immune cells of the female three-spined stickleback, *Gasterosteus aculeatus* (L.). *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014; 38: 672–683.

Bai C, Garner TWJ, Li Y. First Evidence of *Batrachochytrium dendrobatidis* in China: Discovery of Chytridiomycosis in Introduced American Bullfrogs and Native Amphibians in the Yunnan Province, China. *EcoHealth* 2010; 7: 127–134.

Balch GC, Vélez-Espino LA, Sweet C, Alae M, Metcalfe CD. Inhibition of metamorphosis in tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). *Chemosphere* 2006; 64: 328–338.

Baldrian-Hussein F. Lü Tung-pin in Northern Sung Literature. *Cah. Extrême-Asie* 1986; 2: 133–169.

Bal V, Vojar J, Civi P, andera M, Roznek R. Chytridiomycosis risk among Central European amphibians based on surveillance data. *Dis. Aquat. Organ.* 2014; 112: 1–8.

Banerjee S. Solubility of organic mixtures in water. *Environ. Sci. Technol.* 1984; 18: 587–591.

Bank MS, Crocker JB, Davis S, Brotherton DK, Cook R, Behler J, et al. Population decline of northern dusky salamanders at Acadia National Park, Maine, USA. *Biol. Conserv.* 2006; 130: 230–238.

- Barka T, Popper H. Liver enlargement and drug toxicity. *Medicine (Baltimore)* 1967; 46: 103–117.
- Barni S, Vaccarone R, Bertone V, Frascini A, Bernini F, Fenoglio C. Mechanisms of changes to the liver pigmentary component during the annual cycle (activity and hibernation) of *Rana esculenta* L. *J. Anat.* 2002; 200: 185–194.
- Barnosky AD, Matzke N, Tomiya S, Wogan GOU, Swartz B, Quental TB, et al. Has the Earth's sixth mass extinction already arrived ? *Nature* 2011; 471: 51–57.
- Barron L, Havel J, Purcell M, Szpak M, Kelleher B, Paull B. Predicting sorption of pharmaceuticals and personal care products onto soil and digested sludge using artificial neural networks. *Analyst* 2009; 134: 663–670.
- Beard KH, O'Neill EM. Infection of an invasive frog *Eleutherodactylus coqui* by the chytrid fungus *Batrachochytrium dendrobatidis* in Hawaii. *Biol. Conserv.* 2005; 126: 591–595.
- Bechmann LP, Hannivoort RA, Gerken G, Hotamisligil GS, Trauner M, Canbay A. The interaction of hepatic lipid and glucose metabolism in liver diseases. *J. Hepatol.* 2012; 56: 952–964.
- Becker CG, Fonseca CR, Baptista Haddad CF, Batista RF, Prado PI. Habitat split and the global decline of amphibians. *Science* 2007; 318: 1775–1777.
- Begrache K, Massart J, Robin M-A, Bonnet F, Fromenty B. Mitochondrial adaptations and dysfunctions in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2013; 58: 1497–1507.
- Behrends T, Urbatzka R, Krackow S, Elepfandt A, Kloas W. Mate calling behavior of male South African clawed frogs (*Xenopus laevis*) is suppressed by the antiandrogenic endocrine disrupting compound flutamide. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2010; 168: 269–274.
- Békaert C, Rast C, Ferrier V, Bispo A, Jourdain MJ, Vasseur P. Use of in vitro (Ames and Mutatox tests) and in vivo (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. *Org. Geochem.* 1999; 30: 953–962.
- Bell LN, Lee L, Saxena R, Bemis KG, Wang M, Theodorakis JL, et al. Serum proteomic analysis of diet-induced steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 2010; 298: G746–G754.
- Bergerard Y, Lamotte M. L'emploi d'un crapaud Ouest-Africain, *Xenopus tropicalis* (Gray) (*X. calcaratus* Peters) pour le diagnostic de la grossesse. 1949; 41
- Berger L, Speare R, Daszak P, Green DE, Cunningham AA, Goggin CL, et al. Chytridiomycosis causes amphibian mortality associated with population declines in the rain forests of Australia and Central America. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95: 9031–9036.
- Berger L, Speare R, Hyatt AD. Chytrid fungi and amphibian declines: Overview, implications and future directions. In: *Decline and disappearances of Australian frogs. Environment Australia*; 1999. p. 23–33.
- Bergeron CM, Hopkins WA, Todd BD, Hepner MJ, Unrine JM. Interactive effects of maternal and dietary mercury exposure have latent and lethal consequences for amphibian larvae. *Environ. Sci. Technol.* 2011; 45: 3781–3787.
- Bester K. Fate of Triclosan and Triclosan-Methyl in Sewage Treatment Plants and Surface Waters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2005; 49: 9–17.
- Beyer J, Jonsson G, Porte C, Krahn MM, Ariese F. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2010; 30: 224–244.

- Bhandari RK, Deem SL, Holliday DK, Jandegian CM, Kassotis CD, Nagel SC, et al. Effects of the environmental estrogenic contaminants bisphenol A and 17 α -ethinyl estradiol on sexual development and adult behaviors in aquatic wildlife species. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015; 214: 195–219.
- Bidleman TF. Atmospheric processes. *Environ. Sci. Technol.* 1988; 22: 361–367.
- Bitter A, Nüssler AK, Thasler WE, Klein K, Zanger UM, Schwab M, et al. Human Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1a Contributes Significantly to Hepatic Lipogenic Gene Expression. *Cell. Physiol. Biochem.* 2015; 35: 803–815.
- Blackett PR, Sanghera DK. Genetic determinants of cardiometabolic risk: A proposed model for phenotype association and interaction. *J. Clin. Lipidol.* 2013; 7: 65–81.
- Blaustein AR, Bancroft BA. Amphibian population declines: evolutionary considerations. *BioScience* 2007; 57: 437–444.
- Blaustein AR, Han BA, Relyea RA, Johnson PTJ, Buck JC, Gervasi SS, et al. The complexity of amphibian population declines: understanding the role of cofactors in driving amphibian losses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011; 1223: 108–119.
- Blaustein AR, Walls SC, Bancroft BA, Lawler JJ, Searle CL, Gervasi SS. Direct and Indirect Effects of Climate Change on Amphibian Populations. *Diversity* 2010; 2: 281–313.
- Blaustein J, Sadeh A, Blaustein L. Influence of fire salamander larvae on among-pool distribution of mosquito egg rafts: oviposition habitat selection or egg raft predation? *Hydrobiologia* 2014; 723: 157–165.
- Blumer M. Polycyclic aromatic compounds in nature. *Sci. Am.* 1976; 234: 35–45.
- Bock M, Lyndall J, Barber T, Fuchsman P, Perruchon E, Capdevielle M. Probabilistic application of a fugacity model to predict triclosan fate during wastewater treatment. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2010; 6: 393–404.
- Boden G, Lebed B, Schatz M, Homko C, Lemieux S. Effects of Acute Changes of Plasma Free Fatty Acids on Intramyocellular Fat Content and Insulin Resistance in Healthy Subjects. *Diabetes* 2001; 50: 1612–1617.
- Bögi C, Levy G, Lutz I, Kloas W. Functional genomics and sexual differentiation in amphibians. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2002; 133: 559–570.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 2014; btu170.
- Bommarito T, Sparling DW, Halbrook RS. Toxicity of coal-tar pavement sealants and ultraviolet radiation to *Ambystoma Maculatum*. *Ecotoxicology* 2010a; 19: 1147–1156.
- Bommarito T, Sparling DW, Halbrook RS. Toxicity of coal-tar and asphalt sealants to eastern newts, *Notophthalmus viridescens*. *Chemosphere* 2010b; 81: 187–193.
- Boncompagni E, Fenoglio C, Vaccarone R, Chiari P, Milanese G, Fasola M, et al. Toxicity of chromium and heptachlor epoxide on liver of *Rana kl. esculenta*: A morphological and histochemical study. *Ital. J. Zool.* 2004; 71: 163–167.
- Boone MD, James SM. Interactions of an insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms. *Ecol. Appl.* 2003; 13: 829–841.
- Boone MD, Semlitsch RD. Interactions of an Insecticide with Larval Density and Predation in Experimental Amphibian Communities. *Conserv. Biol.* 2001; 15: 228–238.
- Boone MD, Semlitsch RD, Little EE, Doyle MC. Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish. *Ecol. Appl.* 2007; 17: 291–301.

- Bosch J, Carrascal LM, Duran L, Walker S, Fisher MC. Climate change and outbreaks of amphibian chytridiomycosis in a montane area of Central Spain; is there a link? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 2007; 274: 253–260.
- Bosch J, Martínez-Solano I, García-París M. Evidence of a chytrid fungus infection involved in the decline of the common midwife toad (*Alytes obstetricans*) in protected areas of central Spain. *Biol. Conserv.* 2001; 97: 331–337.
- Bowes JB, Snyder KA, Segerdell E, Gibb R, Jarabek C, Noumen E, et al. Xenbase: a *Xenopus* biology and genomics resource. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36: D761–D767.
- Bradley GA, Rosen PC, Sredl MJ, Jones TR, Longcore JE. Chytridiomycosis in Native Arizona Frogs. *J. Wildl. Dis.* 2002; 38: 206–212.
- Bradley PW, Gervasi SS, Hua J, Cothran RD, Relyea RA, Olson DH, et al. Differences in sensitivity to the fungal pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis* among amphibian populations: Pathogen effects across populations. *Conserv. Biol.* 2015; 29: 1347–1356.
- Brandt CA, Becker JM, Porta A. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils and terrestrial biota after a spill of crude oil in Trecate, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002; 21: 1638–1643.
- Bridges CM. Predator-prey interactions between two amphibian species: effects of insecticide exposure. *Aquat. Ecol.* 1999; 33: 205–211.
- Bridges CM. Long-Term Effects of Pesticide Exposure at Various Life Stages of the Southern Leopard Frog (*Rana sphenoccephala*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2000; 39: 91–96.
- Brismar K, Fernqvist-Forbes E, Wahren J, Hall K. Effect of insulin on the hepatic production of insulin-like growth factor-binding protein-1 (IGFBP-1), IGFBP-3, and IGF-I in insulin-dependent diabetes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1994; 79: 872–878.
- Brodeur JC, Sassone A, Hermida GN, Codugnello N. Environmentally-relevant concentrations of atrazine induce non-monotonic acceleration of developmental rate and increased size at metamorphosis in *Rhinella arenarum* tadpoles. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2013; 92: 10–17.
- Brodkin MA, Madhoun H, Rameswaran M, Vatnick I. Atrazine is an immune disruptor in adult northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environ. Toxicol. Chem.* 2007; 26: 80–84.
- Brodman R, Dorton R. The Effectiveness of Pond-Breeding Salamanders as Agents of Larval Mosquito Control. *J. Freshw. Ecol.* 2006; 21: 467–474.
- Brodman R, Ogger J, Bogard T, Long AJ, Pulver RA, Mancuso K, et al. Multivariate analyses of the influences of water chemistry and habitat parameters on the abundances of pond-breeding amphibians. *J. Freshw. Ecol.* 2003; 18: 425–436.
- Brooks S, Tyler CR, Sumpter JP. Egg quality in fish: what makes a good egg? *Rev. Fish Biol. Fish.* 1997; 7: 387–416.
- Broomhall SD. Egg temperature modifies predator avoidance and the effects of the insecticide endosulfan on tadpoles of an Australian frog. *J. Appl. Ecol.* 2004; 41: 105–113.
- Brown JR, Müller T, Kerby JL. The interactive effect of an emerging infectious disease and an emerging contaminant on Woodhouse's toad (*Anaxyrus woodhousii*) tadpoles. *Environ. Toxicol. Chem.* 2013; 32: 2003–2008.
- Brunengraber DZ, McCabe BJ, Kasumov T, Alexander JC, Chandramouli V, Previs SF. Influence of diet on the modeling of adipose tissue triglycerides during growth. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 2003; 285: E917–E925.

Brunner JL, Schock DM, Davidson EW, Collins JP. Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology* 2004; 85: 560–566.

Bruscalupi G, Castellano F, Scapin S, Trentalance A. Cholesterol metabolism in frog (*Rana esculenta*) liver: Seasonal and sex-related variations. *Lipids* 1989; 24: 105–108.

Bryer PJ, Elliott JN, Willingham EJ. The Effects of Coal Tar Based Pavement Sealer on Amphibian Development and Metamorphosis. *Ecotoxicology* 2006; 15: 241–247.

Bucciarelli GM, Blaustein AR, Garcia TS, Kats LB. Invasion Complexities: The Diverse Impacts of Nonnative Species on Amphibians. *Copeia* 2014; 2014: 611–632.

Bugel SM, White LA, Cooper KR. Inhibition of vitellogenin gene induction by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is mediated by aryl hydrocarbon receptor 2 (AHR2) in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquat. Toxicol.* 2013; 126: 1–8.

Burrowes PA, Joglar RL, Green DE. Potential causes for amphibian declines in Puerto Rico. *Herpetologica* 2004; 60: 141–154.

Buse MG. Hexosamines, insulin resistance and the complications of diabetes: current status. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2006; 290: E1–E8.

Bussmann UA, Pérez Sáez JM, Bussmann LE, Barañao JL. Aryl hydrocarbon receptor activation leads to impairment of estrogen-driven chicken vitellogenin promoter activity in LMH cells. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 2013; 157: 111–118.

C

Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballería J, García-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J. Hepatol.* 2009; 50: 789–796.

Calvet X, Gomollón F. What is potent acid inhibition, and how can it be achieved? *Drugs* 2005; 65 Suppl 1: 13–23.

Camp CD, Peterman WE, Milanovich JR, Lamb T, Maerz JC, Wake DB. A new genus and species of lungless salamander (family Plethodontidae) from the Appalachian highlands of the south-eastern United States. *J. Zool.* 2009; 279: 86–94.

Cantó C, Auwerx J. PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* 2009; 20: 98–105.

Carey C, Alexander MA. Climate change and amphibian declines: is there a link? *Divers. Distrib.* 2003; 9: 111–121.

Carey C, Cohen N, Rollins-Smith L. Amphibian declines: an immunological perspective. *Dev. Comp. Immunol.* 1999; 23: 459–472.

Carlson EA, Li Y, Zelikoff JT. Benzo[a]pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004; 201: 40–52.

Casals-Casas C, Desvergne B. Endocrine Disruptors: From Endocrine to Metabolic Disruption. *Annu. Rev. Physiol.* 2011; 73: 135–162.

- De Castro F, Bolker B. Mechanisms of disease-induced extinction. *Ecol. Lett.* 2005; 8: 117–126.
- Cauble K, Wagner RS. Sublethal Effects of the Herbicide Glyphosate on Amphibian Metamorphosis and Development. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2005; 75: 429–435.
- Ceballos G, Ehrlich PR, Barnosky AD, Garcia A, Pringle RM, Palmer TM. Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. *Sci. Adv.* 2015; 1: e1400253–e1400253.
- Cevasco A, Urbatzka R, Bottero S, Massari A, Pedemonte F, Kloas W, et al. Endocrine disrupting chemicals (EDC) with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: II. Effects on gonad histomorphology. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 2008; 147: 241–251.
- Challa AA, Stefanovic B. A Novel Role of Vimentin Filaments: Binding and Stabilization of Collagen mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 2011; 31: 3773–3789.
- Chapman H. Removal of endocrine disruptors by tertiary treatments and constructed wetlands in subtropical Australia. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* 2003; 47: 151–156.
- Chen J-L, Lu X-J, Zou K-L, Ye K. Krüppel-like factor 2 promotes liver steatosis through upregulation of CD36. *J. Lipid Res.* 2014; 55: 32–40.
- Chen X, Nielsen JL, Furgal K, Liu Y, Lolas IB, Bester K. Biodegradation of triclosan and formation of methyl-triclosan in activated sludge under aerobic conditions. *Chemosphere* 2011; 84: 452–456.
- Chen Z-S, Guo Y, Belinsky MG, Kotova E, Kruh GD. Transport of Bile Acids, Sulfated Steroids, Estradiol 17- β -d-Glucuronide, and Leukotriene C4 by Human Multidrug Resistance Protein 8 (ABCC11). *Mol. Pharmacol.* 2005; 67: 545–557.
- Chevalier N. Role of endocrine disruptors in the obesity and diabetes epidemic. *Corresp. En Metab. Horm. Diabetes Nutr.* 2014; 18: 248–252.
- Chevalier N, Fénichel P. Endocrine disruptors: New players in the pathophysiology of type 2 diabetes? *Diabetes Metab.* 2015; 41: 107–115.
- Choi SH, Ginsberg HN. Increased very low density lipoprotein (VLDL) secretion, hepatic steatosis, and insulin resistance. *Trends Endocrinol. Metab.* 2011; 22: 353–363.
- Christin MS, Gendron AD, Brousseau P, Ménard L, Marcogliese DJ, Cyr D, et al. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Rana pipiens* and on its resistance to parasitic infection. *Environ. Toxicol. Chem.* 2003; 22: 1127–1133.
- Christin MS, Menard L, Gendron AD, Ruby S, Cyr D, Marcogliese DJ, et al. Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 2004; 67
- Christy MT, Clark CS, Gee DE, Vice D, Vice DS, Warner MP, et al. Recent Records of Alien Anurans on the Pacific Island of Guam. *Pac. Sci.* 2007; 61: 469–483.
- Chung Y-W, Nunez AA, Clemens LG. Effects of neonatal polychlorinated biphenyl exposure on female sexual behavior. *Physiol. Behav.* 2001; 74: 363–370.
- CIRC. Benzo[a]pyrene. IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum 2012. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304415/>
- Clarke SD, Clarke IJ, Rao A, Evans RG, Henry BA. Differential Effects of Acute and Chronic Estrogen Treatment on Thermogenic and Metabolic Pathways in Ovariectomized Sheep. *Endocrinology* 2012; 154: 184–192.

Cohen MM. Frog decline, frog malformations, and a comparison of frog and human health. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 104: 101–109.

Colautti RI, MacIsaac HJ. A neutral terminology to define ‘invasive’ species. *Divers. Distrib.* 2004; 10: 135–141.

Colborn T, Clement C. *Chemically-induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/human Connection.* Princeton Scientific Publishing Company; 1992.

Collins JP, Brunner JL, Jancovich JK, Schock DM. A model host-pathogen system for studying infectious disease dynamics in amphibians: tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*) and *Ambystoma tigrinum* virus. *Herpetol. J.* 2004; 14: 195–200.

Collins JP, Crump ML, III TEL. *Extinction in Our Times: Global Amphibian Decline.* Oxford University Press; 2009.

Colombo A, Bonfanti P, Orsi F, Camatini M. Differential modulation of cytochrome P-450 1A and P-glycoprotein expression by aryl hydrocarbon receptor agonists and thyroid hormone in *Xenopus laevis* liver and intestine. *Aquat. Toxicol.* 2003; 63: 173–186.

Conde DA, Colchero F, Güneralp B, Gusset M, Skolnik B, Parr M, et al. Opportunities and costs for preventing vertebrate extinctions. *Curr. Biol.* 2015; 25: R219–R221.

Coquery M, Pomies M, Martin-Ruel S, Budzinski H, Miège C, Esperanza M, et al. Mesurer les micropolluants dans les eaux usées brutes et traitées-Protocoles et résultats pour l’analyse des concentrations et des flux. *Tech. Sci. Méthodes* 2011: 25–43.

Cosentino BJ, Marsh DM, Jones KS, Apodaca JJ, Bates C, Beach J, et al. Citizen science reveals widespread negative effects of roads on amphibian distributions. *Biol. Conserv.* 2014; 180: 31–38.

Costanzo JP, Reynolds AM, do Amaral MCF, Rosendale AJ, Lee RE. Cryoprotectants and Extreme Freeze Tolerance in a Subarctic Population of the Wood Frog. *PLOS ONE* 2015; 10: e0117234.

Coulon S, Francque S, Colle I, Verrijken A, Blomme B, Heindryckx F, et al. Evaluation of inflammatory and angiogenic factors in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Cytokine* 2012; 59: 442–449.

Cox NA, Berridge RJ, Church D, van Dijk PP, Kusriani M, Lau M, et al. Why save amphibians? In: *Threatened amphibians of the world.* Lynx Edicions; 2008.

Crescenzo R, Bianco F, Falcone I, Prisco M, Liverini G, Iossa S. Alterations in Hepatic Mitochondrial Compartment in a Model of Obesity and Insulin Resistance. *Obesity* 2008; 16: 958–964.

Crump D, Werry K, Veldhoen N, Van Aggelen G, Helbing CC. Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environ. Health Perspect.* 2002; 110: 1199–1205.

Cushman SA. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biol. Conserv.* 2006; 128: 231–240.

D

Dai W, Wang K, Zheng X, Chen X, Zhang W, Zhang Y, et al. High fat plus high cholesterol diet lead to hepatic steatosis in zebrafish larvae: a novel model for screening anti-hepatic steatosis drugs. *Nutr. Metab.* 2015; 12: 42.

- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science* 2000; 287: 443–449.
- Daszak P, Scott DE, Kilpatrick AM, Faggioni C, Gibbons JW, Porter D. Amphibian population declines at Savannah River site are linked to climate, not chytridiomycosis. *Ecology* 2005; 86: 3232–3237.
- Daszak P, Strieby A, Cunningham AA, Longcore JE, Brown CC, Porter D. Experimental evidence that the bullfrog (*Rana catesbeiana*) is a potential carrier of chytridiomycosis, an emerging fungal disease of amphibians. *Herpetol. J.* 2004; 14: 201–207.
- Davidson C. Declining downwind: amphibian population declines in California and historical pesticide use. *Ecol. Appl.* 2004; 14: 1892–1902.
- Davidson C, Benard MF, Shaffer HB, Parker JM, O'Leary C, Conlon JM, et al. Effects of Chytrid and Carbaryl Exposure on Survival, Growth and Skin Peptide Defenses in Foothill Yellow-legged Frogs. *Environ. Sci. Technol.* 2007; 41: 1771–1776.
- Davidson C, Knapp RA. Multiple stressors and amphibian declines: dual impacts of pesticides and fish on yellow-legged frogs. *Ecol. Appl.* 2007; 17: 587–597.
- Davidson C, Shaffer HB, Jennings MR. Spatial Tests of the Pesticide Drift, Habitat Destruction, UV-B, and Climate-Change Hypotheses for California Amphibian Declines. *Conserv. Biol.* 2002; 16: 1588–1601.
- Davidson C, Bradley Shaffer H, Jennings MR. Declines of the California red-legged frog: climate, UV-B, habitat, and pesticides hypotheses. *Ecol. Appl.* 2001; 11: 464–479.
- Dawson A. Comparative reproductive physiology of non-mammalian species. *Pure Appl. Chem.* 1998; 70: 1657–1669.
- Day CP. From Fat to Inflammation. *Gastroenterology* 2006; 130: 207–210.
- Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two 'hits'? *Gastroenterology* 1998; 114: 842–845.
- Dean PDG, Montellano PRO de, Bloch K, Corey EJ. A Soluble 2,3-Oxidosqualene Sterol Cyclase. *J. Biol. Chem.* 1967; 242: 3014–3015.
- Delarue M, Arnoult C. Le xénope, animal de laboratoire - élevage et fécondation. *Lab. Biol. Dev.* 2004. Available from: <http://www.snv.jussieu.fr/vie/dossiers/XenAnimalLabo/Xenopanimalabo.html>
- van Delft JHM, Mathijs K, Staal YCM, van Herwijnen MHM, Brauers KJJ, Boorsma A, et al. Time Series Analysis of Benzo[A]Pyrene-Induced Transcriptome Changes Suggests That a Network of Transcription Factors Regulates the Effects on Functional Gene Sets. *Toxicol. Sci.* 2010; 117: 381–392.
- Delhomme O, Rieb E, Millet M. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Analyzed in Rainwater Collected on Two Sites in East of France (Strasbourg and Erstein). *Polycycl. Aromat. Compd.* 2008; 28: 472–485.
- DeLorenzo ME, Keller JM, Arthur CD, Finnegan MC, Harper HE, Winder VL, et al. Toxicity of the antimicrobial compound triclosan and formation of the metabolite methyl-triclosan in estuarine systems. *Environ. Toxicol.* 2008; 23: 224–232.
- Denslow ND, Chow MC, Kroll KJ, Green L. Vitellogenin as a Biomarker of Exposure for Estrogen or Estrogen Mimics. *Ecotoxicology* 1999; 8: 385–398.
- Denver RJ. Neuroendocrinology of Amphibian Metamorphosis. In: Shi Y-B. *Current Topics in Developmental Biology*. Academic Press; 2013. p. 195–227.
- Devaux A, Fiat L, Gillet C, Bony S. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquat. Toxicol.* 2011; 101: 405–411.

- Devonshire AS, Sanders R, Wilkes TM, Taylor MS, Foy CA, Huggett JF. Application of next generation qPCR and sequencing platforms to mRNA biomarker analysis. *Methods* 2013; 59: 89–100.
- Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr. Rev.* 2009; 30: 293–342.
- Díaz LM, Cádiz A, Chong A, Silva A. First Report of Chytridiomycosis in a Dying Toad (Anura: Bufonidae) from Cuba: A New Conservation Challenge for the Island. *EcoHealth* 2007; 4: 172–175.
- Díaz-Torres E, Gibson R, González-Farías F, Zarco-Arista AE, Mazari-Hiriart M. Endocrine Disruptors in the Xochimilco Wetland, Mexico City. *Water. Air. Soil Pollut.* 2013; 224: 1–11.
- DiCroce L, Bruscalupi G, Trentalance A. Independent responsiveness of frog liver low-density lipoprotein receptor and HMGCoA reductase to estrogen treatment. *Pflugers Arch.-Eur. J. Physiol.* 1997; 435: 107–111.
- Djomo JE, Ferrier V, Gauthier L, Zoll-Moreux C, Marty J. Amphibian micronucleus test in vivo: evaluation of the genotoxicity of some major polycyclic aromatic hydrocarbons found in a crude oil. *Mutagenesis* 1995; 10: 223–226.
- Dolgener N, Freudenberger L, Schneeweiss N, Ibisch PL, Tiedemann R. Projecting current and potential future distribution of the Fire-bellied toad *Bombina orientalis* under climate change in north-eastern Germany. *Reg. Environ. Change* 2014; 14: 1063–1072.
- Dong W, Wang L, Thornton C, Scheffler BE, Willett KL. Benzo(a)pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus*. *Aquat. Toxicol.* 2008; 88: 289–300.
- Donohue TM, Kharbanda KK, Casey CA, Nanji AA. Decreased Proteasome Activity Is Associated With Increased Severity of Liver Pathology and Oxidative Stress in Experimental Alcoholic Liver Disease. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 2004; 28: 1257–1263.
- Dorchin A, Shanas U. Assessment of pollution in road runoff using a *Bufo viridis* biological assay. *Environ. Pollut.* 2010; 158: 3626–3633.
- Dortch MS, Zakikhani M, Kim S-C, Steevens JA. Modeling water and sediment contamination of Lake Pontchartrain following pump-out of Hurricane Katrina floodwater. *J. Environ. Manage.* 2008; 87: 429–442.
- Duan XY, Zhao HP, Fan JG. Dynamic expression of hepatic thioredoxin mRNA in rats with non-alcoholic fatty liver disease. *J. Dig. Dis.* 2010; 11: 94–100.
- Dufour S, Rousseau K. Neuroendocrinology of fish metamorphosis and puberty: Evolutionary and ecophysiological perspectives. *J. Mar. Sci. Technol.-Taiwan* 2007; 15: 55–68.
- Durán-Álvarez JC, Prado-Pano B, Jiménez-Cisneros B. Sorption and desorption of carbamazepine, naproxen and triclosan in a soil irrigated with raw wastewater: Estimation of the sorption parameters by considering the initial mass of the compounds in the soil. *Chemosphere* 2012; 88: 84–90.

E

- Elzanowski A, Ciesiolkiewicz J, Kaczor M, Radwanska J, Urban R. Amphibian road mortality in Europe: a meta-analysis with new data from Poland. *Eur. J. Wildl. Res.* 2009; 55: 33–43.
- Endlein T, Ji A, Samuel D, Yao N, Wang Z, Barnes WJP, et al. Sticking like sticky tape: tree frogs use friction forces to enhance attachment on overhanging surfaces. *J. R. Soc. Interface* 2013; 10: 20120838–20120838.

Engering A, Hogerwerf L, Slingenbergh J. Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerg. Microbes Infect.* 2013; 2: e5.

Al-Eryani L, Wahlang B, Falkner KC, Guardiola JJ, Clair HB, Prough RA, et al. Identification of Environmental Chemicals Associated with the Development of Toxicant-associated Fatty Liver Disease in Rodents. *Toxicol. Pathol.* 2015; 43: 482–497.

Estep JM, Goodman Z, Sharma H, Younossi E, Elarainy H, Baranova A, et al. Adipocytokine expression associated with miRNA regulation and diagnosis of NASH in obese patients with NAFLD. *Liver Int.* 2015; 35: 1367–1372.

Evans BJ, Kelley DB, Tinsley RC, Melnick DJ, Cannatella DC. A mitochondrial DNA phylogeny of African clawed frogs: phylogeography and implications for polyploid evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2004; 33: 197–213.

F

Faass O, Ceccatelli R, Schlumpf M, Lichtensteiger W. Developmental effects of perinatal exposure to PBDE and PCB on gene expression in sexually dimorphic rat brain regions and female sexual behavior. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2013; 188: 232–241.

Farrell GC, van Rooyen D, Gan L, Chitturi S. NASH is an Inflammatory Disorder: Pathogenic, Prognostic and Therapeutic Implications. *Gut Liver* 2012; 6: 149–171.

Fedorenkova A, Vonk JA, Lenders HJR, Creemers RCM, Breure AM, Hendriks AJ. Ranking ecological risks of multiple chemical stressors on amphibians. *Environ. Toxicol. Chem.* 2012; 31: 1416–1421.

Feinberg JA, Newman CE, Watkins-Colwell GJ, Schlesinger MD, Zarate B, Curry BR, et al. Cryptic Diversity in Metropolis: Confirmation of a New Leopard Frog Species (Anura: Ranidae) from New York City and Surrounding Atlantic Coast Regions. *PLoS ONE* 2014; 9: e108213.

Feldstein AE, Werneburg NW, Canbay A, Guicciardi ME, Bronk SF, Rydzewski R, et al. Free fatty acids promote hepatic lipotoxicity by stimulating TNF- α expression via a lysosomal pathway. *Hepatology* 2004; 40: 185–194.

Fellers GM, McConnell LL, Pratt D, Datta S. Pesticides in mountain yellow-legged frogs (*Rana muscosa*) from the Sierra Nevada Mountains of California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 2004; 23: 2170–2177.

Fernandez C, Lindholm M, Krogh M, Lucas S, Larsson S, Osmark P, et al. Disturbed cholesterol homeostasis in hormone-sensitive lipase-null mice. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 2008; 295: E820–E831.

Fernandez M, L'Haridon J. Influence of lightning conditions on toxicity and genotoxicity of various PAH in the newt in vivo. *Mutat. Res. Toxicol.* 1992; 298: 31–41.

Fernandez M, L'Haridon J. Effects of light on the cytotoxicity and Genotoxicity of Benzo(a)pyrene and an oil refinery effluent in the newt. *Environ. Mol. Mutagen.* 1994; 24: 124–136.

Ferré P, Foufelle F. Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes. Metab.* 2010; 12: 83–92.

Fidge NH. High density lipoprotein receptors, binding proteins, and ligands. *J. Lipid Res.* 1999; 40: 187–201.

Firincieli D, Zúñiga S, Rey C, Wendum D, Lasnier E, Rainteau D, et al. Vitamin D nuclear receptor deficiency promotes cholestatic liver injury by disruption of biliary epithelial cell junctions in mice. *Hepatology* 2013; 58: 1401–1412.

Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, et al. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 2012; 484: 186–194.

Fitzpatrick BM, Shook K, Izally R. Frequency-dependent selection by wild birds promotes polymorphism in model salamanders. *BMC Ecol.* 2009; 9: 12.

Fleeger JW, Carman KR, Nisbet RM. Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems. *Sci. Total Environ.* 2003; 317: 207–233.

Forson DD, Storfer A. Atrazine increases ranavirus susceptibility in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Ecol. Appl.* 2006; 16: 2325–2332.

Fort DJ, Degitz S, Tietge J, Touart LW. The Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis in Frogs and Its Role in Frog Development and Reproduction. *Crit. Rev. Toxicol.* 2007; 37: 117–161.

Fort DJ, Pawlowski S. Triclosan enhances larval amphibian growth, but does not alter thyroid-driven metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Toxicol. Sci.* 2011; 123: 603–605.

Fox SF, Greer AL, TorresCervantes R, Collins JP. First case of ranavirus-associated morbidity and mortality in natural populations of the South American frog *Atelognathus patagonicus*. *Dis. Aquat. Organ.* 2006; 72: 87–92.

Fraker SL, Smith GR. Direct and interactive effects of ecologically relevant concentrations of organic wastewater contaminants on *Rana pipiens* tadpoles. *Environ. Toxicol.* 2004; 19: 250–256.

Frangioni G, Atzori A, Balzi M, Fuzzi G, Ghinassi A, Pescosolido N, et al. Thyroid and hypoxic stress in the newt *Triturus carnifex*. *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.* 2006; 305A: 225–232.

Freeman JL, Beccue N, Rayburn AL. Differential metamorphosis alters the endocrine response in anuran larvae exposed to T3 and atrazine. *Aquat. Toxicol.* 2005; 75: 263–276.

Frost DR. Amphibian Species of the World: an Online Reference. Version 6.0. 2015. Available from: [http:// research.amnh.org/herpetology/amphibia/](http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/)

Frost DR, Grant T, Faivovich J, Bain RH, Haas A, Haddad CFB, et al. The amphibian tree of life. *Bull. AMNH* 2006; 297

G

Gahl MK, Pauli BD, Houlahan JE. Effects of chytrid fungus and a glyphosate-based herbicide on survival and growth of wood frogs (*Lithobates sylvaticus*). *Ecol. Appl.* 2011; 21: 2521–2529.

Ganser LR. Anatomy and Function of the African Clawed Frog Vocal System is Altered by the Brominated Flame Retardant, PBDE-209. 2009. Available from : http://scholarlyrepository.miami.edu/oa_dissertations/245/

Garcia-Caraballo SC, Comhair TM, Verheyen F, Gaemers I, Schaap FG, Houten SM, et al. Prevention and reversal of hepatic steatosis with a high-protein diet in mice. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* 2013; 1832: 685–695.

- Garrigues P, Djomo JE, Ferrier V, Dauta A, Monkiedje A, Ze AM, et al. Toxicokinetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Contaminated Sediment by the Amphibian Larvae (pleurodeles Waltl). *Polycycl. Aromat. Compd.* 2004; 24: 207–219.
- Gasperi J, Garnaud S, Rocher V, Moilleron R. Priority pollutants in surface waters and settleable particles within a densely urbanised area: Case study of Paris (France). *Sci. Total Environ.* 2009; 407: 2900–2908.
- Gawrieh S, Baye TM, Carless M, Wallace J, Komorowski R, Kleiner DE, et al. Hepatic Gene Networks in Morbidly Obese Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Obes. Surg.* 2010; 20: 1698–1709.
- Gendron AD, Marcogliese DJ, Barbeau S, Christin MS, Brousseau P, Ruby S, et al. Exposure of leopard frogs to a pesticide mixture affects life history characteristics of the lungworm *Rhabdias ranae*. *Oecologia* 2003; 135: 469–476.
- Geng X, Wei H, Shang H, Zhou M, Chen B, Zhang F, et al. Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *J. Proteomics* 2015; 119: 196–208.
- Geremia E, Corsaro C, Baratta D, Santoro C, Scalia M, Sichel G. Antioxidant Enzymatic Systems in Pigment Tissue of Amphibia. *Pigment Cell Res.* 1989; 2: 208–212.
- Gervasi S, Gondhalekar C, Olson DH, Blaustein AR. Host Identity Matters in the Amphibian-Batrachochytrium dendrobatidis System: Fine-Scale Patterns of Variation in Responses to a Multi-Host Pathogen. *PLoS ONE* 2013; 8: e54490.
- Ghisari M, Long M, Tabbo A, Bonfeld-Jørgensen EC. Effects of currently used pesticides and their mixtures on the function of thyroid hormone and aryl hydrocarbon receptor in cell culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2015; 284: 292–303.
- Ghosh A, Shieh J-J, Pan C-J, Sun M-S, Chou JY. The Catalytic Center of Glucose-6-phosphatase his176 is the nucleophile forming the phosphohistidine-enzyme intermediate during catalysis. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 32837–32842.
- Gibbons JW, Winne CT, Scott DE, Willson JD, Glaudas X, Andrews KM, et al. Remarkable Amphibian Biomass and Abundance in an Isolated Wetland: Implications for Wetland Conservation. *Conserv. Biol.* 2006; 20: 1457–1465.
- Gibson PS, Fitzpatrick E, Quaglia A, Dhawan A, Wu H, Hart K, et al. Association of NADSYN1, DHCR7, GC and VDR Genotypes With Steatosis And Liver Inflammation in UK Paediatric Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Patients. *Hepatology* 2014; 60: 967A–967A.
- Gilbert M, Bickford D, Clark L, Johnson A, Joyner PH, Keatts LO, et al. Amphibian Pathogens in Southeast Asian Frog Trade. *Ecohealth* 2012; 9: 386–398.
- Gilbertson MK, Haffner GD, Drouillard KG, Albert A, Dixon B. Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 2003; 22: 101–110.
- Glassmeyer ST, Furlong ET, Kolpin DW, Cahill JD, Zaugg SD, Werner SL, et al. Transport of Chemical and Microbial Compounds from Known Wastewater Discharges: Potential for Use as Indicators of Human Fecal Contamination. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39: 5157–5169.
- Gohin M, Bobe J, Chesnel F. Comparative transcriptomic analysis of follicle-enclosed oocyte maturational and developmental competence acquisition in two non-mammalian vertebrates. *BMC Genomics* 2010; 11: 18.
- Goleman WL, Urquidí LJ, Anderson TA, Smith EE, Kendall RJ, Carr JA. Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit development and metamorphosis in *Xenopus laevis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002; 21: 424–430.

Gorden DL, Myers DS, Ivanova PT, Fahy E, Maurya MR, Gupta S, et al. Biomarkers of NAFLD progression: a lipidomics approach to an epidemic. *J. Lipid Res.* 2015; 56: 722–736.

Gore AC, Chappell VA, Fenton SE, Flaws JA, Nadal A, Prins GS, et al. Executive Summary to EDC-2: The Endocrine Society's Second Scientific Statement on Endocrine-Disrupting Chemicals. *Endocr. Rev.* 2015; er.2015–1093.

Gosner KL. A Simplified Table for Staging Anuran Embryos and Larvae with Notes on Identification. *Herpetologica* 1960; 16: 183–190.

Götz R, Bauer OH, Friesel P, Roch K. Organic trace compounds in the water of the River Elbe near Hamburg part II. *Chemosphere* 1998; 36: 2103–2118.

Graf JD, Fischberg M. Albumin evolution in polyploid species of the genus *Xenopus*. *Biochem. Genet.* 1986; 24: 821–837.

Gray MJ, Chinchar VG. *Ranaviruses: Lethal Pathogens of Ectothermic Vertebrates.* 2015.

Gray MJ, Smith LM. Influence of land use on postmetamorphic body size of playa lake amphibians. *J. Wildl. Manag.* 2005; 69: 515–524.

Gross JA, Johnson PTJ, Prahl LK, Karasov WH. Critical period of sensitivity for effects of cadmium on frog growth and development. *Environ. Toxicol. Chem.* 2009; 28: 1227–1232.

Gu H, Dai Q, Wang Q, Wang Y. Factors contributing to amphibian road mortality in a wetland. *Curr. Zool.* 2011; 57: 768–774.

Guillén J, Bernabeu A, Shapiro S, Villalán J. Location and orientation of Triclosan in phospholipid model membranes. *Eur. Biophys. J.* 2004; 33: 448–453.

Guzmán C, Benet M, Pisonero-Vaquero S, Moya M, García-Mediavilla MV, Martínez-Chantar ML, et al. The human liver fatty acid binding protein (FABP1) gene is activated by FOXA1 and PPAR α ; and repressed by C/EBP α : Implications in FABP1 down-regulation in nonalcoholic fatty liver disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 2013; 1831: 803–818.

Guzy JC, Campbell TS, Campbell KR. Effects of hydrological alterations on frog and toad populations at Morris Bridge Wellfield, Hillsborough County, Florida. *ResearchGate* 2006; 69: 276–287.

H

D'haeseleer P. How does gene expression clustering work? *Nat. Biotechnol.* 2005; 23: 1499–1501.

Haggard BE, Galloway JM, Green WR, Meyer MT. Pharmaceuticals and Other Organic Chemicals in Selected North-Central and Northwestern Arkansas Streams. *J. Environ. Qual.* 2006; 35: 1078–1087.

Hajra AK, Larkins LK, Das AK, Hemati N, Erickson RL, MacDougald OA. Induction of the Peroxisomal Glycerolipid-synthesizing Enzymes during Differentiation of 3T3-L1 Adipocytes role in triacylglycerol synthesis. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 9441–9446.

Halliday T. Do frogs make good canaries? *Biol. Lond. Engl.* 2000; 47: 143–146.

Hall RA, Liebe R, Hochrath K, Kazakov A, Alberts R, Laufs U, et al. Systems Genetics of Liver Fibrosis: Identification of Fibrogenic and Expression Quantitative Trait Loci in the BXD Murine Reference Population. *PLoS ONE* 2014; 9: e89279.

- Hammond SA, Veldhoen N, Helbing CC. Influence of temperature on thyroid hormone signaling and endocrine disruptor action in *Rana* (*Lithobates*) *catesbeiana* tadpoles. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015; 219: 6–15.
- Hanken J, Wake DB. Five New Species of Minute Salamanders, Genus *Thorius* (Caudata: Plethodontidae), from Northern Oaxaca, Mexico. *Am. Soc. Ichthyol. Herpetol. ASIH* 1994; 3: 573–590.
- Hanlon SM, Parris MJ. The interactive effects of chytrid fungus, pesticides, and exposure timing on gray treefrog (*Hyla versicolor*) larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 2014; 33: 216–222.
- Hansmann F, Mordier S, Iynedjian PB. Insulin induction of glucokinase and fatty acid synthase in hepatocytes: analysis of the roles of sterol-regulatory-element-binding protein-1c and liver X receptor. *Biochem. J.* 2006; 399: 275–283.
- Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. *J. Hazard. Mater.* 2009; 169: 1–15.
- Harp EM, Petranka JW. Ranavirus in wood frogs (*Rana sylvatica*): potential sources of transmission within and between ponds. *J. Wildl. Dis.* 2006; 42: 307–318.
- Harvey MB, Smith EN. A new species of aquatic *Bufo* (Anura: Bufonidae) from cloud forests in the Serranía de Siberia, Bolivia. *Proc. Biol. Soc. Wash.* 1993; 106: 442–449.
- Hassan AM, Alam SS, Abdel-Aziem SH, Ahmed KA. Benzo-a-pyrene induced genotoxicity and cytotoxicity in germ cells of mice: Intervention of radish and cress. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2011; 9: 65–72.
- Hatch AC, Burton GA. Effects of photoinduced toxicity of fluoranthene on amphibian embryos and larvae. *Environ. Toxicol. Chem.* 1998; 17: 1777–1785.
- Hayes TB, Anderson LL, Beasley VR, de Solla SR, Iguchi T, Ingraham H, et al. Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: consistent effects across vertebrate classes. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011; 127
- Hayes TB, Falso P, Gallipeau S, Stice M. The cause of global amphibian declines: a developmental endocrinologist's perspective. *J. Exp. Biol.* 2010a; 213: 921–933.
- Hayes TB, Khoury V, Narayan A, Nazir M, Park A, Brown T, et al. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2010b; 107: 4612–4617.
- Hayes TB, Case P, Chui S, Chung D, Haeffele C, Haston K, et al. Pesticide Mixtures, Endocrine Disruption, and Amphibian Declines: Are We Underestimating the Impact? *Environ. Health Perspect.* 2006a; 114: 40–50.
- Hayes TB, Stuart AA, Mendoza M, Collins A, Noriega N, Vonk A, et al. Characterization of Atrazine-Induced Gonadal Malformations in African Clawed Frogs (*Xenopus laevis*) and Comparisons with Effects of an Androgen Antagonist (Cyproterone Acetate) and Exogenous Estrogen (17 β -Estradiol): Support for the Demasculinization/Feminization Hypothesis. *Environ. Health Perspect.* 2006b; 114: 134–141.
- Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): laboratory and field evidence. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111: 568–575.
- Hayes T, Haston K, Tsui M, Hoang A, Haeffele C, Vonk A. Herbicides: Feminization of male frogs in the wild. *Nature* 2002; 419: 895–896.
- Hazlehurst JM, Tomlinson JW. Mechanisms in endocrinology: Non-alcoholic fatty liver disease in common endocrine disorders. *Eur. J. Endocrinol.* 2013; 169: R27–R37.

- Helbing CC. The Metamorphosis of Amphibian Toxicogenomics. *Front. Genet.* 2012; 3: 37.
- Hellsten U, Harland RM, Gilchrist MJ, Hendrix D, Jurka J, Kapitonov V, et al. The Genome of the Western Clawed Frog *Xenopus tropicalis*. *Science* 2010; 328: 633–636.
- Herrel A, van der Meijden A. An analysis of the live reptile and amphibian trade in the USA compared to the global trade in endangered species. *Herpetol. J.* 2014; 24: 103–110.
- Hinther A, Bromba CM, Wulff JE, Helbing CC. Effects of Triclocarban, Triclosan, and Methyl Triclosan on Thyroid Hormone Action and Stress in Frog and Mammalian Culture Systems. *Environ. Sci. Technol.* 2011; 45: 5395–5402.
- Hocking DJ, Babbitt KJ. Amphibian contributions to ecosystem services. *Herpetol. Conserv. Biol.* 2014; 9: 1–17.
- Ho DV, Chan JY. Induction of Herpud1 expression by ER stress is regulated by Nrf1. *FEBS Lett.* 2015; 589: 615–620.
- Hoffmann F, Kloas W. Estrogens Can Disrupt Amphibian Mating Behavior. *PLoS ONE* 2012; 7: e32097.
- Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, Böhm M, Brooks TM, Butchart SHM, et al. The Impact of Conservation on the Status of the World's Vertebrates. *Science* 2010; 330: 1503–1509.
- Hogben L. Some remarks on the relation of the pituitary gland to ovulation and skin secretion in *Xenopus laevis*. *Proc R Soc Afr.* 1930
- Hoogmoed MS, Maciel AO, Coragem JT. Discovery of the largest lungless tetrapod, *Atretochoana eiselti* (Taylor, 1968)(Amphibia: Gymnophiona: Typhlonectidae), in its natural habitat in Brazilian Amazonia. *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Ciênc. Nat.* 2011; 6: 241–262.
- Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, et al. Fifteen Years after 'Wingspread'--Environmental Endocrine Disrupters and Human and Wildlife Health: Where We are Today and Where We Need to Go. *Toxicol. Sci.* 2008; 105: 235–259.
- Howland HC, Merola S, Basarab JR. The allometry and scaling of the size of vertebrate eyes. *Vision Res.* 2004; 44: 2043–2065.
- Hua J, Jones DK, Relyea RA. Induced Tolerance from a Sublethal Insecticide Leads to Cross-Tolerance to Other Insecticides. *Environ. Sci. Technol.* 2014; 48: 4078–4085.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009a; 4: 44–57.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* 2009b; 37: 1–13.
- Hua W, Bennett ER, Letcher RJ. Triclosan in waste and surface waters from the upper Detroit River by liquid chromatography-electrospray-tandem quadrupole mass spectrometry. *Environ. Int.* 2005; 31: 621–630.
- Hulscher TEMT, Van Der Velde LE, Bruggeman WA. Temperature dependence of Henry's law constants for selected chlorobenzenes, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Toxicol. Chem.* 1992; 11: 1595–1603.

I

Iarmarcovai G, Botta A, Orsière T. Anomalies chromosomiques de nombre, instabilité génétique et expositions professionnelles. *Bull. Cancer (Paris)* 2007; 94: 381–388.

Illumina Inc. Quality scores for Nexy-Generation Sequencing - Assessing sequencing accuracy using Phred quality scoring. 2011. Available from: http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_Q-Scores.pdf

Im S-S, Kang S-Y, Kim S-Y, Kim H, Kim J-W, Kim K-S, et al. Glucose-Stimulated Upregulation of GLUT2 Gene Is Mediated by Sterol Response Element-Binding Protein-1c in the Hepatocytes. *Diabetes* 2005; 54: 1684–1691.

INERIS. Benzo[a]pyrene. Donnée Tech.-Économiques Sur Subst. Chim. En Fr. 2006: 1–44.

INERIS. Atrazine. Donnée Tech.-Économiques Sur Subst. Chim. En Fr. 2007: 1–23.

INERIS. Triclosan. Donnée Tech.-Économiques Sur Subst. Chim. En Fr. 2015: 1–42.

Inoue M, Tazuma S, Kanno K, Hyogo H, Igarashi K, Chayama K. Bach1 gene ablation reduces steatohepatitis in mouse MCD diet model. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2010; 48: 161–166.

Ishibashi H, Matsumura N, Hirano M, Matsuoka M, Shiratsuchi H, Ishibashi Y, et al. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquat. Toxicol.* 2004; 67: 167–179.

IUCN. The IUCN Global Amphibian Assessment. 2008. Available from: <http://www.iucnredlist.org>

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2015. Available from: <http://www.iucnredlist.org>

J

Jagnytsch O, Opitz R, Lutz I, Kloas W. Effects of tetrabromobisphenol A on larval development and thyroid hormone-regulated biomarkers of the amphibian *Xenopus laevis*. *Environ. Res.* 2006; 101: 340–348.

James MO, Marth CJ, Rowland-Faux L. Slow O-demethylation of methyl triclosan to triclosan, which is rapidly glucuronidated and sulfonated in channel catfish liver and intestine. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 2012; 124-125

James-Raoul D, Thomasset CA. *Dans l'eau, sous l'eau: le monde aquatique au moyen âge*. Presses Paris Sorbonne; 2002.

Jiang P-H, Motoo Y, Garcia S, Iovanna JL, Pébusque M-J, Sawabu N. Down-expression of tumor protein p53-induced nuclear protein 1 in human gastric cancer. *World J. Gastroenterol. WJG* 2006; 12: 691–696.

Johnson PTJ, Preston DL, Hoverman JT, Richgels KLD. Biodiversity decreases disease through predictable changes in host community competence. *Nature* 2013; 494: 230–233.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 2008; 451: 990–993.

Jones RD, Jampani HB, Newman JL, Lee AS. Triclosan: A review of effectiveness and safety in health care settings. *Am. J. Infect. Control* 2000; 28: 184–196.

Le Jossic-Corcus C, Gonthier C, Zaghini I, Logette E, Shechter I, Bournot P. Hepatic farnesyl diphosphate synthase expression is suppressed by polyunsaturated fatty acids. *Biochem. J.* 2005; 385: 787–794.

K

Kajimoto K, Minami Y, Harashima H. Cytoprotective role of the fatty acid binding protein 4 against oxidative and endoplasmic reticulum stress in 3T3-L1 adipocytes. *FEBS Open Bio* 2014; 4: 602–610.

Kalk M. Climate and breeding in *Xenopus laevis*. *South Afr. J. Sci.* 1960; 56: 271–276.

Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Furumichi M, Tanabe M. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: D109–D114.

Kaplan M. Amphibians rarely give earliest warning of pollution. *Nat. News* 2009. Available from: <http://www.nature.com/news/2009/091029/full/news.2009.1048.html>

Kashiwagi A, Utsumi K, Kashiwagi K, Ohta S, Sugihara K, Hanada H, et al. Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Amphibian Metamorphosis and Mitochondrial Membrane Permeability Transition. *J. Health Sci.* 2008; 54: 273–280.

Katayama A, Bhula R, Burns GR, Carazo E, Felsot A, Hamilton D, et al. Bioavailability of Xenobiotics in the Soil Environment. In: Whitacre DM, editor(s). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York; 2010. p. 1–86. Available from: http://link.springer.com.gate1.inist.fr/chapter/10.1007/978-1-4419-1352-4_1

Kaufmann C. Determination of Lipid, Glycogen and Sugars in Mosquitoes. In: *Methods in Anopheles Research*. 2010. p. 4.

Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. Research Needs for the Risk Assessment of Health and Environmental Effects of Endocrine Disruptors: A Report of the U.S. EPA-Sponsored Workshop. *Environ. Health Perspect.* 1996; 104: 715–740.

Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, et al. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 2010; 468: 647–652.

Kennerley GA, Parry JM. Analysis of benzo[a]pyrene induced mutations by the use of restriction-site mutation assays in aquatic species. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* 1994; 307: 223–228.

Kerby JL, Richards-Hrdlicka KL, Storfer A, Skelly DK. An examination of amphibian sensitivity to environmental contaminants: are amphibians poor canaries? *Ecol. Lett.* 2010; 13: 60–67.

Kerner J. Grenouilles et crapauds en contexte funéraire dans le monde gréco-romain : possibles fonctions et symbolique. *Pallas Rev. Détudes Antiq.* 2014: 171–189.

Kielgast J, Rödder D, Veith M, Lötters S. Widespread occurrence of the amphibian chytrid fungus in Kenya. *Anim. Conserv.* 2010; 13: 36–43.

Kiesecker JM. Synergism between trematode infection and pesticide exposure: A link to amphibian limb deformities in nature? *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002; 99: 9900–9904.

Kiesecker JM. Global stressors and the global decline of amphibians: tipping the stress immunocompetency axis. *Ecol. Res.* 2010; 26: 897–908.

- Kinney CA, Furlong ET, Kolpin DW, Burkhardt MR, Zaugg SD, Werner SL, et al. Bioaccumulation of Pharmaceuticals and Other Anthropogenic Waste Indicators in Earthworms from Agricultural Soil Amended With Biosolid or Swine Manure. *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42: 1863–1870.
- Klečka G, Persoon C, Currie R. Chemicals of Emerging Concern in the Great Lakes Basin: An Analysis of Environmental Exposures. In: Whitacre DM. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York; 2010. p. 1–93.
- Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M, Behling C, Contos MJ, Cummings OW, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005; 41: 1313–1321.
- Kloas W. Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *Int. Rev. Cytol.* 2002; 216
- Kloas W, Lutz I. Amphibians as model to study endocrine disruptors. 9th Int. Symp. Hyphenated Tech. Chromatogr. *Hyphenated Chromatogr. Anal.* 2006; 1130: 16–27.
- Kloas W, Urbatzka R, Opitz R, Würtz S, Behrends T, Hermelink B, et al. Endocrine Disruption in Aquatic Vertebrates. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2009; 1163: 187–200.
- Knapp RA, Boiano DM, Vredenburg VT. Removal of nonnative fish results in population expansion of a declining amphibian (mountain yellow-legged frog, *Rana muscosa*). *Biol. Conserv.* 2007; 135: 11–20.
- Knapp RA, Matthews KR. Non-Native Fish Introductions and the Decline of the Mountain Yellow-Legged Frog from within Protected Areas. *Conserv. Biol.* 2000; 14: 428–438.
- Kohjima M, Enjoji M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, et al. Re-evaluation of fatty acid metabolism-related gene expression in nonalcoholic fatty liver disease. *Int. J. Mol. Med.* 2007; 20: 351–358.
- Köhle C, Bock KW. Coordinate regulation of Phase I and II xenobiotic metabolisms by the Ah receptor and Nrf2. *Biochem. Pharmacol.* 2007; 73: 1853–1862.
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, et al. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36: 1202–1211.
- Kolpin DW, Skopec M, Meyer MT, Furlong ET, Zaugg SD. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Sci. Total Environ.* 2004; 328: 119–130.
- Koo MS, Vredenburg VT, Gross J, Spencer CL, Tunstall T, Wake DB. Visualizing AmphibiaWeb Data with Continuous Cartograms. *AmphibiaWeb* 2013
- Korenblat KM, Fabbrini E, Mohammed BS, Klein S. Liver, Muscle, and Adipose Tissue Insulin Action Is Directly Related to Intrahepatic Triglyceride Content in Obese Subjects. *Gastroenterology* 2008; 134: 1369–1375.
- Krishnamurthy SV, Hussain SA. Distribution of amphibian species in Kudremukh National Park (Western Ghats, India) in relation to mining and related habitat changes. *Herpetol. J.* 2004; 14: 129–135.
- Kuba T, Hunter D, Zhou L, Jenab S, Quinones-Jenab V. Acute and Chronic Estradiol Replacements Differentially Alter Corticosterone and Cox-Mediated Responses to an Inflammatory Stimulus in Female Rats. *Ethn. Dis.* 2010; 20: 50–54.
- Kuchta SR, Reeder TW. Experimental support for aposomatic coloration in the salamander *Ensatina eschscholtzii xanthoptica*: implications for mimicry of Pacific newts. *Copeia* 2005; 2005: 265–271.

Kumar KS, Priya SM, Peck AM, Sajwan KS. Mass Loadings of Triclosan and Triclocarbon from Four Wastewater Treatment Plants to Three Rivers and Landfill in Savannah, Georgia, USA. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2009; 58: 275–285.

Kwong E, Li Y, Hylemon PB, Zhou H. Bile acids and sphingosine-1-phosphate receptor 2 in hepatic lipid metabolism. *Acta Pharm. Sin. B* 2015; 5: 151–157.

L

Lake AD, Novak P, Shipkova P, Aranibar N, Robertson D, Reily MD, et al. Decreased hepatotoxic bile acid composition and altered synthesis in progressive human nonalcoholic fatty liver disease. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2013; 268: 132–140.

de la Lande IS, O'Brien PE, Shearman DJ, Taylor P, Tyler MJ. On the possible role of prostaglandin E2 in intestinal stasis in the gastric brooding frog *Rheobatrachus silus*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1984; 62 (Pt 3): 317–323.

Langerveld AJ, Celestine R, Zaya R, Mihalko D, Ide CF. Chronic exposure to high levels of atrazine alters expression of genes that regulate immune and growth-related functions in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Environ. Res.* 2009; 109: 379–389.

Lannoo MJ. *Amphibian Declines: The Conservation Status of United States Species*. University of California Press; 2005.

Lastra G, Manrique C, Jia G, Sowers JR. The VASP Road to NAFLD: A Macrophage Detour. *Diabetes* 2015; 64: 2711–2713.

Laufer G, Canavero A, Núñez D, Maneyro R. Bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) invasion in Uruguay. *Biol. Invasions* 2008; 10: 1183–1189.

Legler J, Fletcher T, Govarts E, Porta M, Blumberg B, Heindel JJ, et al. Obesity, Diabetes, and Associated Costs of Exposure to Endocrine-Disrupting Chemicals in the European Union. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015; 100: 1278–1288.

Lehman CM, Williams G. Effects of current-use pesticides on amphibians. In: *Ecotoxicology of amphibians and reptiles*. Society of environmental toxicology and chemistry (SETAC); 2010. p. 167–202.

Lenhardt M, Jaric I, Cacic P, Cvijanovic G, Gacic Z, Kolarevic J. Seasonal changes in condition, hepatosomatic index and parasitism in sterlet (*Acipenser ruthenus* L.). *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 2009; 33: 209–214.

León-Olea M, Martyniuk CJ, Orlando EF, Ottinger MA, Rosenfeld CS, Wolstenholme JT, et al. Current concepts in neuroendocrine disruption. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2014; 203: 158–173.

Leuenberger C, Czuczwa J, Heyerdahl E, Giger W. Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban rain, snow and fog. *Atmospheric Environ.* 1967 1988; 22: 695–705.

Leu T, Lüscher B, Zumbach S, Schmidt BR. Small fish (*Leucaspis delineatus*) that are often released into garden ponds and amphibian breeding sites prey on eggs and tadpoles of the common frog (*Rana temporaria*). *Amphib.-Reptil.* 2009; 30: 290–293.

Liaskou E, Wilson DV, Oo YH, Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. Innate Immune Cells in Liver Inflammation, Innate Immune Cells in Liver Inflammation. *Mediat. Inflamm. Mediat. Inflamm.* 2012; 2012, 2012: e949157.

- Li LO, Klett EL, Coleman RA. Acyl-CoA synthesis, lipid metabolism and lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 2010; 1801: 246–251.
- Lim EL, Hollingsworth KG, Aribisala BS, Chen MJ, Mathers JC, Taylor R. Reversal of type 2 diabetes: normalisation of beta cell function in association with decreased pancreas and liver triacylglycerol. *Diabetologia* 2011; 54: 2506–2514.
- Li M, Wu F, Gu Y, Wang T, Wang H, Yang S, et al. Insulin-Like Growth Factor 3 Regulates Expression of Genes Encoding Steroidogenic Enzymes and Key Transcription Factors in the Nile Tilapia Gonad. *Biol. Reprod.* 2012; 86: 163.
- Lindström A, Buerge IJ, Poiger T, Bergqvist P-A, Müller MD, Buser H-R. Occurrence and Environmental Behavior of the Bactericide Triclosan and Its Methyl Derivative in Surface Waters and in Wastewater. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36: 2322–2329.
- Liner EA. *The Culinary Herpetologist*. Bibliomania; 2005.
- Lin T-C, Chang F-H, Hsieh J-H, Chao H-R, Chao M-R. Characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons and total suspended particulate in indoor and outdoor atmosphere of a Taiwanese temple. *J. Hazard. Mater.* 2002; 95: 1–12.
- Linzey D, Burroughs J, Hudson L, Marini M, Robertson J, Bacon J, et al. Role of environmental pollutants on immune functions, parasitic infections and limb malformations in marine toads and whistling frogs from Bermuda. *Int. J. Environ. Health Res.* 2003; 13: 125–148.
- Lips KR, Diffendorfer J, Mendelson JR, Sears MW. Riding the Wave: Reconciling the Roles of Disease and Climate Change in Amphibian Declines. *PLoS Biol.* 2008; 6: e72.
- Lips KR, Burrowes PA, Mendelson JR, Parra-Olea G. Amphibian population declines in Latin America: A synthesis. *Biotropica* 2005; 37: 222–226.
- Lips KR, Mendelson III JR, Muñoz-Alonso A, Canseco-Márquez L, Mulcahy DG. Amphibian population declines in montane southern Mexico: resurveys of historical localities. *Biol. Conserv.* 2004; 119: 555–564.
- Liu W, Baker SS, Baker RD, Nowak NJ, Zhu L. Upregulation of Hemoglobin Expression by Oxidative Stress in Hepatocytes and Its Implication in Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS ONE* 2011; 6: e24363.
- Li X, Xu M, Wang F, Ji Y, Davidson WS, Li Z, et al. Interaction of ApoA-IV with NR4A1 and NR1D1 Represses G6Pase and PEPCK Transcription: Nuclear Receptor-Mediated Downregulation of Hepatic Gluconeogenesis in Mice and a Human Hepatocyte Cell Line. *PLoS ONE* 2015; 10: e0142098.
- Li Y, Chang Y, Zhang L, Feng Q, Liu Z, Zhang Y, et al. High glucose upregulates pantothenate kinase 4 (PanK4) and thus affects M2-type pyruvate kinase (Pkm2). *Mol. Cell. Biochem.* 2005; 277: 117–125.
- Locatelli I, Sutti S, Jindal A, Vacchiano M, Bozzola C, Reutelingsperger C, et al. Endogenous annexin A1 is a novel protective determinant in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2014; 60: 531–544.
- Lockman KA, Baren JP, Pemberton CJ, Baghdadi H, Burgess KE, Plevris-Papaioannou N, et al. Oxidative stress rather than triglyceride accumulation is a determinant of mitochondrial dysfunction in in vitro models of hepatic cellular steatosis. *Liver Int.* 2012; 32: 1079–1092.
- Longcore JR, Longcore JE, Pessier AP, Halteman WA. Chytridiomycosis Widespread in Anurans of Northeastern United States. *J. Wildl. Manag.* 2007; 71: 435–444.
- de Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, Tzagoloff A, Taanman J-W, et al. A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat. Genet.* 2001; 29: 57–60.

Loomis JB, White DS. Economic benefits of rare and endangered species: summary and meta-analysis. *Ecol. Econ.* 1996; 18: 197–206.

Loos R, Wollgast J, Huber T, Hanke G. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy. *Anal. Bioanal. Chem.* 2007; 387: 1469–1478.

Loraine GA, Pettigrove ME. Seasonal Variations in Concentrations of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Drinking Water and Reclaimed Wastewater in Southern California. *Environ. Sci. Technol.* 2006; 40: 687–695.

Lorenz C, Contardo-Jara V, Pflugmacher S, Wiegand C, Nützmann G, Lutz I, et al. The Synthetic Gestagen Levonorgestrel Impairs Metamorphosis in *Xenopus laevis* by Disruption of the Thyroid System. *Toxicol. Sci.* 2011; 123: 94–102.

Luo X, Mai B, Yang Q, Fu J, Sheng G, Wang Z. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and organochlorine pesticides in water columns from the Pearl River and the Macao harbor in the Pearl River Delta in South China. *Mar. Pollut. Bull.* 2004; 48: 1102–1115.

M

Maglio C, Pirazzi C, Pujia A, Valenti L, Romeo S. The PNPLA3 I148M variant and chronic liver disease: When a genetic mutation meets nutrients. *Food Res. Int.* 2014; 63, Part B: 239–243.

Magnan C. Lipotoxicité et insulino-résistance. *Nutr. Clin. Métabolisme* 2006; 20: 108–113.

Mandrillon A-L, Saglio P. Herbicide exposure affects the chemical recognition of a non native predator in common toad tadpoles (*Bufo bufo*). *Chemoecology* 2006; 17: 31–36.

Mandrillon A-L, Saglio P. Waterborne Amitrole Affects the Predator–Prey Relationship Between Common Frog Tadpoles (*Rana temporaria*) and Larval Spotted Salamander (*Salamandra salamandra*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2007; 53: 233–240.

Manoli E, Samara C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *TrAC Trends Anal. Chem.* 1999; 18: 417–428.

Manoli E, Samara C, Konstantinou I, Albanis T. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the bulk precipitation and surface waters of Northern Greece. *Chemosphere* 2000; 41: 1845–1855.

Mantecca P, Gualtieri M, Andrioletti M, Bacchetta R, Vismara C, Vailati G, et al. Tire debris organic extract affects *Xenopus* development. *Environ. Int.* 2007; 33: 642–648.

Mao C, Obeid LM. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 2008; 1781: 424–434.

Ma Q. Induction of CYP1A1. The AhR/DRE paradigm: transcription, receptor regulation, and expanding biological roles. *Curr. Drug Metab.* 2001; 2: 149–164.

Marlatt VL, Veldhoen N, Lo BP, Bakker D, Rehaume V, Vallee K, et al. Triclosan exposure alters postembryonic development in a Pacific tree frog (*Pseudacris regilla*) Amphibian Metamorphosis Assay (TREEMA). *Aquat. Toxicol.* 2013; 126: 85–94.

Marquis O, Miaud C, Ficetola GF, Bocher A, Mouchet F, Guittonneau S, et al. Variation in genotoxic stress tolerance among frog populations exposed to UV and pollutant gradients. *Aquat. Toxicol.* 2009; 95: 152–161.

- Martín-Forés I, Martín-López B, Montes C. Anthropomorphic Factors Influencing Spanish Conservation Policies of Vertebrates. *Int. J. Biodivers.* 2013; 2013: 1–9.
- Martini F, Fernández C, Tarazona JV, Pablos MV. Gene expression of heat shock protein 70, interleukin-1 β and tumor necrosis factor α as tools to identify immunotoxic effects on *Xenopus laevis*: A dose–response study with benzo[a]pyrene and its degradation products. *Environ. Pollut.* 2012; 160: 28–33.
- Martin LB, Scheuerlein A, Wikelski M. Immune activity elevates energy expenditure of house sparrows: a link between direct and indirect costs? *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2003; 270: 153–158.
- Martín-López B, Montes C, Benayas J. Economic valuation of biodiversity conservation: the meaning of numbers. *Conserv. Biol. J. Soc. Conserv. Biol.* 2008; 22: 624–635.
- Marty J, Djomo J e., Bekaert C, Pfohl-Leszkowicz A. Relationships between formation of micronuclei and DNA adducts and EROD activity in newts following exposure to benzo(a)pyrene. *Environ. Mol. Mutagen.* 1998; 32: 397–405.
- Massart S, Milla S, Kestemont P. Evaluation of estrogenic endocrine disruptors effects on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. *Fish Shellfish Immunol.* 2013; 34: 1723–1724.
- Matamoros V, Jover E, Bayona JM. Advances in the determination of degradation intermediates of personal care products in environmental matrixes: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008; 393: 847–860.
- Matos C, Sillero N, Argana E. Spatial analysis of amphibian road mortality levels in northern Portugal country roads. *Amphib.-Reptil.* 2012; 33: 469–483.
- Matson CW, Gillespie AM, McCarthy C, McDonald TJ, Bickham JW, Sullivan R, et al. Wildlife toxicology: biomarkers of genotoxic exposures at a hazardous waste site. *Ecotoxicology* 2009; 18: 886–898.
- Matson CW, Palatnikov GM, McDonald TJ, Autenrieth RL, Donnelly K c., Anderson TA, et al. Patterns of genotoxicity and contaminant exposure: Evidence of genomic instability in the marsh frogs (*rana ridibunda*) of sumgayit, azerbaijan. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005; 24: 2055–2064.
- Matsumoto T, Shimizu T, Nishijima N, Ikeda A, Eso Y, Matsumoto Y, et al. Hepatic inflammation facilitates transcription-associated mutagenesis via AID activity and enhances liver tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2015; 36: 904–913.
- Matsumura N, Ishibashi H, Hirano M, Nagao Y, Watanabe N, Shiratsuchi H, et al. Effects of nonylphenol and triclosan on production of plasma vitellogenin and testosterone in male South African clawed frogs (*Xenopus laevis*). *Biol. Pharm. Bull.* 2005; 28: 1748–1751.
- Mattson MP. Hormesis Defined. *Ageing Res. Rev.* 2008; 7: 1–7.
- McAvoy DC, Schatowitz B, Jacob M, Hauk A, Eckhoff WS. Measurement of triclosan in wastewater treatment systems. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 2002; 21: 1323–1329.
- McCallum H. Disease and the dynamics of extinction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2012; 367: 2828–2839.
- McConnell LL, Sparling D. Emerging Contaminants and Their Potential Effects on Amphibians and Reptiles. In: *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*. CRC Press; 2010. p. 487–509.
- McDiarmid RW, Altig R. *Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae*. University of Chicago Press; 1999.
- Mebis D, Alvarez JV, Pogoda W, Toennes SW, Köhler G. Poor alkaloid sequestration by arrow poison frogs of the genus *Phyllobates* from Costa Rica. *Toxicon* 2014; 80: 73–77.
- Mednikov DN. Urodelans, Ichthyostega and the origin of the tetrapod limb. *Paleontol. J.* 2014; 48: 1092–1103.

- Merminod C. L'élevage des Dendrobates et des Mantella. P. Gérard; 2000.
- Michalak M, Burns K, Andrin C, Mesacli N, Jass GH, Busaan JL, et al. Endoplasmic Reticulum Form of Calreticulin Modulates Glucocorticoid-sensitive Gene Expression. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 29436–29445.
- Mikszutowicz V, Lucero D, Zago V, Cacciagiú L, Lopez G, Gonzalez Ballerga E, et al. Hepatic lipase activity is increased in non-alcoholic fatty liver disease beyond insulin resistance. *Diabetes Metab. Res. Rev.* 2012; 28: 535–541.
- Miller DL, Rajeev S, Gray MJ, Baldwin CA. Frog Virus 3 Infection, Cultured American Bullfrogs. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13: 342–343.
- Miller MA. Maternal Transfer of Organochlorine Compounds in Salmonines to Their Eggs. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 1993; 50: 1405–1413.
- Mirhaghparast SK, Zibae A, Sendi JJ, Hoda H, Fazeli-Dinan M. Immune and metabolic responses of *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Crambidae) larvae to an insect growth regulator, hexaflumuron. *Pestic. Biochem. Physiol.* 2015; 125: 69–77.
- Mlíčková K, Roux E, Athenstaedt K, d'Andrea S, Daum G, Chardot T, et al. Lipid Accumulation, Lipid Body Formation, and Acyl Coenzyme A Oxidases of the Yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70: 3918–3924.
- Mohneke M, Rödel M-O. Declining amphibian populations and possible ecological consequences – a review. *Salamandra* 2009; 45: 203–210.
- Monget P, Caraty A, Bruneau G, Martin GB. Metabolism-reproduction interactions in domestic animals. *Contracept. Fertil. Sex.* 1992 1998; 26: 554–563.
- Montez P, Vázquez-Medina JP, Rodríguez R, Thorwald MA, Viscarra JA, Lam L, et al. Angiotensin Receptor Blockade Recovers Hepatic UCP2 Expression and Aconitase and SDH Activities and Ameliorates Hepatic Oxidative Damage in Insulin Resistant Rats. *Endocrinology* 2012; 153: 5746–5759.
- Moon S-S, Lee Y-S, Kim J-G, Lee I-K. Association of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 gene polymorphisms with serum alanine aminotransferase activity. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 2013; 99: 343–350.
- Moon Y-A, Liang G, Xie X, Frank-Kamenetsky M, Fitzgerald K, Koteliensky V, et al. The Scap/SREBP Pathway Is Essential for Developing Diabetic Fatty Liver and Carbohydrate-Induced Hypertriglyceridemia in Animals. *Cell Metab.* 2012; 15: 240–246.
- Morse HR, Jones NJ, Peltonen K, Harvey RG, Waters R. The identification and repair of DNA adducts induced by waterborne benzo[a]pyrene in developing *Xenopus laevis* larvae. *Mutagenesis* 1996; 11: 101–109.
- Mosconi G, Carnevali O, Franzoni MF, Cottone E, Lutz I, Kloas W, et al. Environmental Estrogens and Reproductive Biology in Amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2002; 126: 125–129.
- Mouche I, Malesic L, Gillardeaux O. FETAX Assay for Evaluation of Developmental Toxicity. In: Gautier J-C, editor(s). *Drug Safety Evaluation*. Humana Press; 2011. p. 257–269.
- Mouchet F, Gauthier L, Mailhes C, Ferrier V, Devaux A. Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate, and methyl methanesulfonate: Establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environ. Toxicol.* 2005; 20: 74–84.
- Mouchet F, Gauthier L, Mailhes C, Jourdain MJ, Ferrier V, Triffault G, et al. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox® and Ames tests). *Sci. Total Environ.* 2006; 355: 232–246.

- Mudipalli A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J. Med. Res.* 2007; 126: 518–527.
- Murphy JB, Nance RD, Cawood PA. Contrasting modes of supercontinent formation and the conundrum of Pangea. *Gondwana Res.* 2009; 15: 408–420.
- Murray JJ, Pottie RF, Pupp C. The Vapor Pressures and Enthalpies of Sublimation of Five Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Can. J. Chem.* 1974; 52: 557–563.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Cholesterol metabolism and the pathogenesis of non-alcoholic steatohepatitis. *Prog. Lipid Res.* 2013; 52: 175–191.
- Muths E, Stephen Corn P, Pessier AP, Earl Green D. Evidence for disease-related amphibian decline in Colorado. *Biol. Conserv.* 2003; 110: 357–365.

N

- Nabeshima A, Yamada S, Guo X, Tanimoto A, Wang K-Y, Shimajiri S, et al. Peroxiredoxin 4 Protects Against Nonalcoholic Steatohepatitis and Type 2 Diabetes in a Nongenetic Mouse Model. *Antioxid. Redox Signal.* 2013; 19: 1983–1998.
- Nagaya T, Tanaka N, Suzuki T, Sano K, Horiuchi A, Komatsu M, et al. Down-regulation of SREBP-1c is associated with the development of burned-out NASH. *J. Hepatol.* 2010; 53: 724–731.
- Naik A, Košir R, Rozman D. Genomic aspects of NAFLD pathogenesis. *Genomics* 2013; 102: 84–95.
- Natusch DJD, Lyons JA. Exploited for pets: the harvest and trade of amphibians and reptiles from Indonesian New Guinea. *Biodivers. Conserv.* 2012; 21: 2899–2911.
- Nebert DW, Dalton TP, Okey AB, Gonzalez FJ. Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 23847–23850.
- Negrone G, Farina L. L'élevage de grenouilles. *Cah. Agric.* 1993; 2: 48–55.
- Neuhofer W. Role of NFAT5 in Inflammatory Disorders Associated with Osmotic Stress. *Curr. Genomics* 2010; 11: 584–590.
- Neuschäfer-Rube F, Schraplau A, Schewe B, Lieske S, Krützfeldt J-M, Ringel S, et al. Arylhydrocarbon receptor-dependent mIndy (Slc13a5) induction as possible contributor to benzo[a]pyrene-induced lipid accumulation in hepatocytes. *Toxicology* 2015; 337: 1–9.
- NICNAS. Triclosan. National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. 2009.
- Nieuwkoop PD, Faber J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development From the Fertilized Egg Till the End of Metamorphosis. North-Holland Pub. Co. Amsterdam: 1956.
- Norris A, Burgin S. Apparent Rapid Loss of Endocrine Disruptors from Wetlands Used to Store Either Tertiary Treated Sewage Effluent or Stormwater Runoff. *Water. Air. Soil Pollut.* 2010; 219: 285–295.
- Norris DO, Carr JA. *Vertebrate Endocrinology*. Academic Press; 2013.
- Norris S. Ghosts in Our Midst: Coming to Terms with Amphibian Extinctions. *BioScience* 2007; 57: 311–316.

Nunes AL, Orizaola G, Laurila A, Rebelo R. Morphological and life-history responses of anurans to predation by an invasive crayfish: an integrative approach. *Ecol. Evol.* 2014; 4: 1491–1503.

O

Obiakor MO, Okonkwo JC, Ezeonyejiaku CD. Genotoxicity of freshwater ecosystem shows DNA damage in preponderant fish as validated by in vivo micronucleus induction in gill and kidney erythrocytes. *Mutat. Res. Toxicol. Environ. Mutagen.* 2014; 775–776: 20–30.

Ogushi Y, Tsuzuki A, Sato M, Mochida H, Okada R, Suzuki M, et al. The water-absorption region of ventral skin of several semiterrestrial and aquatic anuran amphibians identified by aquaporins. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2010; 299: R1150–R1162.

Okuma C, Ohta T, Tadaki H, Ishigure T, Sakata S, Taniuchi H, et al. JTP-103237, a monoacylglycerol acyltransferase inhibitor, prevents fatty liver and suppresses both triglyceride synthesis and de novo lipogenesis. *J. Pharmacol. Sci.* 2015; 128: 150–157.

Oliveira Filho RE de, Omori AT. Recent Syntheses of Frog Alkaloid Epibatidine. *J. Braz. Chem. Soc.* 2015. Available from: <http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0103-5053.20150045>

OMS. Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors. *Int. Programme Chem. Saf.* 2002

OMS. State of the science of endocrine disrupting chemicals. *Inter-Organ. Programme Sound Manag. Chem.* 2012

Omura A, Anzai W, Endo H. Functional and Morphological Variety in Trunk Muscles of Urodela. *J. Vet. Med. Sci.* 2014; 76: 159.

Opitz R, Braunbeck T, Bogi C, Pickford DB, Nentwig G, Oehlmann J, et al. Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005; 24: 653–664.

Opitz R, Hartmann S, Blank T, Braunbeck T, Lutz I, Kloas W. Evaluation of Histological and Molecular Endpoints for Enhanced Detection of Thyroid System Disruption in *Xenopus laevis* Tadpoles. *Toxicol. Sci.* 2006a; 90: 337–348.

Opitz R, Lutz I, Nguyen N-H, Scanlan TS, Kloas W. Analysis of thyroid hormone receptor β A mRNA expression in *Xenopus laevis* tadpoles as a means to detect agonism and antagonism of thyroid hormone action. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006b; 212: 1–13.

Orton F, Carr JA, Handy RD. Effects of nitrate and atrazine on larval development and sexual differentiation in the northern leopard frog *Rana pipiens*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2006; 25: 65–71.

Orton F, Tyler CR. Do hormone-modulating chemicals impact on reproduction and development of wild amphibians? *Biol. Rev.* 2015; 90: 1100–1117.

Ortubay S, Cussac V, Battini M, Barriga J, Aigo J, Alonso M, et al. Is the decline of birds and amphibians in a steppe lake of northern Patagonia a consequence of limnological changes following fish introduction? *Aquat. Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 2006; 16: 93–105.

Ostfeld RS, Keesing F. Effects of Host Diversity on Infectious Disease. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2012; 43: 157–182.

Otoda T, Takamura T, Misu H, Ota T, Murata S, Hayashi H, et al. Proteasome Dysfunction Mediates Obesity-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Insulin Resistance in the Liver. *Diabetes* 2013; 62: 811–824.

Ozaki N, Bester K, Moldrup P, Henriksen K, Komatsu T. Photodegradation of the synthetic fragrance OTNE and the bactericide triclosan adsorbed on dried loamy sand – Results from models and experiments. *Chemosphere* 2011; 83: 1475–1479.

P

Padrós J, Pelletier É, Ribeiro CO. Metabolic interactions between low doses of benzo[a]pyrene and tributyltin in arctic charr (*Salvelinus alpinus*): a long-term in vivo study. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003; 192: 45–55.

Palenske NM, Nallani GC, Dzialowski EM. Physiological effects and bioconcentration of triclosan on amphibian larvae. *Comp. Biochem. Physiol. C-Toxicol. Pharmacol.* 2010; 152: 232–240.

Palis JG, Aresco MJ, Kilpatrick S. Breeding Biology of a Florida Population of *Ambystoma cingulatum* (Flatwoods Salamander) During a Drought. *Southeast. Nat.* 2006; 5: 1–8.

Palmquist H, Hanæus J. Hazardous substances in separately collected grey- and blackwater from ordinary Swedish households. *Sci. Total Environ.* 2005; 348: 151–163.

Pan Q-R, Ren Y-L, Liu W-X, Hu Y-J, Zheng J-S, Xu Y, et al. Resveratrol prevents hepatic steatosis and endoplasmic reticulum stress and regulates the expression of genes involved in lipid metabolism, insulin resistance, and inflammation in rats. *Nutr. Res.* 2015; 35: 576–584.

Park CJ, Kang HS, Gye MC. Effects of nonylphenol on early embryonic development, pigmentation and 3,5,3'-triiodothyronine-induced metamorphosis in *Bombina orientalis* (Amphibia: Anura). *Chemosphere* 2010; 81: 1292–1300.

Park M-J, Kim D-I, Lim S-K, Choi J-H, Kim J-C, Yoon K-C, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates hepatic lipogenesis and inflammation via PRMT1 and PGC-1 α regulation in vitro and in vivo. *J. Hepatol.* 2014; 61: 1151–1157.

Patrolecco L, Ademollo N, Capri S, Pagnotta R, Polesello S. Occurrence of priority hazardous PAHs in water, suspended particulate matter, sediment and common eels (*Anguilla anguilla*) in the urban stretch of the River Tiber (Italy). *Chemosphere* 2010; 81: 1386–1392.

Patterson AR, Mo X, Shapiro A, Wernke KE, Archer TK, Burd CJ. Sustained Reprogramming of the Estrogen Response After Chronic Exposure to Endocrine Disruptors. *Mol. Endocrinol.* 2015; 29: 384–395.

Pearl CA, Adams MJ, Bury RB, McCreary B. Asymmetrical Effects of Introduced Bullfrogs (*Rana catesbeiana*) on Native Ranid Frogs in Oregon. *Copeia* 2004; 2004: 11–20.

Peel AJ, Hartley M, Cunningham AA. Qualitative risk analysis of introducing *Batrachochytrium dendrobatidis* to the UK through the importation of live amphibians. *Dis. Aquat. Organ.* 2012; 98: 95–112.

Peeler EJ, Oidtmann BC, Midtlyng PJ, Miossec L, Gozlan RE. Non-native aquatic animals introductions have driven disease emergence in Europe. *Biol. Invasions* 2011; 13: 1291–1303.

Pei L, Waki H, Vaitheesvaran B, Wilpitz DC, Kurland IJ, Tontonoz P. NR4A orphan nuclear receptors are transcriptional regulators of hepatic glucose metabolism. *Nat. Med.* 2006; 12: 1048–1055.

- Penman TD, Keith DA, Elith J, Mahony MJ, Tingley R, Baumgartner JB, et al. Interactive effects of climate change and fire on metapopulation viability of a forest-dependent frog in south-eastern Australia. *Biol. Conserv.* 2015; 190: 142–153.
- Penning TM, Burczynski ME, Hung C-F, McCoull KD, Palackal NT, Tsuruda LS. Dihydrodiol Dehydrogenases and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Activation: Generation of Reactive and Redox Active o-Quinones. *Chem. Res. Toxicol.* 1999; 12: 1–18.
- Perez AL, De Saylor MA, Slocombe AJ, Lew MG, Unice KM, Donovan EP. Triclosan occurrence in freshwater systems in the United States (1999-2012): a meta-analysis. *Environ. Toxicol. Chem. SETAC* 2013; 32: 1479–1487.
- Pessayre D, Mansouri A, Haouzi D, Fromenty B. Hepatotoxicity due to mitochondrial dysfunction. *Cell Biol. Toxicol.* 1999; 15: 367–373.
- Pezdiric M, Heath E, Bizjak Mali L, Bulog B. PCB accumulation and tissue distribution in cave salamander (*Proteus anguinus*, Amphibia, Urodela) in the polluted karstic hinterland of the Krupa River, Slovenia. *Chemosphere* 2011; 84: 987–993.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: e45.
- Pierce SE, Clack JA, Hutchinson JR. Three-dimensional limb joint mobility in the early tetrapod *Ichthyostega*. *Nature*. 2012; 486: 523–526.
- Pievani T. The sixth mass extinction: Anthropocene and the human impact on biodiversity. *Rendiconti Lincei* 2014; 25: 85–93.
- Pilliod DS, Hossack BR, Bahls PF, Bull EL, Corn PS, Hokit G, et al. Non-native salmonids affect amphibian occupancy at multiple spatial scales: Multi-scale fish effects on amphibians. *Divers. Distrib.* 2010; 16: 959–974.
- Pilliod DS, Peterson CR. Local and landscape effects of introduced trout on amphibians in historically fishless watersheds. *Ecosystems* 2001; 4: 322–333.
- Pinkney AE, Harshbarger JC, May EB, Melancon MJ. Tumor prevalence and biomarkers of exposure in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*) from the tidal Potomac River, USA, watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 2001; 20: 1196–1205.
- Pinto P, Vandreal P, Kaplan A. Aldolase .i. Colorimetric Determination. *Clin. Chem.* 1969; 15: 339–&.
- Piotrowski JS, Annis SL, Longcore JE. Physiology of *Batrachochytrium dendrobatidis*, a chytrid pathogen of amphibians. *Mycologia* 2004; 96: 9–15.
- Plowman MC, Grbac-Ivankovic S, Martin J, Hopfer SM, Sunderman FW. Malformations persist after metamorphosis of *Xenopus laevis* tadpoles exposed to Ni²⁺, Co²⁺, or Cd²⁺ in FETAX assays. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 1994; 14: 135–144.
- Polgar G, Jaafar Z, Konstantinidis P. A new species of mudskipper, *Boleophthalmus poti* (Teleostei: Gobiidae: Oxudercinae) from the Gulf of Papua, Papua New Guinea, and a key to the genus. *Raffles Bull. Zool.* 2013; 61: 311–321.
- Pollet N. A propos de la génomique fonctionnelle et du xénope. 2005
- Potter D, Clarius TM, Wright AS, Watson WP. Molecular dosimetry of DNA adducts in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to benzo(a)pyrene by different routes. *Arch. Toxicol.* 1994; 69: 1–7.
- Pough FH. Amphibian biology and husbandry. *ILAR J.* 2007; 48: 203–2013.

Pretorius A, Kaur M, Wamalwa M, Essack M, Bajic VB, Rees DJG. Functional analysis and characterization of the human RBBP6 promoters based on a combination of molecular biology and in silico approaches provide additional evidence for RBBP6 role in apoptosis. *J. Biosci.* 2014; 1

Prota G. *Melanins and Melanogenesis.* Academic Press; 2012.

Puigserver P, Rhee J, Donovan J, Walkey CJ, Yoon JC, Oriente F, et al. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1–PGC-1 α interaction. *Nature* 2003; 423: 550–555.

Pyron RA, Wiens JJ. A large-scale phylogeny of Amphibia including over 2800 species, and a revised classification of extant frogs, salamanders, and caecilians. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2011; 61: 543–583.

Q

Qin Z-F, Qin X-F, Yang L, Li H-T, Zhao X-R, Xu X-B. Feminizing/demasculinizing effects of polychlorinated biphenyls on the secondary sexual development of *Xenopus laevis*. *Aquat. Toxicol.* 2007; 84: 321–327.

Quaranta A, Bellantuono V, Cassano G, Lippe C. Why Amphibians Are More Sensitive than Mammals to Xenobiotics. *Plos One* 2009; 4: e7699.

R

Rachowicz LJ, Knapp RA, Morgan JAT, Stice MJ, Vredenburg VT, Parker JM, et al. Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology* 2006; 87: 1671–1683.

Rankouhi TR, Koomen B, Sanderson JT, Bosveld ATC, Seinen W, van den Berg M. Induction of ethoxyresorufin-O-deethylase activity by halogenated aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in primary hepatocytes of the green frog (*Rana esculenta*). *Environ. Toxicol. Chem.* 2005; 24: 1428–1435.

Ranvestel AW, Lips KR, Pringle CM, Whiles MR, Bixby RJ. Neotropical tadpoles influence stream benthos: evidence for the ecological consequences of decline in amphibian populations. *Freshw. Biol.* 2004; 49: 274–285.

Raut SA, Angus RA. Triclosan has endocrine-disrupting effects in male western mosquitofish, *Gambusia affinis*. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010; 29: 1287–1291.

Reed BT. Guidance on the housing and care of the African clawed frog *Xenopus laevis*. *Res. Anim. Departement - RSPCA* 2005: 1–74.

Reeder AL, Ruiz MO, Pessier A, Brown LE, Levensgood JM, Phillips CA, et al. Intersexuality and the Cricket Frog Decline: Historic and Geographic Trends. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 261–265.

Regnault C, Worms IA, Oger-Desfeux C, MelodeLima C, Veyrenc S, Bayle M-L, et al. Impaired liver function in *Xenopus tropicalis* exposed to benzo [a] pyrene: transcriptomic and metabolic evidence. *BMC Genomics* 2014; 15: 666.

Relyea RA. Predator cues and pesticides: a double dose of danger for amphibians. *Ecol. Appl.* 2003; 13: 1515–1521.

- Relyea RA. The Lethal Impacts of Roundup and Predatory Stress on Six Species of North American Tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2004; 48: 351–357.
- Relyea RA. The effects of pesticides on amphibians. In: *Threatened amphibians of the world*. Lynx Edicions; 2008.
- Relyea RA. New effects of Roundup on amphibians: Predators reduce herbicide mortality; herbicides induce antipredator morphology. *Ecol. Appl.* 2012; 22: 634–647.
- Relyea RA, Mills N. Predator-induced stress makes the pesticide carbaryl more deadly to gray treefrog tadpoles (*Hyla versicolor*). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 2491–2496.
- Relyea RA, Schoeppner NM, Hoverman JT. Pesticides and amphibians: the importance of community context. *Ecol. Appl.* 2005; 15: 1125–1134.
- Relyea R, Hoverman J. Assessing the ecology in ecotoxicology: a review and synthesis in freshwater systems. *Ecol. Lett.* 2006; 9: 1157–1171.
- Rensen S, Loyens E, Bieghs V, Wouters K, Shiri-Sverdlov R, Buurman W. Myeloperoxidase deficiency diminishes hepatic steatosis without affecting plasma glucose levels in mice. *Diabetologia* 2008; 51: S320–S320.
- Ren Z, Zhu B, Ma E, Wen J, Tu T, Cao Y, et al. Complete nucleotide sequence and gene arrangement of the mitochondrial genome of the crab-eating frog *Fejervarya cancrivora* and evolutionary implications. *Gene* 2009; 441: 148–155.
- Reynaud S, Deschaux P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review. *Aquat. Toxicol.* 2006; 77: 229–238.
- Reynaud S, Duchiron C, Deschaux P. 3-Methylcholanthrene induces lymphocyte and phagocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio* L) in vitro. *Aquat. Toxicol.* 2004; 66: 307–318.
- Reynaud S, Worms IAM, Veyrenc S, Portier J, Maitre A, Miaud C, et al. Toxicokinetic of benzo[a]pyrene and fipronil in female green frogs (*Pelophylax kl. esculentus*). *Environ. Pollut.* 2012; 161: 206–214.
- Reynolds SJ. Impact of the Introduced Poeciliid *Gambusia holbrooki* on Amphibians in Southwestern Australia. *Copeia* 2009; 2009: 296–302.
- Ribback S, Calvisi DF, Cigliano A, Sailer V, Peters M, Rausch J, et al. Molecular and metabolic changes in human liver clear cell foci resemble the alterations occurring in rat hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* 2013; 58: 1147–1156.
- Ricklefs RE, Miller GL. *Écologie*. De Boeck Supérieur; 2005.
- Rittmeyer EN, Allison A, Gründler MC, Thompson DK, Austin CC. Ecological Guild Evolution and the Discovery of the World's Smallest Vertebrate. *PLoS ONE* 2012; 7: e29797.
- Roberts A, Trapnell C, Donaghey J, Rinn JL, Pachter L. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias. *Genome Biol.* 2011; 12: R22.
- Roccaro P, Vagliasindi FG. Risk Assessment of the Use of Biosolids Containing Emerging Organic Contaminants in Agriculture. *Chem. Eng.* 2014; 37(1): 226–47.
- Roelants K, Gower DJ, Wilkinson M, Loader SP, Biju SD, Guillaume K, et al. Global patterns of diversification in the history of modern amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 104: 887–892.
- Rohr JR, Crumrine PW. Effects of an herbicide and an insecticide on pond community structure and processes. *Ecol. Appl.* 2005; 15: 1135–1147.

Rohr JR, Elskus AA, Shepherd BS, Crowley PH, McCarthy TM, Niedzwiecki JH, et al. Lethal and sublethal effects of atrazine, carbaryl, endosulfan, and octylphenol on the streamside salamander (*Ambystoma barbouri*). *Environ. Toxicol. Chem.* 2003; 22: 2385–2392.

Rohr JR, Schotthoefer AM, Raffel TR, Carrick HJ, Halstead N, Hoverman JT, et al. Agrochemicals increase trematode infections in a declining amphibian species. *Nature* 2008; 455: 1235–1239.

Rollins-Smith LA. The role of amphibian antimicrobial peptides in protection of amphibians from pathogens linked to global amphibian declines. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2009; 1788: 1593–1599.

Rollins-Smith LA, Doersam JK, Longcore JE, Taylor SK, Shamblin JC, Carey C, et al. Antimicrobial peptide defenses against pathogens associated with global amphibian declines. *Dev. Comp. Immunol.* 2002; 26: 63–72.

V

Van Rooij P, Martel A, D'Herde K, Brutyn M, Croubels S, Ducatelle R, et al. Germ Tube Mediated Invasion of *Batrachochytrium dendrobatidis* in Amphibian Skin Is Host Dependent. *PLoS ONE* 2012; 7: e41481.

R

Rose JP, Todd BD. Projecting Invasion Risk of Non-Native Watersnakes (*Nerodia fasciata* and *Nerodia sipedon*) in the Western United States. *PLoS ONE* 2014; 9: e100277.

Rosenblum EB, Poorten TJ, Settles M, Murdoch GK, Robert J, Maddox N, et al. Genome-Wide Transcriptional Response of *Silurana (Xenopus) tropicalis* to Infection with the Deadly Chytrid Fungus. *PLoS ONE* 2009; 4: e6494.

Rousset S, Alves-Guerra M-C, Mozo J, Miroux B, Cassard-Doulicier A-M, Bouillaud F, et al. The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes* 2004; 53: S130–S135.

Rubbo MJ, Lanterman JL, Falco RC, Daniels TJ. The Influence of Amphibians on Mosquitoes in Seasonal Pools: Can Wetlands Protection Help to Minimize Disease Risk ? *Wetlands* 2011; 31: 799–804.

Ruland J. CARD9 Signaling in the Innate Immune Response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; 1143: 35–44.

S

Sadinski WJ, Levay G, Wilson MC, Hoffman JR, Bodell WJ, Anderson SL. Relationships among DNA adducts, micronuclei, and fitness parameters in *Xenopus laevis* exposed to benzo[a]pyrene. *Aquat. Toxicol.* 1995; 32: 333–352.

Saeed AI, Sharov V, White J, Li J, Liang W, Bhagabati N, et al. TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 2003; 34: 374–378.

Saenz D, Fucik EM, Kwiatkowski MA. Synergistic effects of the invasive Chinese tallow (*Triadica sebifera*) and climate change on aquatic amphibian survival. *Ecol. Evol.* 2013; 3: 4828–4840.

- Säfhholm M, Norder A, Fick J, Berg C. Disrupted Oogenesis in the Frog *Xenopus tropicalis* after Exposure to Environmental Progesterone Concentrations. *Biol. Reprod.* 2012; 86: 126.
- Säfhholm M, Ribbenstedt A, Fick J, Berg C. Risks of hormonally active pharmaceuticals to amphibians: a growing concern regarding progestagens. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2014; 369: 20130577.
- Safi R, Begue A, Hänni C, Stehelin D, Tata JR, Laudet V. Thyroid hormone receptor genes of neotenic amphibians. *J. Mol. Evol.* 1997; 44: 595–604.
- Saka M. Developmental toxicity of p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, 2,4,6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzo[a]pyrene in *Xenopus laevis* embryos. *Environ. Toxicol. Chem.* 2004; 23: 1065–1073.
- Sandland GJ, Minchella DJ. Costs of immune defense: an enigma wrapped in an environmental cloak? *Trends Parasitol.* 2003; 19: 571–574.
- San Mauro D. A multilocus timescale for the origin of extant amphibians. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010; 56: 554–561.
- San Mauro D, Vences M, Alcobendas M, Zardoya R, Meyer A. Initial Diversification of Living Amphibians Predated the Breakup of Pangaea. *Am. Nat.* 2005; 165: 590–599.
- Saponaro C, Gaggini M, Carli F, Gastaldelli A. The Subtle Balance between Lipolysis and Lipogenesis: A Critical Point in Metabolic Homeostasis. *Nutrients* 2015; 7: 9453–9474.
- Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* 2000; 45: 528–537.
- Sá RO de, Hillis DM. Phylogenetic relationships of the pipid frogs *Xenopus* and *Silurana*: an integration of ribosomal DNA and morphology. *Mol. Biol. Evol.* 1990; 7: 365–376.
- Sauermann M, Sahin Ö, Sülmann H, Hahne F, Blaszkiewicz S, Majety M, et al. Reduced expression of vacuole membrane protein 1 affects the invasion capacity of tumor cells. *Oncogene* 2007; 27: 1320–1326.
- Scalia M, Geremia E, Corsaro C, Santoro C, Baratta D, Sichel G. Lipid Peroxidation in Pigmented and Unpigmented Liver Tissues: Protective Role of Melanin. *Pigment Cell Res.* 1990; 3: 115–119.
- Schreiber AM, Das B, Huang H, Marsh-Armstrong N, Brown DD. Diverse developmental programs of *Xenopus laevis* metamorphosis are inhibited by a dominant negative thyroid hormone receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2001; 98: 10739–10744.
- Schug TT, Janesick A, Blumberg B, Heindel JJ. Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011; 127: 204–215.
- Schweizer HP. Triclosan: a widely used biocide and its link to antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* 2001; 202: 1–7.
- Schwendiman AL, Propper CR. A common environmental contaminant affects sexual behavior in the clawed frog, *Xenopus tropicalis*. *Physiol. Behav.* 2012; 106: 520–526.
- Schwindt AR. Parental effects of endocrine disrupting compounds in aquatic wildlife: Is there evidence of transgenerational inheritance? *Gen. Comp. Endocrinol.* 2015; 219: 152–164.
- Secrétariat de la Convention sur la diversité biologique. 3^{ème} édition des Perspectives mondiales de la diversité biologique. Montreal, Quebec, Canada: Secretariat of the Convention on Biological Diversity; 2010.
- Secrétariat de la Convention sur la diversité biologique. 4^{ème} édition des Perspectives mondiales de la diversité biologique. Montreal, Quebec, Canada: Secretariat of the Convention on Biological Diversity; 2014.

- Seki E, Brenner DA, Karin M. A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches. *Gastroenterology* 2012; 143: 307–320.
- Shabalina IG, Nedergaard J. Mitochondrial ('mild') uncoupling and ROS production: physiologically relevant or not? *Biochem. Soc. Trans.* 2011; 39: 1305–1309.
- Sharma A, Kumar K, Prasad V, Thakur B. A new caecilian *Ichthyophis davidi* sp. nov. (Gymnophiona: Ichthyophiidae): the largest striped caecilian from the Western Ghats. *Curr. Sci.* 2011; 101: 1015.
- Shi H, Zhu P, Guo S. Effects of tributyltin on metamorphosis and gonadal differentiation of *Xenopus laevis* at environmentally relevant concentrations. *Toxicol. Ind. Health* 2014; 30: 297–303.
- Shiokawa K, Kajita E, Hara H, Yatsuki H, Hori K. A developmental biological study of aldolase gene expression in *Xenopus laevis*. *Cell Res.* 2002; 12: 85–96.
- Sigurdsen T, Green DM. The origin of modern amphibians: a re-evaluation. *Zool. J. Linn. Soc.* 2011; 162: 457–469.
- da Silva HR, de Britto-Pereira MC. How much fruit do fruit-eating frogs eat? An investigation on the diet of *Xenohyla truncata* (Lissamphibia: Anura: Hylidae). *J. Zool.* 2006; 270: 692–698.
- Silva S, Servia MJ, Vieira-Lanero R, Cobo F. Downstream migration and hematophagous feeding of newly metamorphosed sea lampreys (*Petromyzon marinus* Linnaeus, 1758). *Hydrobiologia* 2013; 700: 277–286.
- Singer H, Müller S, Tixier C, Pillonel L. Triclosan: Occurrence and Fate of a Widely Used Biocide in the Aquatic Environment: Field Measurements in Wastewater Treatment Plants, Surface Waters, and Lake Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36: 4998–5004.
- Smith GR, Burgett AA. Effects of three organic wastewater contaminants on American toad, *Bufo americanus*, tadpoles. *Ecotoxicology* 2005; 14: 477–482.
- Sneitz N, Krishnan K, Covey DF, Finel M. Glucuronidation of the steroid enantiomers ent-17 β -estradiol, ent-androsterone and ent-etiocholanolone by the human UDP-glucuronosyltransferases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011; 127: 282–288.
- Soclo HH, Garrigues P, Ewald M. Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Coastal Marine Sediments: Case Studies in Cotonou (Benin) and Aquitaine (France) Areas. *Mar. Pollut. Bull.* 2000; 40: 387–396.
- Sokolović M, Sokolović A, van Roomen CPAA, Gruber A, Ottenhoff R, Scheij S, et al. Unexpected effects of fasting on murine lipid homeostasis – Transcriptomic and lipid profiling. *J. Hepatol.* 2010; 52: 737–744.
- Sookoian S, Castaño GO, Burgueño AL, Rosselli MS, Gianotti TF, Mallardi P, et al. Circulating levels and hepatic expression of molecular mediators of atherosclerosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* 2010; 209: 585–591.
- Souza AM, Pires RC, Borges VS, Eterovick PC. Road mortality of the herpetofauna in a Cerrado ecosystem, central Brazil. *Herpetol. J.* 2015; 25: 141–148.
- Sparling DW, Fellers GM. Toxicity of two insecticides to California, USA, anurans and its relevance to declining amphibian populations. *Environ. Toxicol. Chem.* 2009; 28: 1696–1703.
- Sparling DW, Fellers GM, McConnell LL. Pesticides and amphibian population declines in California, USA. *Environ. Toxicol. Chem.* 2001; 20: 1591–1595.
- Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest S. Recent advancements in amphibian and reptile ecotoxicology. In: *Ecotoxicology of amphibians and reptiles. Society of environmental toxicology and chemistry (SETAC); 2010. a. p. 1–12.*

Sparling DW, Linder G, Bishop CA, Krest S. *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles*, Second Edition. CRC Press; 2010. b.

Srogi K. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environ. Chem. Lett.* 2007; 5: 169–195.

Stabenau EK, Giczewski DT, Maillacheruvu KY. Uptake and elimination of naphthalene from liver, lung, and muscle tissue in the leopard frog (*Rana pipiens*). *J. Environ. Sci. Health Part A Tox. Hazard. Subst. Environ. Eng.* 2006; 41: 1449–1461.

Stewart MJ, Parikh S, Xiao G, Tonge PJ, Kisker C. Structural basis and mechanism of enoyl reductase inhibition by triclosan. *J. Mol. Biol.* 1999; 290: 859–865.

Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, et al. Status and Trends of Amphibian Declines and Extinctions Worldwide. *Science* 2004; 306: 1783–1786.

Sturgill MG, Lambert GH. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. *Clin. Chem.* 1997; 43: 1512–1526.

Suga K, Saito A, Mishima T, Akagawa K. ER and Golgi stresses increase ER–Golgi SNARE Syntaxin5: Implications for organelle stress and β APP processing. *Neurosci. Lett.* 2015; 604: 30–35.

Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. *PLoS ONE* 2011; 6: e21800.

Swedenborg E, Pongratz I. AhR and ARNT modulate ER signaling. *Toxicology* 2010; 268: 132–138.

Swei A, Rowley JJJ, Rödder D, Diesmos MLL, Diesmos AC, Briggs CJ, et al. Is Chytridiomycosis an Emerging Infectious Disease in Asia? *PLoS ONE* 2011; 6: e23179.

T

Tang Z, Zhang W, Wan C, Xu G, Nie X, Zhu X, et al. TRAM1 protect HepG2 cells from palmitate induced insulin resistance through ER stress-JNK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015; 457: 578–584.

Tarr TL, Babbitt KJ. Effects of habitat complexity and predator identity on predation of *Rana clamitans* larvae. *Amphib.-Reptil.* 2002; 23: 13–20.

Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D. Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002a; 21: 527–531.

Tavera-Mendoza L, Ruby S, Brousseau P, Fournier M, Cyr D, Marcogliese D. Response of the amphibian tadpole *Xenopus laevis* to atrazine during sexual differentiation of the ovary. *Environ. Toxicol. Chem.* 2002b; 21: 1264–1267.

Teubner D, Paulus M, Veith M, Klein R. Biometric parameters of the bream (*Abramis brama*) as indicators for long-term changes in fish health and environmental quality—data from the German ESB. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 2014; 22: 1620–1627.

Thakur PC, Stuckenholz C, Rivera MR, Davison JM, Yao JK, Amsterdam A, et al. Lack of de novo phosphatidylinositol synthesis leads to endoplasmic reticulum stress and hepatic steatosis in *cdipt*-deficient zebrafish. *Hepatology* 2011; 54: 452–462.

- Tietge JE, Holcombe GW, Flynn KM, Kosian PA, Korte JJ, Anderson LE, et al. Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate: Effects on development and thyroid histology. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005; 24: 926–933.
- Tixier C, Singer HP, Canonica S, Müller SR. Phototransformation of Triclosan in Surface Waters: A Relevant Elimination Process for This Widely Used Biocide. *Laboratory Studies, Field Measurements, and Modeling. Environ. Sci. Technol.* 2002; 36: 3482–3489.
- Tobiszewski M, Namieśnik J. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environ. Pollut.* 2012; 162: 110–119.
- Todd BD, Bergeron CM, Hepner MJ, Hopkins WA. Aquatic and terrestrial stressors in amphibians: A test of the double jeopardy hypothesis based on maternally and trophically derived contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.* 2011; 30: 2277–2284.
- Todd BD, Willson JD, Bergeron CM, Hopkins WA. Do effects of mercury in larval amphibians persist after metamorphosis? *Ecotoxicology* 2012; 21: 87–95.
- Tomaru U, Takahashi S, Ishizu A, Miyatake Y, Gohda A, Suzuki S, et al. Decreased Proteasomal Activity Causes Age-Related Phenotypes and Promotes the Development of Metabolic Abnormalities. *Am. J. Pathol.* 2012; 180: 963–972.
- Totowa, NJ. *Connexins*. Humana Press; 2009.
- Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat. Biotechnol.* 2013; 31: 46–53.
- Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009; 25: 1105–1111.
- Tseng A-S, Beane WS, Lemire JM, Masi A, Levin M. Induction of Vertebrate Regeneration by a Transient Sodium Current. *J. Neurosci.* 2010; 30: 13192–13200.
- Turque N, Palmier K, Le Mével S, Alliot C, Demeneix BA. A Rapid, Physiologic Protocol for Testing Transcriptional Effects of Thyroid-Disrupting Agents in Premetamorphic *Xenopus* Tadpoles. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 1588–1593.
- Tymowska J, Fischberg M. Chromosome complements of the genus *Xenopus*. *Chromosoma* 1973; 44: 335–342.

U

- Ueda H, Ikenaka Y, Nakayama SMM, Tanaka-Ueno T, Ishizuka M. Phase-II conjugation ability for PAH metabolism in amphibians: Characteristics and inter-species differences. *Aquat. Toxicol.* 2011; 105: 337–343.
- Ung CY, Lam SH, Hlaing MM, Winata CL, Korzh S, Mathavan S, et al. Mercury-induced hepatotoxicity in zebrafish: in vivo mechanistic insights from transcriptome analysis, phenotype anchoring and targeted gene expression validation. *Bmc Genomics* 2010; 11: 212.
- UniProt consortium. UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43: D204–D212.
- Urbatzka R, Bottero S, Mandich A, Lutz I, Kloas W. Endocrine disruptors with (anti)estrogenic and (anti)androgenic modes of action affecting reproductive biology of *Xenopus laevis*: I. Effects on sex steroid levels and biomarker expression. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 2007; 144: 310–318.

Urbatzka R, Lutz I, Opitz R, Kloas W. Luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, and gonadotropin releasing hormone mRNA expression of *Xenopus laevis* in response to endocrine disrupting compounds affecting reproductive biology. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2006; 146: 119–125.

V

VanCompernelle SE, Taylor RJ, Oswald-Richter K, Jiang J, Youree BE, Bowie JH, et al. Antimicrobial Peptides from Amphibian Skin Potently Inhibit Human Immunodeficiency Virus Infection and Transfer of Virus from Dendritic Cells to T Cells. *J. Virol.* 2005; 79: 11598–11606.

Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs DR, Lee D-H, et al. Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocr. Rev.* 2012; 33: 378–455.

VanSaun MN, Mendonsa AM, Lee Gorden D. Hepatocellular Proliferation Correlates with Inflammatory Cell and Cytokine Changes in a Murine Model of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *PLoS ONE* 2013; 8: e73054.

Veldhoen N, Skirrow RC, Osachoff H, Wigmore H, Clapson DJ, Gunderson MP, et al. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. *Aquat. Toxicol.* 2006; 80: 217–227.

Verlicchi P, Zambello E. Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil — A critical review. *Sci. Total Environ.* 2015; 538: 750–767.

Vial G, Dubouchaud H, Couturier K, Cottet-Rousselle C, Taleux N, Athias A, et al. Effects of a high-fat diet on energy metabolism and ROS production in rat liver. *J. Hepatol.* 2011; 54: 348–356.

Vieites DR, Wollenberg KC, Andreone F, Köhler J, Glaw F, Vences M. Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidenced by an integrative amphibian inventory. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009; 106: 8267–8272.

Viertel B. Functional response of suspension feeding anuran larvae to different particle sizes at low concentrations (Amphibia). *Hydrobiologia* 1992; 234: 151–173.

Vilella AJ, Severin J, Ureta-Vidal A, Heng L, Durbin R, Birney E. EnsemblCompara GeneTrees: Complete, duplication-aware phylogenetic trees in vertebrates. *Genome Res.* 2009; 19: 327–335.

Villa A, Torre SD, Stell A, Cook J, Brown M, Maggi A. Tetradian oscillation of estrogen receptor α is necessary to prevent liver lipid deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012; 109: 11806–11811.

Villar P, Callejón M, Alonso E, Jiménez JC, Guiraúm A. Temporal evolution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sludge from wastewater treatment plants: Comparison between PAHs and heavy metals. *Chemosphere* 2006; 64: 535–541.

Vitt IJ, Caldwell JP. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles.* Academic Press; 2013.

Vojinovic-Miloradov M, Buzarov D, Adamov J, Simic S, Popovic E. Determination of polychlorinated biphenyls and polyaromatic hydrocarbons in frog liver. *Water Sci. Technol.* 1996; 34: 153–156.

W

- Wahlang B, Beier JI, Clair HB, Bellis-Jones HJ, Falkner KC, McClain CJ, et al. Toxicant-associated Steatohepatitis. *Toxicol. Pathol.* 2013; 41: 343–360.
- Wake DB, Vredenburg VT. Are we in the midst of the sixth mass extinction? A view from the world of amphibians. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008; 105: 11466–11473.
- Wake MH. Fetal adaptations for viviparity in amphibians: Amphibian Fetal Adaptations. *J. Morphol.* 2015; 276: 941–960.
- Waller-Evans H, Hue C, Fearnside J, Rothwell AR, Lockstone HE, Caldérari S, et al. Nutrigenomics of High Fat Diet Induced Obesity in Mice Suggests Relationships between Susceptibility to Fatty Liver Disease and the Proteasome. *PLoS ONE* 2013; 8: e82825.
- Wallet MA, Calderon NL, Alonso TR, Choe CS, Catalfamo DL, Lalane CJ, et al. Triclosan Alters Anti-microbial and Inflammatory Responses of Epithelial Cells. *Oral Dis.* 2012; 19(3): 296-302.
- Wallingford JB, Liu KJ, Zheng Y. *Xenopus*. *Curr. Biol.* 2010; 20: R263–R264.
- Wang L, Scheffler BE, Willett KL. CYP1C1 messenger RNA expression is inducible by benzo[a]pyrene in *Fundulus heteroclitus* embryos and adults. *Toxicol. Sci.* 2006; 93: 331–340.
- Wang M, Chai L, Zhao H, Wu M, Wang H. Effects of nitrate on metamorphosis, thyroid and iodothyronine deiodinases expression in *Bufo gargarizans* larvae. *Chemosphere* 2015; 139: 402–409.
- Wang XL, Tao S, Dawson RW, Xu FL. Characterizing and comparing risks of polycyclic aromatic hydrocarbons in a Tianjin wastewater-irrigated area. *Environ. Res.* 2002; 90: 201–206.
- Warkentin IG, Bickford D, Sodhi NS, Bradshaw CJA. Eating Frogs to Extinction. *Conserv. Biol.* 2009; 23: 1056–1059.
- Wassén H. The Frog in Indian Mythology and Imaginative World. *Anthropos* 1934; 29: 613–658.
- Waxman DJ. Regulation of liver-specific steroid metabolizing cytochromes P450: Cholesterol 7 α -hydroxylase, bile acid 6 β -hydroxylase, and growth hormone-responsive steroid hormone hydroxylases. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1992; 43: 1055–1072.
- Wei Y, Chen K, Whaley-Connell AT, Stump CS, Ibdah JA, Sowers JR. Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2008; 294: R673–R680.
- Wheeler GN, Brändli AW. Simple vertebrate models for chemical genetics and drug discovery screens: lessons from zebrafish and *Xenopus*. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* 2009; 238: 1287–1308.
- Whiles MR, Lips KR, Pringle CM, Kilham SS, Bixby RJ, Brenes R, et al. The effects of amphibian population declines on the structure and function of Neotropical stream ecosystems. *Front. Ecol. Environ.* 2006; 4: 27–34.
- Whitfield SM, Bell KE, Philippi T, Sasa M, Bolaños F, Chaves G, et al. Amphibian and reptile declines over 35 years at La Selva, Costa Rica. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 104: 8352–8356.
- Wilkinson M, Kupfer A, Marques-Porto R, Jeffkins H, Antoniazzi MM, Jared C. One hundred million years of skin feeding? Extended parental care in a Neotropical caecilian (Amphibia: Gymnophiona). *Biol. Lett.* 2008; 4: 358–361.

Willett KL, Gardinali PR, Lienesch LA, Giulio RTD. Comparative Metabolism and Excretion of Benzo(a)pyrene in 2 Species of Ictalurid Catfish. *Toxicol. Sci.* 2000; 58: 68–76.

Willrich MAV, Hirata MH, Genvigir FDV, Arazi SS, Rebecchi IMM, Rodrigues AC, et al. CYP3A5*3A allele is associated with reduced lowering-lipid response to atorvastatin in individuals with hypercholesterolemia. *Clin. Chim. Acta* 2008; 398: 15–20.

Wills LP, Jung D, Koehn K, Zhu S, Willett KL, Hinton DE, et al. Comparative Chronic Liver Toxicity of Benzo[a]pyrene in Two Populations of the Atlantic Killifish (*Fundulus heteroclitus*) with Different Exposure Histories. *Environ. Health Perspect.* 2010; 118: 1376–1381.

Wind T, Werner U, Jacob M, Hauk A. Environmental concentrations of boron, LAS, EDTA, NTA and Triclosan simulated with GREAT-ER in the river Itter. *Chemosphere* 2004; 54: 1145–1154.

Woinarski JCZ, McCosker JC, Gordon G, Lawrie B, James C, Augusteyn J, et al. Monitoring change in the vertebrate fauna of central Queensland, Australia, over a period of broad-scale vegetation clearance, 1973–2002. *Wildl. Res.* 2006; 33: 263.

Woodhams DC, Alford RA. Ecology of Chytridiomycosis in Rainforest Stream Frog Assemblages of Tropical Queensland. *Conserv. Biol.* 2005; 19: 1449–1459.

Woodhams DC, Alford RA, Briggs CJ, Johnson M, Rollins-Smith LA. Life-history trade-offs influence disease in changing climates: strategies of an amphibian pathogen. *Ecology* 2008; 89: 1627–1639.

Woodhams DC, Kilburn VL, Reinert LK, Voyles J, Medina D, Ibáñez R, et al. Chytridiomycosis and Amphibian Population Declines Continue to Spread Eastward in Panama. *EcoHealth* 2008; 5: 268–274.

Woolhouse MEJ, Taylor LH, Haydon DT. Population Biology of Multihost Pathogens. *Science* 2001; 292: 1109–1112.

Wu B, Zhang R, Cheng S-P, Ford T, Li A-M, Zhang X-X. Risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic ecosystems. *Ecotoxicology* 2011; 20: 1124–1130.

Wu C-L, Zhao S-P, Yu B-L. Microarray analysis provides new insights into the function of apolipoprotein O in HepG2 cell line. *Lipids Health Dis.* 2013; 12: 186.

Wu C, Spongberg AL, Witter JD. Adsorption and Degradation of Triclosan and Triclocarban in Soils and Biosolids-Amended Soils. *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57: 4900–4905.

Wu J-L, Lam NP, Martens D, Kettrup A, Cai Z. Triclosan determination in water related to wastewater treatment. *Talanta* 2007; 72: 1650–1654.

X

Xie Z, Li H, Wang K, Lin J, Wang Q, Zhao G, et al. Analysis of transcriptome and metabolome profiles alterations in fatty liver induced by high-fat diet in rat. *Metabolism* 2010; 59: 554–560.

Xin P, Han H, Gao D, Cui W, Yang X, Ying C, et al. Alleviative effects of resveratrol on nonalcoholic fatty liver disease are associated with up regulation of hepatic low density lipoprotein receptor and scavenger receptor class B type I gene expressions in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2013; 52: 12–18.

Xu C, Li CY-T, Kong A-NT. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.* 2005; 28: 249–268.

Xue N, Li F, Hou H, Li B. Occurrence of endocrine-disrupting pesticide residues in wetland sediments from Beijing, China. *Environ. Toxicol. Chem.* 2008; 27: 1055–1062.

Xue X, Feng CY, Hixson SM, Johnstone K, Anderson DM, Parrish CC, et al. Characterization of the fatty acyl elongase (elovl) gene family, and hepatic elovl and delta-6 fatty acyl desaturase transcript expression and fatty acid responses to diets containing camelina oil in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 2014; 175: 9–22.

Y

Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2007; 45: 1366–1374.

Yamaguchi M. Regucalcin, a novel regulatory protein implicated in obesity and diabetes. *Integr Mol Med* 2014

Yang W, Qi Y, Bi K, Fu J. Toward understanding the genetic basis of adaptation to high-elevation life in poikilothermic species: a comparative transcriptomic analysis of two ranid frogs, *Rana chensinensis* and *R. kukunoris*. *BMC Genomics* 2012; 13: 588.

Yang X, Baumann PC. Biliary PAH metabolites and the hepatosomatic index of brown bullheads from Lake Erie tributaries. *Ecol. Indic.* 2006; 6: 567–574.

Ying G-G, Kookana RS. Triclosan in wastewaters and biosolids from Australian wastewater treatment plants. *Environ. Int.* 2007a; 33: 199–205.

Ying G-G, Yu X-Y, Kookana RS. Biological degradation of triclocarban and triclosan in a soil under aerobic and anaerobic conditions and comparison with environmental fate modelling. *Environ. Pollut.* 2007b; 150: 300–305.

Yin H-Q, Kim M, Kim J-H, Kong G, Kang K-S, Kim H-L, et al. Differential gene expression and lipid metabolism in fatty liver induced by acute ethanol treatment in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007; 223: 225–233.

Yoneda M, Hotta K, Nozaki Y, Endo H, Uchiyama T, Mawatari H, et al. Association between PPARGC1A polymorphisms and the occurrence of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). *BMC Gastroenterol.* 2008; 8: 27.

Younossi ZM, Afendy A, Stepanova M, Hossain N, Younossi I, Ankras K, et al. Gene expression profile associated with superimposed non-alcoholic fatty liver disease and hepatic fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Liver Int.* 2009; 29: 1403–1412.

Yu C-P, Chu K-H. Occurrence of pharmaceuticals and personal care products along the West Prong Little Pigeon River in east Tennessee, USA. *Chemosphere* 2009; 75: 1281–1286.

Yunker MB, Macdonald RW, Vingarzan R, Mitchell RH, Goyette D, Sylvestre S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. *Org. Geochem.* 2002; 33: 489–515.

Yurdakök M. Neonatal medicine in ancient art. *Turk. J. Pediatr.* 2010; 52: 218.

Z

Zhang C, Liu X, Wu D, Liu G, Tao L, Fu W, et al. Teratogenic effects of organic extracts from the Pearl River sediments on *Xenopus laevis* embryos. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014; 37: 202–209.

Zhang L, Wang M-H, Hu J, Ho Y-S. A review of published wetland research, 1991-2008: Ecological engineering and ecosystem restoration. *Ecol. Eng.* 2010; 36: 973–980.

Zhang S, Zhang Q, Darisaw S, Ehie O, Wang G. Simultaneous quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in Mississippi river water, in New Orleans, Louisiana, USA. *Chemosphere* 2007; 66: 1057–1069.

Zhang X, Pan Y, Yu C, Xu C, Xu L, Li Y, et al. PDIA3 Knockdown Exacerbates Free Fatty Acid-Induced Hepatocyte Steatosis and Apoptosis. *PLoS ONE* 2015; 10: e0133882.

Zheng D, Kille P, Feeney GP, Cunningham P, Handy RD, Hogstrand C. Dynamic transcriptomic profiles of zebrafish gills in response to zinc depletion. *BMC Genomics* 2010a; 11: 548.

Zheng D, Kille P, Feeney GP, Cunningham P, Handy RD, Hogstrand C. Dynamic transcriptomic profiles of zebrafish gills in response to zinc supplementation. *BMC Genomics* 2010b; 11: 553.

Zhou JL, Maskaoui K. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and surface sediments from Daya Bay, China. *Environ. Pollut.* 2003; 121: 269–281.

Zhu L, Chen B, Wang J, Shen H. Pollution survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water of Hangzhou, China. *Chemosphere* 2004; 56: 1085–1095.

Zhuo L, Gong J, Yang R, Sheng Y, Zhou L, Kong X, et al. Inhibition of proliferation and differentiation and promotion of apoptosis by cyclin L2 in mouse embryonic carcinoma P19 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009; 390: 451–457.

Zimmerman. Operation and maintenance of *Xenopus tropicalis*. Zimmerman Lab. - Div. Dev. Biol. - Natl. Inst. Med. Res. 2010

Zug GR. Anuran Locomotion: Fatigue and Jumping Performance. *Herpetologica* 1985; 41: 188–194.

Annexe I : Genes hépatiques différentiellement transcrits chez les femelles exposées au BaP (10 µg.L⁻¹)

ANNEXE I – BaP, 10 µg.L⁻¹ (1/6)

Ensembl		Description	Ratio de transcription			
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>		6h	12h	18h	24h
ENSXETG00000020010	ENSG00000116133	24-Dehydrocholesterol Reductase	0,43	7,03	2,64	0,48
ENSXETG00000005084	ENSG00000113161	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa Reductase	0,38	7,81	3,76	0,91
ENSXETG00000018121	ENSG00000170525	6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3	1,23	12,60	0,30	0,68
ENSXETG00000008945	ENSG00000172893	7-Dehydrocholesterol Reductase	0,60	1,79	5,44	0,82
ENSXETG00000009441	ENSG00000168792	Abhydrolase Domain Containing 15	0,68	4,15	1,56	1,17
ENSXETG00000001210	ENSG00000081760	Acetoacetyl-Coa Synthetase	0,27	2,87	0,82	0,25
ENSXETG00000021417	ENSG00000159251	Actin, Alpha 1, Skeletal Muscle	0,05	0,93	0,13	0,01
ENSXETG00000025296	ENSG00000077522	Actinin, Alpha 2	0,03	1,07	→ 0	→ 0
ENSXETG00000004291	ENSG00000131069	Acyl-Coa Synthetase Short-Chain Family Member 2, Gene 2	0,26	3,55	0,78	0,56
ENSXETG00000010118	ENSG00000114948	Adam Metallopeptidase Domain 23	0,12	1,45	2,46	0,42
ENSXETG00000013631	ENSG00000154734	Adam Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif, 1	0,35	19,09	1,05	2,43
ENSXETG00000008725	ENSG00000179674	Adp-Ribosylation Factor-Like 14	0,53	10,33	1,26	0,29
ENSXETG00000011551	ENSG00000144908	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family, Member L1	1,57	0,21	0,33	1,67
ENSXETG00000024696	ENSG00000180772	Angiotensin 2 Receptor, Type 2	0,53	3,09	0,44	0,52
ENSXETG00000019317		Apolipoprotein E	3,33	0,76	1,60	1,19
ENSXETG00000027309		Apolipoprotein L Domain Containing 1	0,05	4,14	0,39	0,27
ENSXETG00000007373	ENSG00000142920	Arginine Decarboxylase	0,16	16,77	0,27	0,75
ENSXETG00000025707	ENSG00000070669	Asparagine Synthetase (Glutamine-Hydrolyzing)	0,27	2,34	0,50	0,44
ENSXETG00000009695	ENSG00000196296	Atpase, Ca++ Transporting, Cardiac Muscle, Fast Twitch 1	→ 0	3,56	0,05	0,07
ENSXETG00000019779	ENSG00000113916	B-Cell Cll/Lymphoma 6	0,34	1,67	0,91	0,72
ENSXETG00000004542	ENSG000000095739	Bmp And Activin Membrane-Bound Inhibitor	0,74	6,25	0,89	1,34
ENSXETG00000004284	ENSG00000176697	Brain-Derived Neurotrophic Factor	1,86	8,91	1,31	0,93
ENSXETG00000022556	ENSG00000184887	Btb (Poz) Domain Containing 6	1,34	4,45	1,30	1,85
ENSXETG00000011838	ENSG00000159388	Btg Family, Member 2	0,55	16,76	0,55	0,85
ENSXETG00000025992	ENSG00000062038	Cadherin 3, Type 1, P-Cadherin (Placental)	0,15	0,97	0,13	0,62
ENSXETG00000031224		Cadherin-Related Family Member 4	0,16	1,32	0,32	1,16
ENSXETG00000015130	ENSG00000081248	Calcium Channel, Voltage-Dependent, L Type, Alpha 1S Subunit	0,88	11,75	0,98	0,22
ENSXETG00000006824	ENSG00000006283	Calcium Channel, Voltage-Dependent, T Type, Alpha 1G Subunit	0,40	1,84	3,53	0,11
ENSXETG00000021881	ENSG00000152611	Calcyphosine	0,39	1,46	1,11	0,26
ENSXETG00000007561	ENSG00000121691	Catalase, Gene 1	0,60	0,64	1,08	4,21
ENSXETG00000010820		Cd200 Receptor 1	0,37	15,31	0,59	0,33
ENSXETG00000004642	ENSG00000179604	Cdc42 Effector Protein (Rho Gtpase Binding) 4	0,66	3,35	1,23	0,78
ENSXETG00000006911	ENSG00000100307	Chromobox Homolog 7	1,58	3,99	0,74	0,60
ENSXETG00000021242	ENSG00000157870	Chromosome 1 Open Reading Frame 93	0,38	1,90	0,29	0,13
ENSXETG00000006115	ENSG00000133935	Chromosome 14 Open Reading Frame 1	0,48	6,94	4,63	0,51
ENSXETG00000001420	ENSG00000164251	Coagulation Factor Ii (Thrombin) Receptor-Like 1	0,75	8,36	0,65	0,34
ENSXETG00000009505	ENSG00000135469	Coenzyme Q10 Homolog A	0,93	7,51	1,36	0,88
ENSXETG00000016239	ENSG00000060138	Cold Shock Domain Protein A	0,11	1,55	0,10	0,21
ENSXETG00000004773	ENSG00000049089	Collagen, Type Ix, Alpha 2	1,66	1,57	Inf	0,01
ENSXETG00000013748		Complement Factor Properdin	0,88	1,14	3,25	1,70
ENSXETG00000008492	ENSG00000138433	Corepressor Interacting With Rbpj, 1	3,29	0,91	1,69	1,38
ENSXETG00000007453	ENSG00000107611	Cubilin (Intrinsic Factor-Cobalamin Receptor)	0,34	9,52	0,92	0,72
ENSXETG00000017379	ENSG00000221978	Cyclin L2	0,62	4,28	0,50	0,77
ENSXETG00000004234		Cysteine-Serine-Rich Nuclear Protein 1	0,59	3,72	1,63	1,40
ENSXETG00000009054	ENSG00000166394	Cytochrome B5 Reductase 2	0,51	3,31	2,44	0,95
ENSXETG00000031264		Cytochrome P450 2K1-like	0,55	2,17	0,32	0,37
ENSXETG00000021546	ENSG00000003137	Cytochrome P450, Family 26, Subfamily B, Polypeptide 1	0,29	1,71	0,54	1,10
ENSXETG00000003432	ENSG00000001630	Cytochrome P450, Family 51, Subfamily A, Polypeptide 1	0,31	31,84	6,52	0,33
ENSXETG00000016211	ENSG00000073737	Dehydrogenase/Reductase (Sdr Family) Member 9	0,36	3,17	0,40	0,69
ENSXETG00000026976	ENSG00000168209	Dna-Damage-Inducible Transcript 4	0,43	4,08	0,74	1,58
ENSXETG00000025659	ENSG00000108176	Dnaj (Hsp40) Homolog, Subfamily C, Member 12	4,36	0,39	0,61	2,01
ENSXETG00000013658	ENSG00000104885	Dot1-Like, Histone H3 Methyltransferase	0,84	3,52	1,05	0,99

ANNEXE I (suite) – BaP, 10 µg.L⁻¹ (2/6)

Ensembl		Description	Ratio de transcription			
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>		6h	12h	18h	24h
ENSXETG00000027880	ENSG00000120129	Dual Specificity Phosphatase 1	0,37	6,06	0,59	1,51
ENSXETG00000002699	ENSG00000143507	Dual Specificity Phosphatase 10, Gene 1	0,32	9,41	0,84	0,58
ENSXETG00000025251	ENSG00000007174	dynein, axonemal, heavy chain 17	0,15	1,43	1,15	1,82
ENSXETG00000006697	ENSG00000120738	Early Growth Response 1	0,81	3,40	0,30	0,76
ENSXETG00000030591	ENSG00000187097	Ectonucleoside Triphosphate Diphosphohydrolase 5	1,50	1,10	0,18	0,20
ENSXETG00000015994	ENSG00000012660	Elovl Fatty Acid Elongase 5	0,55	3,50	0,90	0,35
ENSXETG00000015682	ENSG00000123179	Emopamil Binding Protein-Like	0,49	4,38	2,41	0,78
ENSXETG00000031904		Epithelial Mitogen Homolog	0,31	0,63	0,29	0,15
ENSXETG00000003193		Eps8-Like 1	1,03	4,96	0,85	0,79
ENSXETG00000002019		EPS8-like 3	1,08	0,76	0,13	0,69
ENSXETG00000003453		Family With Sequence Similarity 43, Member A	0,86	3,24	1,64	1,30
ENSXETG00000020683	ENSG00000158246	Family With Sequence Similarity 46, Member B	0,86	3,20	1,20	0,55
ENSXETG00000033587	ENSG00000079459	Farnesyl-Diphosphate Farnesyltransferase 1	1,01	3,38	2,43	1,06
ENSXETG00000019666	ENSG00000169710	Fatty Acid Synthase	0,13	4,53	0,58	0,38
ENSXETG00000013238	ENSG00000170345	Fbj Murine Osteosarcoma Viral Oncogene Homolog	1,02	12,05	0,59	0,44
ENSXETG00000023228	ENSG00000156804	F-Box Protein 32	1,93	4,04	1,33	1,26
ENSXETG00000012604		Fc receptor-like protein 5-like	0,04	0,01	Inf	1,18
ENSXETG00000001839	ENSG00000137460	Fh2 Domain Containing 1	1,84	4,33	1,08	1,34
ENSXETG00000000391	ENSG00000085265	Ficolin (Collagen/Fibrinogen Domain Containing) 1	1,75	9,45	0,94	2,79
ENSXETG00000000393	ENSG00000142748	Ficolin (Collagen/Fibrinogen Domain Containing) 3 (Hakata Antigen)	2,27	1,87	0,07	3,42
ENSXETG000000024910	ENSG00000085265	Ficolin (Collagen/Fibrinogen Domain Containing) 3 (Hakata Antigen)	1,23	3,59	0,72	3,72
ENSXETG00000010208	ENSG00000075426	Fos-Like Antigen 2	0,71	4,19	0,66	0,85
ENSXETG00000015196	ENSG00000119737	G Protein-Coupled Receptor 75	0,32	10,01	1,23	1,10
ENSXETG000000026112	ENSG00000121742	Gap Junction Protein, Beta 2, 26Kda	0,47	4,06	0,94	0,42
ENSXETG000000025742		Gastric Intrinsic Factor (Vitamin B Synthesis)	0,08	9,08	0,84	0,31
ENSXETG00000006712		Gdnf Family Receptor Alpha 3	0,89	4,14	1,79	1,20
ENSXETG00000024588	ENSG00000131482	Glucose-6-Phosphatase, Catalytic (Glycogen Storage Disease Type I, Von Gierke Disease)	0,66	5,56	0,36	1,68
ENSXETG00000029928	ENSG00000180447	Growth Arrest-Specific 1	2,10	3,20	2,47	3,90
ENSXETG00000000578	ENSG00000161835	Grp1 (General Receptor For Phosphoinositides 1)-Associated Scaffold Protein	0,60	3,25	0,48	1,59
ENSXETG00000015094	ENSG00000117226	Guanylate Binding Protein 3	0,88	3,93	0,94	0,34
ENSXETG00000024078	ENSG00000204389	Heat Shock 70Kda Protein	0,16	4,46	1,63	2,43
ENSXETG00000016838	ENSG00000044574	Heat Shock 70Kda Protein 5 (Glucose-Regulated Protein, 78Kda)	0,20	2,12	0,79	0,33
ENSXETG00000000251	ENSG00000100292	Heme Oxygenase (Decycling) 1	0,31	1,61	0,59	0,77
ENSXETG00000032918		Hepcidin 1	0,80	0,82	0,24	0,76
ENSXETG00000032192		Hepcidin antimicrobial peptide 2	1,54	0,95	0,08	0,43
ENSXETG00000008520	ENSG00000159399	Hexokinase Domain Containing 1	0,42	3,90	0,61	0,64
ENSXETG00000012078	ENSG00000049239	Hexose-6-Phosphate Dehydrogenase (Glucose 1-Dehydrogenase)	0,95	1,26	0,58	0,33
ENSXETG00000007330	ENSG00000068001	Hyaluronoglucosaminidase 2	0,51	4,36	0,72	0,94
ENSXETG00000014837	ENSG00000130948	Hydroxysteroid (17-Beta) Dehydrogenase 3	1,22	0,21	1,68	6,60
ENSXETG00000028047		Hypothetical Loc548368	0,56	1,68	0,24	0,33
ENSXETG000000008798	ENSG00000197838	Hypothetical Loc548374	0,23	1,64	0,74	0,63
ENSXETG00000026169		Hypothetical Protein Loc100124841	0,32	1,60	0,57	0,56
ENSXETG00000005274		Hypothetical Protein Loc100145027	0,15	2,07	2,23	0,60
ENSXETG00000032865		Hypothetical protein LOC100145035	0,77	1,60	0,28	0,41
ENSXETG00000019559	ENSG00000138109	Hypothetical Protein Loc100145541	0,71	3,81	13,28	0,96
ENSXETG00000034352		Hypothetical protein LOC100170421	2,13	2,14	0,27	1,87
ENSXETG00000009862		Hypothetical protein LOC100491753	NA	→ 0	→ 0	Inf
ENSXETG00000028052		Hypothetical protein LOC594886	1,11	22,96	→ 0	→ 0
ENSXETG00000000295		Hypothetical Protein Mgc147475	14,89	1,22	0,98	1,80
ENSXETG00000004761		Hypothetical Protein Mgc154328	52,45	0,20	0,59	0,29
ENSXETG00000010075	ENSG00000149428	Hypoxia Up-Regulated 1	0,56	1,64	1,19	0,37
ENSXETG00000024931		immunoglobulin lambda locus	0,80	1,08	0,26	0,44
ENSXETG00000004488		Immunoresponsive Gene 1	0,32	7,48	2,35	1,16
ENSXETG00000026030		Indolethylamine N-methyltransferase	0,08	0,33	0,02	0,30
ENSXETG00000017149		Inhibin, Beta C, Gene 1	1,13	2,60	0,88	0,30
ENSXETG00000022603	ENSG00000143772	Inositol-Trisphosphate 3-Kinase B	0,65	3,97	1,00	0,77
ENSXETG00000002580	ENSG00000086544	Inositol-Trisphosphate 3-Kinase C	0,73	4,03	0,64	0,69
ENSXETG00000013492	ENSG00000186480	Insulin Induced Gene 1	0,59	11,19	0,95	0,92
ENSXETG00000002647	ENSG00000185950	Insulin Receptor Substrate 2	1,04	6,33	1,89	2,12
ENSXETG00000015656		Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 1	14,20	0,75	0,71	4,06
ENSXETG00000022049	ENSG00000077009	Integrin Beta 1 Binding Protein 3	5,90	1,29	0,92	0,50
ENSXETG00000004766	ENSG00000171223	Jun B Proto-Oncogene	1,45	6,08	0,44	0,69
ENSXETG00000006441	ENSG00000130522	Jun D Proto-Oncogene	0,45	17,70	0,79	0,77
ENSXETG00000011124	ENSG00000177606	Jun Proto-Oncogene	0,58	10,30	0,63	1,03

ANNEXE I (suite) – BaP, 10 µg.L⁻¹ (3/6)

Ensembl		Description	Ratio de transcription			
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>		6h	12h	18h	24h
ENSXETG00000013849	ENSG00000114796	Kelch-Like 24	3,26	1,45	1,04	1,57
ENSXETG00000016903		Kh And Nyn Domain Containing	1,63	6,14	0,48	1,74
ENSXETG00000012138	ENSG00000130294	Kinesin Family Member 1A	0,49	9,05	0,90	0,70
ENSXETG00000004486	ENSG00000168280	Kinesin Family Member 5C	12,43	0,60	1,81	4,27
ENSXETG00000012812	ENSG00000134962	Klotho Beta	0,96	3,37	1,01	1,22
ENSXETG00000011549	ENSG00000163884	Kruppel-Like Factor 15	2,55	5,08	0,86	1,36
ENSXETG00000002075	ENSG00000127528	Kruppel-Like Factor 2 (Lung)	0,50	2,87	0,77	0,71
ENSXETG00000008940	ENSG00000196878	Laminin, Beta 3	0,59	2,66	0,73	0,23
ENSXETG00000004899	ENSG00000160285	Lanosterol Synthase (2,3-Oxidossalene-Lanosterol Cyclase)	0,34	6,27	2,10	0,43
ENSXETG00000025739	ENSG00000149150	Large Neutral Amino Acids Transporter Small Subunit 3	2,35	6,28	1,36	0,42
ENSXETG00000020359	ENSG00000169744	Lim Domain Binding 2	0,77	0,75	4,00	0,15
ENSXETG00000012042	ENSG00000079435	Lipase, Hormone-Sensitive	0,48	9,32	1,11	1,16
ENSXETG00000030962	ENSG00000175556	Lon Peptidase N-Terminal Domain And Ring Finger 3	1,09	2,84	1,20	0,66
ENSXETG00000009352	ENSG00000130164	Low Density Lipoprotein Receptor	0,40	4,65	1,44	0,64
ENSXETG00000000682		L-Threonine Dehydrogenase	4,41	1,19	0,58	0,90
ENSXETG00000001185	ENSG00000168389	Major Facilitator Superfamily Domain Containing 2A	1,12	11,24	1,02	0,83
ENSXETG00000009077		Major histocompatibility complex class I-related gene protein-like	5,18	NA	0,19	1,19
ENSXETG00000025590		Major Histocompatibility Complex, Class Ii, Dq Alpha 2	1,41	4,15	0,54	0,55
ENSXETG00000010902	ENSG00000118242	Melanoregulin	0,24	9,90	1,00	0,56
ENSXETG00000009229	ENSG00000176845	Meteorin, Glial Cell Differentiation Regulator-Like	0,50	2,84	0,84	0,96
ENSXETG00000000914	ENSG00000052802	Methylsterol Monooxygenase 1	0,16	54,67	3,25	0,32
ENSXETG00000002723		Mgc107876 Protein	0,83	1,88	1,08	0,31
ENSXETG00000000851	ENSG00000241644	Mgc107884 Protein	303,1	Inf	1,18	Inf
ENSXETG00000032982	ENSG00000196091	Myosin Binding Protein C, Slow Type	0,10	1,41	→ 0	→ 0
ENSXETG00000032275	ENSG00000197616	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic	→ 0	2,99	0,07	0,29
ENSXETG00000016248	ENSG00000125414	Myosin, Heavy Chain 4, Skeletal Muscle	0,03	2,90	0,26	0,44
ENSXETG00000003242	ENSG00000198336	Myosin, Light Chain 4, Alkali; Atrial, Embryonic	0,02	0,68	0,18	→ 0
ENSXETG00000006612	ENSG00000188611	N-Acylsphingosine Amidohydrolase (Non-Lysosomal Ceramidase) 2	1,89	0,88	18,53	0,49
ENSXETG00000009648	ENSG00000007952	Nadph Oxidase 1	0,71	4,91	1,18	1,06
ENSXETG00000004531	ENSG00000183091	Nebulin	0,01	1,00	0,22	→ 0
ENSXETG000000018160	ENSG00000173848	Neuroepithelial Cell Transforming 1	0,58	6,47	0,60	0,83
ENSXETG00000019618	ENSG00000171246	Neuronal Pentraxin 1	1,41	0,19	7,79	8,35
ENSXETG00000030367		NLR family, apoptosis inhibitory protein	0,41	2,16	0,22	1,05
ENSXETG00000010327	ENSG00000103202	Non-Metastatic Cells 4, Protein Expressed In	0,20	6,01	0,52	0,60
ENSXETG00000028096		Novel Protein Similar To Pqlc2	2,38	0,30	1,14	4,14
ENSXETG00000000804	ENSG00000165030	Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated	0,56	4,62	0,38	0,63
ENSXETG000000031753	ENSG00000153234	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2	0,30	28,18	0,74	4,66
ENSXETG00000000579	ENSG00000123358	Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A, Member 1	0,31	10,62	0,71	1,88
ENSXETG000000018715	ENSG00000102837	Olfactomedin 4	0,55	1,81	0,43	0,23
ENSXETG00000003519	ENSG00000115758	Ornithine Decarboxylase 1	0,84	5,97	0,66	0,80
ENSXETG00000011667	ENSG00000099260	Palmelphin	1,05	1,12	1,19	0,34
ENSXETG000000004865		Patatin-Like Phospholipase Domain Containing 3	1,46	0,55	1,06	3,36
ENSXETG00000020468	ENSG00000109819	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma, Coactivator 1 Alpha	2,33	4,39	0,92	1,07
ENSXETG00000011266	ENSG00000124253	Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1 (Soluble)	4,57	3,03	12,18	5,01
ENSXETG00000013321	ENSG00000139289	Pleckstrin Homology-Like Domain, Family A, Member 1	0,06	9,11	0,63	0,10
ENSXETG00000009243	ENSG00000110400	Poliavirus Receptor-Related 1 (Herpesvirus Entry Mediator C)	0,53	3,76	1,06	0,73
ENSXETG000000018041	ENSG00000156113	Potassium Large Conductance Calcium-Activated Channel, Subfamily M, Alpha Member 1	24,28	17,41	1,41	1,36
ENSXETG000000032142		Probable alpha-ketoglutarate-dependent hypophosphite dioxxygenase-like	NA	13,89	NA	NA
ENSXETG00000005657	ENSG00000181195	Proenkephalin	0,55	6,87	0,62	0,52
ENSXETG00000016592	ENSG00000204264	Proteasome (Prosome, Macropain) Subunit, Beta Type, 8 (Large Multifunctional Peptidase 7)	3,07	0,87	1,25	0,73
ENSXETG00000020984	ENSG00000119938	Protein Phosphatase 1, Regulatory (Inhibitor) Subunit 3C, Gene 1	0,81	1,14	0,58	0,27
ENSXETG00000017404		Proteoglycan 4	0,87	Inf	0,48	1,04
ENSXETG00000024793	ENSG00000078589	Purinergic Receptor P2Y, G-Protein Coupled, 10	1,47	1,52	0,28	0,28
ENSXETG00000001907		Putative ortholog of apoptosis-associated speck-like protein, 1 of 1	0,18	8,90	0,05	0,60
ENSXETG00000012512	ENSG00000135821	Putative Ortholog Of Glutamine Synthetase (Ec 6.3.1.2) (Glutamate--Ammonia Ligase) (Gs), 1 Of 1	1,01	3,76	1,77	1,45
ENSXETG00000004635	ENSG00000170412	Putative Ortholog Of G-Protein Coupled Receptor Family C Group 5 Member C Precursor (Retinoic Acid Induced Gene 3 Protein) (Raig-3)	0,53	4,36	0,83	0,87
ENSXETG00000002422	ENSG00000117479	Putative Ortholog Of Thiamine Transporter 1 (Solute Carrier Family 19 (Thiamine Transporter), Member 2) (High Affinity Thiamine Transporter Thtr-1) (High-Affinity Thiamin Transporter), 1 Of 1	0,76	3,02	0,62	0,80
ENSXETG00000010800	ENSG00000128311	Putative Ortholog Of Zinc Finger Protein 133, 1 Of 2	0,40	2,95	5,57	1,93
ENSXETG00000004489		Putative Transmembrane Protein Ta-2	0,46	57,43	0,69	1,04
ENSXETG00000017419	ENSG00000172840	Pyruvate Dehydrogenase Phosphatase Catalytic Subunit 2	0,31	6,43	0,50	0,38
ENSXETG00000008055	ENSG00000169213	Rab3B, Member Ras Oncogene Family	0,41	1,34	0,27	0,15

ANNEXE I (suite) – BaP, 10 µg.L⁻¹ (4/6)

Ensembl		Description	Ratio de transcription			
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>		6h	12h	18h	24h
ENSXETG00000020565		Ras And Rab Interactor 1	0,15	2,56	0,71	0,48
ENSXETG0000006038		Ras Association (Rallds/AF-6) Domain Family (N-Terminal) Member 7	0,72	3,36	1,09	1,00
ENSXETG00000026772	ENSG00000143878	Ras Homolog Gene Family, Member B	0,46	3,97	1,20	0,95
ENSXETG0000002589	ENSG00000116574	Ras Homolog Gene Family, Member U	0,65	3,57	0,77	1,12
ENSXETG0000005738	ENSG00000108551	Ras, Dexamethasone-Induced 1	0,64	3,30	1,02	1,04
ENSXETG00000011677	ENSG00000128045	Ras-Like, Family 11, Member B	0,78	3,98	1,17	1,06
ENSXETG00000017408	ENSG00000166592	Ras-Related Associated With Diabetes	→ 0	NA	0,03	1,16
ENSXETG00000010347		Ras-Related Protein Ras-Dva	1,00	4,68	0,85	0,92
ENSXETG0000005674	ENSG00000090104	Regulator Of G-Protein Signaling 1	0,49	3,02	0,50	0,89
ENSXETG0000005675	ENSG00000116741	Regulator Of G-Protein Signaling 2, 24Kda	0,35	4,92	0,60	0,71
ENSXETG0000003124	ENSG00000072422	Rho-Related Btb Domain Containing 1	1,35	9,69	0,93	1,83
ENSXETG0000002837	ENSG00000123091	Ring Finger Protein 11	1,32	2,90	1,09	0,95
ENSXETG00000015914	ENSG00000163602	Ring1 And Yy1 Binding Protein	3,52	2,08	1,78	1,05
ENSXETG00000024618	ENSG00000112183	Rna Binding Motif Protein 24	0,61	6,32	0,72	0,42
ENSXETG00000027956	ENSG00000131795	Rna Binding Motif Protein 8A	1,56	0,90	2,85	2,63
ENSXETG00000013685	ENSG00000142178	Salt-Inducible Kinase 1	1,27	3,27	0,94	1,10
ENSXETG00000015448	ENSG00000106366	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1), Member 1	0,37	3,14	1,19	0,72
ENSXETG00000028081	ENSG00000135919	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade E (Nexin, Plasminogen Activator Inhibitor Type 1), Member 2	0,75	1,11	3,34	0,81
ENSXETG00000000124	ENSG00000118515	Serum/Glucocorticoid Regulated Kinase 1	0,37	3,97	0,93	0,74
ENSXETG00000020657	ENSG00000130766	Sestrin 2	0,86	2,94	0,84	0,68
ENSXETG00000020096	ENSG00000181788	Seven In Absentia Homolog 2	0,56	3,27	1,19	1,02
ENSXETG00000025608		Shisa	0,04	NA	0,57	Inf
ENSXETG00000003580	ENSG00000184860	Short Chain Dehydrogenase/Reductase Family 42E, Member 1	0,56	5,53	0,97	0,67
ENSXETG00000003122	ENSG00000204099	Sialidase 4	15,78	0,13	→ 0	0,63
ENSXETG00000017639	ENSG00000117394	Solute Carrier Family 2 (Facilitated Glucose Transporter), Member 1	0,94	5,10	1,74	0,91
ENSXETG00000015362	ENSG00000177542	Solute Carrier Family 25 (Mitochondrial Carrier: Glutamate), Member 22	0,63	3,63	0,99	0,96
ENSXETG00000007731	ENSG00000148339	Solute Carrier Family 25 (Mitochondrial Carrier; Phosphate Carrier), Member 25	1,83	3,77	1,52	2,33
ENSXETG00000014662	ENSG00000134294	Solute Carrier Family 38, Member 2	0,79	5,11	0,35	0,70
ENSXETG00000028021	ENSG00000111181	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Betaine/Gaba), Member 12	0,29	2,31	0,58	0,67
ENSXETG00000003268	ENSG00000196517	Solute Carrier Family 6 (Neurotransmitter Transporter, Glycine), Member 9	0,94	1,29	0,86	0,28
ENSXETG00000003335	ENSG00000151012	Solute Carrier Family 7 (Anionic Amino Acid Transporter Light Chain, Xc-System), Member 11	0,57	6,41	0,17	0,48
ENSXETG00000005526	ENSG00000165349	Solute Carrier Family 7 (Cationic Amino Acid Transporter, Y+ System), Member 3	0,75	4,15	0,55	0,83
ENSXETG00000030115	ENSG00000164651	Sp8 Transcription Factor	26,71	0,11	0,29	2,33
ENSXETG00000030204	ENSG00000196104	Spar/Osteonectin, Cwcv And Kazal-Like Domains Proteoglycan (Testican) 3	0,17	2,35	0,87	0,41
ENSXETG00000019540		Sphingosine Kinase 1	1,31	1,22	4,03	1,06
ENSXETG00000027011	ENSG00000175898	Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2	0,39	4,90	0,48	0,41
ENSXETG00000001822	ENSG00000167778	Spry Domain Containing 3	0,89	3,33	1,21	0,87
ENSXETG00000023050	ENSG00000104549	Squalene Epoxidase	0,17	376,0	13,02	0,11
ENSXETG00000027411		Src-Like-Adaptor 2	1,02	6,02	0,61	0,94
ENSXETG00000022348	ENSG00000125398	Sry (Sex Determining Region Y)-Box 9	0,62	5,34	1,33	2,80
ENSXETG00000023757	ENSG00000099194	Stearoyl-Coa Desaturase (Delta-9-Desaturase)	0,35	2,90	0,28	0,24
ENSXETG00000017449	ENSG00000198911	Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 2	0,63	4,18	1,43	0,80
ENSXETG00000014385		Sulfotransferase Family, Cytosolic, 2B, Member 1	0,28	0,78	1,81	1,57
ENSXETG00000011569	ENSG00000157703	Svop-Like	3,12	0,74	1,40	0,64
ENSXETG00000018016	ENSG00000147642	Syntaxin (Syntaxin-Interacting)	1,57	3,46	0,56	0,25
ENSXETG00000024859	ENSG00000168952	Syntaxin Binding Protein 6 (Amisyn)	0,81	4,85	1,17	1,12
ENSXETG00000032967	ENSG00000227729	Tdrd9 Antisense Rna 1 (Non-Protein Coding)	→ 0	1,65	1,36	1,32
ENSXETG00000030354	ENSG00000131746	Tensin 4	0,94	4,52	0,57	0,74
ENSXETG00000025010	ENSG00000177426	Tgfb-Induced Factor Homeobox 1	1,27	4,78	0,93	1,59
ENSXETG00000015845	ENSG00000196511	Thiamin Pyrophosphokinase 1	1,16	0,89	0,27	0,45
ENSXETG00000011217	ENSG00000137801	Thrombospondin 1	0,91	3,83	0,99	1,08
ENSXETG00000021603		Thy-1 cell surface antigen	0,73	Inf	1,18	1,16
ENSXETG00000032447		Thyroid Hormone Responsive	0,71	0,93	3,47	0,89
ENSXETG00000015144	ENSG00000173991	Titin-Cap (Telethonin)	0,02	1,22	0,32	→ 0
ENSXETG00000012114		Tnfrsf3 Interacting Protein 2	0,52	7,81	0,68	2,31
ENSXETG00000012540		Torsin Family 3, Member A	0,38	4,50	0,64	0,23
ENSXETG00000012403	ENSG00000072315	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily C, Member 5	7,28	0,13	0,71	0,58
ENSXETG00000001048	ENSG00000119121	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily M, Member 6	16,88	1,71	0,14	0,87
ENSXETG00000005788	ENSG00000167723	Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily V, Member 3	2,16	0,73	1,96	0,07
ENSXETG00000014770		Transmembrane 4 L Six Family Member 20	6,31	1,03	0,17	0,28

ANNEXE I (suite) – BaP, 10 µg.L⁻¹ (5/6)

Ensembl		Description	Ratio de transcription			
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>		6h	12h	18h	24h
ENSXETG00000019603		Transmembrane Protein 52	0,93	3,77	1,21	0,91
ENSXETG00000000345	ENSG00000159713	Tubulin Polymerization-Promoting Protein Family Member 3	0,12	1,63	0,37	0,70
ENSXETG00000023069	ENSG00000156414	Tudor Domain Containing 9	0,09	2,11	0,92	1,25
ENSXETG00000026658	ENSG00000181634	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily, Member 15	0,83	15,84	1,29	0,93
ENSXETG00000032568		Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 9	1,27	0,82	10,35	0,55
ENSXETG00000019471	ENSG00000078804	Tumor Protein P53 Inducible Nuclear Protein 2	0,49	3,09	1,23	1,00
ENSXETG00000021547	ENSG00000036672	Ubiquitin Specific Peptidase 2	0,77	5,48	0,49	0,59
ENSXETG00000017935	ENSG00000135220	Udp Glucuronosyltransferase 2 Family, Polypeptide A1, Complex Locus	0,60	3,41	0,94	0,86
ENSXETG00000022063	ENSG00000158089	Udp-N-Acetyl-Alpha-D-Galactosamine:Polypeptide N-Acetylgalactosaminyltransferase 14 (Galnac-T14)	1,01	1,21	0,57	0,26
ENSXETG00000000392	ENSG00000085265	Uncharacterized Protein	4,80	10,07	0,25	6,26
ENSXETG00000000395		Uncharacterized Protein	1,21	3,75	0,33	3,85
ENSXETG000000001416	ENSG00000196188	Uncharacterized Protein	0,93	0,55	1,37	4,28
ENSXETG00000001861	ENSG00000122641	Uncharacterized Protein	0,34	2,26	1,14	0,33
ENSXETG00000004496		Uncharacterized Protein	1,09	69,07	1,18	6,99
ENSXETG00000004942		Uncharacterized Protein	28,17	0,77	0,94	0,78
ENSXETG00000006099		Uncharacterized Protein	0,10	1,31	0,43	2,22
ENSXETG00000006109		Uncharacterized Protein	3,27	1,09	4,17	1,95
ENSXETG00000006335	ENSG00000128310	Uncharacterized Protein	0,08	0,09	0,13	1,02
ENSXETG00000007433	ENSG00000004846	Uncharacterized Protein	2,38	0,17	1,86	4,66
ENSXETG000000011542		Uncharacterized Protein	1,07	0,11	0,05	1,55
ENSXETG00000011762		Uncharacterized Protein	0,85	0,26	5,18	1,23
ENSXETG00000012424		Uncharacterized Protein	0,47	3,58	1,44	1,19
ENSXETG00000019402	ENSG00000187527	Uncharacterized Protein	3,38	0,80	0,22	0,28
ENSXETG00000024469	ENSG00000166482	Uncharacterized Protein	2,05	5,53	0,98	0,41
ENSXETG00000027551	ENSG00000172831	Uncharacterized Protein	0,29	1,40	0,59	0,97
ENSXETG00000027953		Uncharacterized Protein	8,88	0,44	2,79	0,75
ENSXETG00000030073		Uncharacterized Protein	3,80	1,33	0,76	1,25
ENSXETG00000030092	ENSG00000168792	Uncharacterized Protein	0,59	7,96	1,65	0,44
ENSXETG00000030371	ENSG00000171865	Uncharacterized Protein	3,25	0,33	0,99	0,52
ENSXETG00000030445		Uncharacterized Protein	1,43	0,66	10,59	2,91
ENSXETG00000030541		Uncharacterized Protein	1,05	0,75	4683	0,97
ENSXETG00000030682	ENSG00000149485	Uncharacterized Protein	0,81	3,81	2,71	1,76
ENSXETG00000031006		Uncharacterized Protein	1,17	1,38	5,00	1,25
ENSXETG00000031046		Uncharacterized Protein	0,54	32,83	1,31	1,16
ENSXETG00000031140		Uncharacterized Protein	0,70	9,77	3,33	0,65
ENSXETG00000031422		Uncharacterized Protein	1,01	3,90	0,04	1,29
ENSXETG00000031501		Uncharacterized Protein	0,34	1,86	2,34	0,08
ENSXETG00000032030		Uncharacterized Protein	1,04	4,22	1,57	0,66
ENSXETG00000032120	ENSG00000243989	Uncharacterized Protein	0,65	0,52	1,15	3,09
ENSXETG00000032285	ENSG00000179344	Uncharacterized Protein	2,57	3,78	1,49	0,49
ENSXETG00000032875		Uncharacterized Protein	7,22	1,07	0,55	3,49
ENSXETG00000032879		Uncharacterized Protein	1,09	4,03	1,40	0,92
ENSXETG00000033201	ENSG00000004846	Uncharacterized Protein	0,99	0,35	1,16	1,91
ENSXETG00000033941		Uncharacterized Protein	4,42	0,94	0,75	0,79
ENSXETG00000034075		Uncharacterized Protein	1,03	2,18	21,44	2,61
ENSXETG00000015021	ENSG00000155657	Uncharacterized Protein	0,06	0,95	0,15	→ 0
ENSXETG00000030389	ENSG00000092054	Uncharacterized Protein	→ 0	1,04	0,26	→ 0
ENSXETG00000030447		Uncharacterized Protein Loc100036671	0,59	4,06	0,49	1,00
ENSXETG00000033515	ENSG00000173436	Uncharacterized Protein Loc100135143	0,28	1,11	10,29	6,07
ENSXETG00000030596		Uncharacterized Protein Loc100145348	0,19	1,71	1,20	4,32
ENSXETG00000032181		Uncharacterized Protein Loc100170615	1,24	0,24	0,33	1,29
ENSXETG00000033307		Uncharacterized Protein Loc779991	0,27	6,03	1,41	1,32
ENSXETG00000016743	ENSG00000169344	Uromodulin (Uromucoid, Tamm-Horsfall Glycoprotein), Gene 3	Inf	Inf	0,50	2,91
ENSXETG00000002209	ENSG00000162924	V-Rel Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog	0,60	4,37	0,77	0,95
ENSXETG00000017320	ENSG00000132821	V-Set And Transmembrane Domain Containing 2 Like	0,50	2,14	9,02	0,96
ENSXETG00000023227	ENSG00000085741	Wingless-Type Mmtv Integration Site Family, Member 11B	1,68	5,07	1,54	0,62
ENSXETG00000031184	ENSG00000093217	Xylulokinase Homolog (H. Influenzae)	1,02	0,77	0,50	0,32
ENSXETG00000024940	ENSG00000175155	Yippee-Like 1	0,99	3,01	0,77	1,11
ENSXETG00000002899		Zinc Finger Protein 36, C3H Type, Homolog	0,59	8,80	0,64	0,94
ENSXETG00000024347	ENSG00000183779	Zinc Finger Protein 703	0,50	6,28	1,10	0,84
ENSXETG00000013559			25,74	0,72	0,59	Inf
ENSXETG00000021466			0,19	2,28	1,46	0,97
ENSXETG00000027434			→ 0	1,60	5,18	9,32
ENSXETG00000027519			0,55	3,74	0,06	2,35
ENSXETG00000029221			Inf	→ 0	0,43	→ 0

ANNEXE I (suite) – BaP, 10 µg.L⁻¹ (6/6)

Ensembl		Description	Ratio de transcription			
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>		6h	12h	18h	24h
ENSXETG00000030556			0,46	14,24	0,29	0,43
ENSXETG00000031666			Inf	NA	→ 0	Inf
ENSXETG00000032400			1,21	4,77	1,74	1,27
ENSXETG00000032995			1,30	0,51	Inf	0,99
ENSXETG00000033425			3,43	1,28	5,32	1,13
ENSXETG00000033446			0,23	0,89	0,05	0,45

Annexe II : Genes hépatiques sous-transcrits chez les femelles F0 exposées au BaP (50 ng.L⁻¹) – F0.B

ANNEXE II – F0.B (50 ng.L⁻¹) – Gène sous-transcrits (1/4)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000016587	ENSG00000112972	HMGCS1	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coa Synthase 1 (Soluble)	0,31	0,003
ENSXETG00000004291	ENSG00000131069	ACSS2.2	Acyl-Coa Synthetase Short-Chain Family Member 2, Gene 2	0,24	0,046
ENSXETG000000031495	ENSG00000087008	ACOX3	Acyl-Coenzyme A Oxidase	0,44	0,041
ENSXETG00000027084	ENSG00000198931	APRT	Adenine Phosphoribosyltransferase	0,45	0,020
ENSXETG00000004169	ENSG00000072364	AFF4	Af4/Fmr2 Family, Member 4	0,27	0,006
ENSXETG00000011083	ENSG00000100591	AHSA1	Aha1, Activator Of Heat Shock 90Kda Protein Atpase Homolog 1	0,43	0,035
ENSXETG00000012973	ENSG00000166825	ANPEP	Alanyl (Membrane) Aminopeptidase	0,33	0,003
ENSXETG00000004757	ENSG00000143149	ALDH9A1	Aldehyde Dehydrogenase 9 Family, Member A1	0,37	0,003
ENSXETG00000026269	ENSG00000122787	AKR1D1	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member D1 (Delta 4-3-Ketosteroid-5-Beta-Reductase)	0,44	0,008
ENSXETG00000005052	ENSG00000187546	AGMO	Alkylglycerol Monooxygenase	0,31	0,003
ENSXETG00000022747	ENSG00000008311	AASS	Amino adipate-Semialdehyde Synthase	0,47	0,022
ENSXETG00000023474	ENSG00000148218	ALAD	Aminolevulinat Dehydratase	0,45	0,003
ENSXETG00000027272	ENSG00000132693	APCS	amyloid P component, serum protein	0,30	0,014
ENSXETG00000030626	ENSG00000171388	APLN	Apelin Preproprotein	0,35	0,014
ENSXETG00000024999	ENSG00000204444	APOM	Apolipoprotein M	0,49	0,037
ENSXETG00000026001	ENSG00000132965	ALOX5AP	Arachidonate 5-Lipoxygenase-Activating Protein	0,36	0,006
ENSXETG00000025707	ENSG00000070669	ASNS	Asparagine Synthetase (Glutamine-Hydrolyzing)	0,40	0,027
ENSXETG00000011972	ENSG00000119523	ALG2	Asparagine-Linked Glycosylation 2 Homolog	0,40	0,018
ENSXETG00000001813	ENSG00000120697	ALG5	Asparagine-Linked Glycosylation 5, Dolichyl-Phosphate Beta-Glucosyltransferase Homolog	0,47	0,024
ENSXETG00000002512	ENSG00000174437	ATP2A2	Atpase, Ca++ Transporting, Cardiac Muscle, Slow Twitch 2	0,36	0,028
ENSXETG00000029880	ENSG00000206597	SNORA57	Basic Helix-Loop-Helix Family, Member A15	→ 0	0,042
ENSXETG00000005802	ENSG00000106635	BCL7B	B-Cell Cll/Lymphoma 7B	0,34	0,003
ENSXETG00000027380	ENSG00000105829	BET1	Blocked Early In Transport 1 Homolog	0,40	0,010
ENSXETG00000021380	ENSG00000176788	BASP1	Brain Abundant, Membrane Attached Signal Protein 1	0,46	0,017
ENSXETG00000008571	ENSG00000137948	BRDT	Bromodomain, Testis-Specific	0,10	0,003
ENSXETG00000017901	ENSG00000187446	CHP1	Calcium Binding Protein P22	0,42	0,017
ENSXETG00000007937	ENSG00000179218	CALR	Calreticulin	0,33	0,003
ENSXETG00000009510	ENSG00000257727	CNPY2	Canopy 2 Homolog	0,40	0,008
ENSXETG00000026124	ENSG00000080618	CPB2	Carboxypeptidase B2 (Plasma)	0,42	0,008
ENSXETG00000003737	ENSG00000120054	CPN1	Carboxypeptidase N, Polypeptide 1	0,44	0,021
ENSXETG00000008929	ENSG00000143387	CTSK	Cathepsin K	0,17	0,003
ENSXETG00000018291	ENSG00000245848	CEBPA	Ccaat/Enhancer Binding Protein (C/Ebp), Alpha	0,33	0,003
ENSXETG00000022227	ENSG00000115484	CCT4	Chaperonin Containing Tcp1, Subunit 4 (Delta)	0,48	0,017
ENSXETG00000000506	ENSG0000016602	CLCA1	chlride channel accessory 1 [Source:Xenbase;Acc:XB-GENE-6043674]	0,17	0,014
ENSXETG00000024073	ENSG00000213719	CLIC1	Chloride Intracellular Channel 1	0,48	0,015
ENSXETG00000002538	ENSG00000111666	CHPT1	Choline Phosphotransferase 1	0,48	0,041
ENSXETG00000017105	ENSG00000182795	C1ORF116	chromosome 1 open reading frame 116	0,41	0,003
ENSXETG00000019460	ENSG00000259399	C20ORF24	Chromosome 20 Open Reading Frame 24	0,38	0,003
ENSXETG00000032953	ENSG00000205133	TRIQQ	Chromosome 8 Open Reading Frame 83	0,51	0,048
ENSXETG00000009313	ENSG00000196616	ADH1B	Class I Alcohol Dehydrogenase, Beta Subunit	0,49	0,031
ENSXETG00000033623	ENSG00000215018	COL28A1	Collagen, Type Xviii, Alpha 1	0,39	0,010
ENSXETG00000003916	ENSG00000119535	CSF3R	colony stimulating factor 3 receptor (granulocyte)	0,36	0,003
ENSXETG00000008949	ENSG00000180891	CUEDC1	Cue Domain Containing 1	0,18	0,008
ENSXETG00000011183	ENSG00000116761	CTH	Cystathionase (Cystathionine Gamma-Lyase)	0,37	0,003
ENSXETG00000027531	ENSG00000172115	CYCS	Cytochrome C, Somatic	0,32	0,003
ENSXETG00000009665	ENSG00000197838	CYP2A13	Cytochrome P450, Family 2, Subfamily A, Polypeptide 13	0,31	0,003
ENSXETG00000022308	ENSG00000110887	DAO	D-Amino-Acid Oxidase	0,44	0,006
ENSXETG00000010841	ENSG00000116641	ANGPTL3	Dedicator Of Cytokinesis 7	0,37	0,003
ENSXETG00000004660	ENSG00000090520	DNAJB11	Dnaj (Hsp40) Homolog, Subfamily B, Member 11	0,48	0,022
ENSXETG00000015752	ENSG00000128590	DNAJB9	Dnaj (Hsp40) Homolog, Subfamily B, Member 9	0,11	0,003

ANNEXE II (suite) – F0.B (50 ng.L⁻¹) – Gène sous-transcrits (2/4)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000025659	ENSG00000108176	MGC147405	Dnaj (Hsp40) Homolog, Subfamily C, Member 12	0,19	0,003
ENSXETG00000006458	ENSG00000102580	DNAJC3	Dnaj (Hsp40) Homolog, Subfamily C, Member 3	0,27	0,003
ENSXETG00000007481	ENSG00000213551	DNAJC9	Dnaj (Hsp40) Homolog, Subfamily C, Member 9	0,47	0,043
ENSXETG00000033882	ENSG00000108861	DUSP3	Dual Specificity Phosphatase 3	0,27	0,021
ENSXETG000000021871	ENSG00000139318	DUSP6	Dual Specificity Phosphatase 6	0,47	0,028
ENSXETG000000024641	ENSG00000197977	ELOVL2	Elovl Fatty Acid Elongase 2	0,35	0,003
ENSXETG00000019727	ENSG00000005381	EPX	Eosinophil Peroxidase	0,24	0,022
ENSXETG000000031904	ENSG00000182585	EPGN	epithelial mitogen homolog precursor	0,14	0,003
ENSXETG00000015425	ENSG00000139684	ESD	Esterase D	0,45	0,018
ENSXETG00000009043	ENSG00000149485	FADS2	Fatty Acid Desaturase 2	0,34	0,003
ENSXETG000000026112	ENSG00000121742	GJB2	Gap Junction Protein, Beta 2, 26Kda	0,47	0,024
ENSXETG00000007140	ENSG00000167701	GPT2	Glutamic Pyruvate Transaminase (Alanine Aminotransferase) 2	0,50	0,036
ENSXETG000000008199	ENSG00000198380	GFPT1	Glutamine--Fructose-6-Phosphate Transaminase 1	0,24	0,040
ENSXETG00000000187	ENSG00000140905	GCSH	Glycine Cleavage System Protein H (Aminomethyl Carrier)	0,51	0,048
ENSXETG00000012392	ENSG00000116717	GADD45A	Growth Arrest And Dna-Damage-Inducible, Alpha	0,24	0,003
ENSXETG000000021554	ENSG00000137880	GCHFR	Gtp Cyclohydrolase I Feedback Regulator	0,35	0,003
ENSXETG000000003703	ENSG00000130005	GAMT	Guanidinoacetate N-Methyltransferase	0,37	0,006
ENSXETG000000007510	ENSG00000115541	HSPE1	Heat Shock 10Kda Protein 1 (Chaperonin 10)	0,50	0,037
ENSXETG000000007509	ENSG00000144381	HSPD1	Heat Shock 60Kda Protein 1 (Chaperonin)	0,46	0,020
ENSXETG00000016838	ENSG00000044574	HSPA5	Heat Shock 70Kda Protein 5 (Glucose-Regulated Protein, 78Kda)	0,06	0,003
ENSXETG000000005359	ENSG00000166598	HSP90B1	Heat Shock Protein 90Kda Beta (Grp94), Member 1	0,12	0,003
ENSXETG000000012164	ENSG00000115677	HDLBP	High Density Lipoprotein Binding Protein (Vigilin)	0,43	0,012
ENSXETG000000024014	ENSG00000101294	HM13	Histocompatibility (Minor) 13	0,36	0,006
ENSXETG000000014192	ENSG00000109854	HTATIP2	Hiv-1 Tat Interactive Protein 2, 30Kda	0,48	0,025
ENSXETG000000026099	ENSG00000051108	HERPUD1	Homocysteine-Inducible, Endoplasmic Reticulum Stress-Inducible, Ubiquitin-Like Domain Member 1	0,43	0,012
ENSXETG000000005520	ENSG00000101323	HAO1	Hydroxyacid Oxidase (Glycolate Oxidase) 1	0,47	0,046
ENSXETG000000008941	ENSG00000117594	HSD11B1	Hydroxysteroid (11-Beta) Dehydrogenase 1	0,46	0,021
ENSXETG000000008798	ENSG00000197838	XB-GENE-5764740	Hypothetical Loc548374	0,32	0,003
ENSXETG000000007834	ENSG00000198937	XB-GENE-5947586	Hypothetical Protein Loc100125155	0,32	0,003
ENSXETG00000010075	ENSG00000149428	HYOU1	Hypoxia Up-Regulated 1	0,27	0,003
ENSXETG000000021523	ENSG00000134049	IER3IP1	Immediate Early Response 3 Interacting Protein 1	0,45	0,020
ENSXETG000000009343	ENSG00000178035	IMPDH2	Imp (Inosine 5'-Monophosphate) Dehydrogenase 2	0,45	0,015
ENSXETG000000017149	ENSG00000175189	INHBC.1	inhibin, beta C, gene 1	0,42	0,042
ENSXETG000000002876	ENSG00000167244	IGF3	insulin-like growth factor 3	0,48	0,030
ENSXETG00000019875	ENSG00000115457	IGFBP2	Insulin-Like Growth Factor Binding Protein 2, 36Kda	0,29	0,003
ENSXETG000000008032	ENSG00000138413	IDH1	Isocitrate Dehydrogenase 1 (Nadp+), Soluble	0,47	0,025
ENSXETG000000015433	ENSG00000008083	JARID2	Jumonji, At Rich Interactive Domain 2	0,21	0,003
ENSXETG000000027589	ENSG00000136240	KDELRL1	Kdel (Lys-Asp-Glu-Leu) Endoplasmic Reticulum Protein Retention Receptor 1	0,31	0,003
ENSXETG000000008940	ENSG00000196878	LAMB3	Laminin, Beta 3	0,34	0,008
ENSXETG000000004899	ENSG00000160285	LSS	Lanosterol Synthase (2,3-Oxidosqualene-Lanosterol Cyclase)	0,41	0,031
ENSXETG000000006741	ENSG00000169223	LMAN2	Lectin, Mannose-Binding 2	0,50	0,046
ENSXETG000000024502	ENSG00000171357	LURAP1	leucine rich adaptor protein 1	0,20	0,003
ENSXETG000000006835	ENSG00000108829	LRRC59	Leucine Rich Repeat Containing 59	0,38	0,006
ENSXETG000000002320	ENSG00000133706	LARS	Leucyl-Trna Synthetase	0,42	0,050
ENSXETG000000024077	ENSG00000204392	LSM2	Lsm2 Homolog, U6 Small Nuclear Rna Associated	0,43	0,021
ENSXETG000000008976	ENSG00000146701	MDH2	Malate Dehydrogenase 2, Nad (Mitochondrial)	0,43	0,008
ENSXETG000000009121	ENSG00000168282	MGAT2	Mannosyl (Alpha-1,6-)-Glycoprotein Beta-1,2-N-Acetylglucosaminyltransferase	0,34	0,003
ENSXETG000000023696	ENSG00000125686	MED1	Mediator Of Rna Polymerase Ii Transcription Subunit 1	0,44	0,037
ENSXETG000000000073	ENSG00000145050	MANF	Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor	0,06	0,003
ENSXETG000000000914	ENSG00000052802	MSMO1	Methylsterol Monoxygenase 1	0,39	0,024
ENSXETG000000031922	ENSG00000156711	MAPK13	Mitogen-Activated Protein Kinase 13	0,30	0,014
ENSXETG000000024771	ENSG00000182117	NOP10	Nop10 Ribonucleoprotein Homolog	0,49	0,034
ENSXETG00000017861	ENSG00000102908	NFAT5	Nuclear Factor Of Activated T-Cells 5, Tonicity-Responsive	0,33	0,020
ENSXETG000000008403	ENSG00000181163	NPM1	Nucleophosmin (Nucleolar Phosphoprotein B23, Numatrin)	0,51	0,045
ENSXETG00000010703	ENSG00000149269	PAK1	P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 1	0,44	0,010
ENSXETG000000004865	ENSG00000100344	PNPLA3	patatin-like phospholipase domain containing 3	0,26	0,003
ENSXETG000000010651	ENSG00000166794	PPIB	Peptidylprolyl Isomerase B (Cyclophilin B)	0,46	0,015
ENSXETG000000011444	ENSG00000168938	PPIC	Peptidylprolyl Isomerase C (Cyclophilin C)	0,33	0,003
ENSXETG000000010361	ENSG00000123131	PRDX4	Peroxiredoxin 4	0,49	0,033
ENSXETG000000000525	ENSG00000117592	PRDX6	Peroxiredoxin 6	0,41	0,003
ENSXETG000000019626	ENSG00000171759	PAH	Phenylalanine Hydroxylase	0,50	0,029
ENSXETG000000009467	ENSG00000179761	PIPOX	Piperic Acid Oxidase	0,44	0,010
ENSXETG000000007235	ENSG00000169230	PRELID1	Prelid Domain Containing 1	0,51	0,033

ANNEXE II (suite) – F0.B (50 ng.L⁻¹) – Gène sous-transcrits (3/4)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG0000002945	ENSG00000250799	PRODH2	Proline Dehydrogenase (Oxidase) 2	0,39	0,003
ENSXETG0000005405	ENSG00000185624	P4HB	Prolyl 4-Hydroxylase, Beta Polypeptide	0,36	0,003
ENSXETG00000003954	ENSG00000107317	PTGDS	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)	0,33	0,003
ENSXETG00000002877	ENSG00000126457	PRMT1	Protein Arginine Methyltransferase 1	0,47	0,037
ENSXETG00000004650	ENSG00000167004	PDIA3	Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 3	0,28	0,003
ENSXETG00000017929	ENSG00000155660	PDIA4	Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 4	0,18	0,003
ENSXETG00000003512	ENSG00000143870	PDIA6	Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 6	0,18	0,003
ENSXETG00000027262	ENSG00000171033	PKIA	Protein Kinase (Camp-Dependent, Catalytic) Inhibitor Alpha	0,23	0,003
ENSXETG00000027834	ENSG00000143194	MAEL	Protein maelstrom homolog	0,23	0,003
ENSXETG00000020984	ENSG00000119938	PPP1R3C.1	Protein Phosphatase 1, Regulatory (Inhibitor) Subunit 3C, Gene 1	0,37	0,003
ENSXETG00000008726	ENSG00000163590	PPM1L	Protein Phosphatase, Mg2+/Mn2+ Dependent, 1L	0,47	0,046
ENSXETG00000021647	ENSG00000197561	PRTN3	Proteinase 3	0,36	0,017
ENSXETG00000010085	ENSG00000105398	XB-GENE-986082	Putative Ortholog Of Sulfotransferase Family Cytosolic 2B Member 1 (Ec 2.8.2.2) (Sulfotransferase 2B1) (Sulfotransferase 2B) (Alcohol Sulfotransferase) (Hydroxysteroid Sulfotransferase 2), 1 Of 1	0,21	0,003
ENSXETG00000013236	ENSG00000170348	XB-GENE-968508	Putative Ortholog Of Transmembrane Protein Tmp21 Precursor (21 Kda Transmembrane Trafficking Protein) , 1 Of 1	0,50	0,036
ENSXETG00000002264	ENSG00000213339	QTRT1	Queuine Trna-Ribosyltransferase 1	0,25	0,006
ENSXETG00000018901	ENSG00000103485	QPRT	Quinolate Phosphoribosyltransferase	0,33	0,008
ENSXETG00000002305	ENSG00000144566	RAB5A	Rab5A, Member Ras Oncogene Family	0,43	0,028
ENSXETG00000020565	ENSG00000174791	RIN1	Ras and Rab interactor 1	0,26	0,025
ENSXETG00000019780	ENSG00000189431	RASSF10	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family (N-terminal) member 10	0,39	0,022
ENSXETG00000003708	ENSG00000115255	REEP6	Receptor Accessory Protein 6	0,45	0,031
ENSXETG00000004127	ENSG00000130988	RGN	Regucalcin (Senescence Marker Protein-30)	0,41	0,006
ENSXETG00000008249	ENSG00000114115	RBP1	Retinol Binding Protein 1, Cellular	0,46	0,010
ENSXETG000000016175	ENSG00000163902	RPN1	Ribophorin I	0,34	0,003
ENSXETG00000000777	ENSG00000125844	RRBP1	ribosome binding protein 1	0,30	0,003
ENSXETG00000006284	ENSG00000128482	RNF112.2	ring finger protein 112, gene 2	0,34	0,045
ENSXETG00000001266	ENSG00000168894	RNF181	Ring Finger Protein 181	0,50	0,023
ENSXETG000000001195	ENSG00000073060	SCARB1	Scavenger Receptor Class B, Member 1	0,14	0,003
ENSXETG00000027226	ENSG00000166562	SEC11C	Sec11 Homolog C	0,31	0,003
ENSXETG00000024743	ENSG00000058262	SEC61A1	Sec61 Alpha 1 Subunit	0,39	0,006
ENSXETG00000027356	ENSG00000106803	SEC61B	Sec61 Beta Subunit	0,41	0,006
ENSXETG00000015843	ENSG00000132432	SEC61G	Sec61 Gamma Subunit	0,32	0,003
ENSXETG00000017659	ENSG00000139410	SDSL	Serine Dehydratase-Like	0,50	0,040
ENSXETG00000010316	ENSG00000140093	SERPINA10	Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A (Alpha-1 Antiproteinase, Antitrypsin), Member 10	0,24	0,003
ENSXETG00000027917	ENSG00000129128	SPCS3	Signal Peptidase Complex Subunit 3 Homolog	0,36	0,012
ENSXETG00000011993	ENSG00000153037	SRP19	Signal Recognition Particle 19Kda	0,40	0,023
ENSXETG00000020431	ENSG00000124783	SSR1	Signal Sequence Receptor, Alpha (Translocon-Associated Protein Alpha)	0,40	0,003
ENSXETG00000002966	ENSG00000163479	SSR2	Signal Sequence Receptor, Beta (Translocon-Associated Protein Beta)	0,23	0,003
ENSXETG00000000730	ENSG00000180879	SSR4	Signal Sequence Receptor, Delta (Translocon-Associated Protein Delta)	0,46	0,015
ENSXETG00000027723	ENSG00000114850	SSR3	Signal Sequence Receptor, Gamma (Translocon-Associated Protein Gamma)	0,38	0,003
ENSXETG00000027289	ENSG00000141391	SLMO1	Slowmo Homolog 1	0,26	0,037
ENSXETG00000032164	ENSG00000180535	BHLHA15	Small nucleolar RNA SNORA57 [Source:RFAM;Acc:RF00191]	→ 0	0,003
ENSXETG00000015126	ENSG00000121073	SLC35B1	Solute Carrier Family 35, Member B1	0,31	0,003
ENSXETG00000020367	ENSG00000112473	SLC39A7	Solute Carrier Family 39 (Zinc Transporter), Member 7	0,28	0,010
ENSXETG00000018279	ENSG00000130876	SLC7A10	Solute Carrier Family 7 (Neutral Amino Acid Transporter Light Chain, Asc System), Member 10	0,19	0,003
ENSXETG00000015683	ENSG00000123178	SPRYD7	Spry Domain Containing 7	0,49	0,046
ENSXETG00000027357	ENSG00000141293	SKAP1	Src Kinase Associated Phosphoprotein 1	0,32	0,024
ENSXETG00000023043	ENSG00000197157	SND1	Staphylococcal Nuclease And Tudor Domain Containing Protein 1	0,47	0,037
ENSXETG00000018564	ENSG00000128228	SDF2L1	Stromal Cell-Derived Factor 2-Like 1	0,28	0,003
ENSXETG00000005583	ENSG00000148248	SURF4.1	Surfeit 4, Gene 1	0,29	0,003
ENSXETG00000031145	ENSG00000196074	SYCP2	synaptonemal complex protein 2	0,45	0,035
ENSXETG00000002382	ENSG00000133138	TBC1D8B	Tbc1 Domain Family, Member 8B (With Gram Domain)	0,39	0,040
ENSXETG00000021566	ENSG00000172425	TTC36	Tetratricopeptide Repeat Domain 36	0,48	0,041
ENSXETG00000015756	ENSG00000177683	THAP5	THAP domain containing 5	0,43	0,030
ENSXETG00000003713	ENSG00000172009	THOP1	Thimet Oligopeptidase 1	0,50	0,047
ENSXETG00000002592	ENSG00000136810	TXN	Thioredoxin	0,29	0,003
ENSXETG00000001776	ENSG00000124120	TTPAL	Tocopherol (Alpha) Transfer Protein-Like	0,33	0,003
ENSXETG00000015948	ENSG00000067167	TRAM1	Translocation Associated Membrane Protein 1	0,33	0,003
ENSXETG00000014770	ENSG00000168955	TM4SF20	transmembrane 4 L six family member 20	0,23	0,003
ENSXETG00000017353	ENSG00000143183	TMCO1	Transmembrane And Coiled-Coil Domains 1	0,47	0,017
ENSXETG00000023000	ENSG00000117500	TMED5	Transmembrane Emp24 Protein Transport Domain Containing 5	0,27	0,010
ENSXETG00000006739	ENSG00000184840	TMED9	Transmembrane Emp24 Protein Transport Domain Containing 9	0,31	0,003
ENSXETG00000003691	ENSG00000204178	TMEM57	Transmembrane Protein 57	0,50	0,042
ENSXETG00000004725	ENSG00000118271	TTR	Transthyretin	0,22	0,003

ANNEXE II (suite) – F0.B (50 ng.L⁻¹) – Gène sous-transcrits (4/4)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000021551	ENSG00000118094	TREH	Trehalase (Brush-Border Membrane Glycoprotein)	0,36	0,031
ENSXETG00000027207	ENSG00000120686	UFM1	Ubiquitin-Fold Modifier 1	0,38	0,006
ENSXETG00000026973	ENSG00000198258	UBL5	Ubiquitin-Like 5	0,41	0,025
ENSXETG00000023303	ENSG00000112494	UNC93A	Unc-93 Homolog A	0,33	0,008
ENSXETG00000030371	ENSG00000171865		Uncharacterized Protein	0,04	0,021
ENSXETG00000010908	ENSG00000243135		Uncharacterized Protein	0,29	0,008
ENSXETG00000019402	ENSG00000187527		Uncharacterized Protein	0,31	0,012
ENSXETG00000016564	ENSG00000196139		Uncharacterized Protein	0,40	0,006
ENSXETG00000032788	ENSG00000197448		Uncharacterized Protein	0,50	0,050
ENSXETG00000008794	ENSG00000127954		Uncharacterized Protein Loc100145516	0,45	0,029
ENSXETG00000010736	ENSG00000062716	VMP1	Vacuole Membrane Protein 1	0,49	0,033
ENSXETG00000000104	ENSG00000112299	VNN1	Vanin 1	0,46	0,037
ENSXETG00000018239	ENSG00000125753	VASP	Vasodilator-Stimulated Phosphoprotein	0,48	0,029
ENSXETG00000016987	ENSG00000185650	ZFP36L1	Zinc Finger Protein 36, C3H Type-Like 1	0,43	0,003

Annexe III : Genes hépatiques sur-transcrits chez les femelles F0 exposées au BaP (50 ng.L⁻¹) – F0.B

ANNEXE III – F0.B (50 ng.L⁻¹) – Gène sur-transcrits (1/3)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG0000001122	ENSG00000122643	NT5C3A	5'-Nucleotidase, Cytosolic Iii	2,99	0,003
ENSXETG0000007623	ENSG00000170776	AKAP13	A Kinase (Prka) Anchor Protein 13	2,54	0,035
ENSXETG00000013663	ENSG00000065000	AP3D1	Adaptor-Related Protein Complex 3, Delta 1 Subunit	2,29	0,029
ENSXETG00000008519	ENSG00000075340	ADD2	Adducin 2 (Beta)	3,99	0,003
ENSXETG00000004222	ENSG00000128271	ADORA2A	Adenosine A2A Receptor	2,08	0,023
ENSXETG00000032383	ENSG00000169379	ARL13B	Adp-Ribosylation Factor-Like 13B	3,37	0,003
ENSXETG00000024487	ENSG00000177076	ACER2	Alkaline Ceramidase 2	2,24	0,015
ENSXETG00000016798	ENSG00000029534	ANK1	Ankyrin 1, Erythrocytic	2,62	0,010
ENSXETG00000011277	ENSG00000167522	ANKRD11	Ankyrin Repeat Domain 11	2,06	0,045
ENSXETG00000004049	ENSG00000101745	ANKRD12	Ankyrin Repeat Domain 12	2,49	0,006
ENSXETG00000019534	ENSG00000129673	AANAT	aralkylamine N-acetyltransferase	inf	0,003
ENSXETG00000013844	ENSG00000074582	BCS1L	Bcs1-Like (<i>S. Cerevisiae</i>)	2,53	0,046
ENSXETG00000033246	ENSG00000166710	B2M	beta-2-microglobulin	2,77	0,024
ENSXETG00000021782	ENSG00000076108	BAZ2A	Bromodomain Adjacent To Zinc Finger Domain, 2A	4,56	0,003
ENSXETG00000020266	ENSG00000156273	BACH1	Btb And Cnc Homology 1, Basic Leucine Zipper Transcription Factor 1	2,84	0,003
ENSXETG00000032225	ENSG00000180881	CAPS2	Calcyphosine 2	2,47	0,027
ENSXETG00000013740	ENSG00000164879	CA2	Carbonic Anhydrase 2	2,05	0,035
ENSXETG00000015426	ENSG00000205560	CPT1B	Camitine Palmitoyltransferase 1B (Muscle)	2,84	0,003
ENSXETG00000024184	ENSG00000101160	TUBB1	Cathepsin Z	2,49	0,015
ENSXETG00000010119	ENSG00000198851	CD3E	CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)	3,15	0,036
ENSXETG00000033362	ENSG00000101017	CD40	CD40 antigen precursor	3,34	0,046
ENSXETG00000011877	ENSG00000019582	CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	2,57	0,030
ENSXETG00000004314	ENSG00000101391	CDK5RAP1	Cdk5 Regulatory Subunit Associated Protein 1	2,29	0,024
ENSXETG00000023034	ENSG00000097046	CDC7	Cell Division Cycle 7 Homolog	2,43	0,030
ENSXETG00000030117	ENSG00000111665	CDCA3	cell division cycle associated 3	3,80	0,003
ENSXETG00000023010	ENSG00000143162	CREG1	Cellular Repressor Of E1A-Stimulated Genes 1	2,63	0,029
ENSXETG00000016268	ENSG00000112782	CLIC4	Chloride Intracellular Channel 4	2,15	0,012
ENSXETG00000025909	ENSG00000143793	C1ORF35	chromosome 1 open reading frame 35	2,39	0,022
ENSXETG00000015708	ENSG00000119720	NRDE2	Chromosome 14 Open Reading Frame 102	2,11	0,048
ENSXETG00000016954	ENSG00000160392	C19ORF47	Chromosome 19 Open Reading Frame 47	2,10	0,023
ENSXETG00000024506	ENSG00000180190	TDRP	Chromosome 8 Open Reading Frame 42	2,78	0,006
ENSXETG00000023302	ENSG00000153721	CNKSr3	Cnksr Family Member 3	1,93	0,045
ENSXETG00000030104	ENSG00000109881	CCDC34	Coiled-Coil Domain Containing 34	4,36	0,032
ENSXETG00000010071	ENSG00000186166	CCDC84	Coiled-Coil Domain Containing 84	2,57	0,015
ENSXETG00000006108	ENSG00000092758	COL9A3	Collagen, Type Ix, Alpha 3	2,70	0,046
ENSXETG00000008492	ENSG00000138433	CIR1	Corepressor Interacting With Rbpj, 1	3,69	0,003
ENSXETG00000033940	ENSG00000160868	CYP3A5	Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 5	2,58	0,010
ENSXETG00000014181	ENSG00000124795	DEK	Dek Oncogene	2,09	0,022
ENSXETG00000005433	ENSG00000167261	DPEP2	Dipeptidase 2	4,03	0,003
ENSXETG00000007924	ENSG00000187266	EPOR	erythropoietin receptor	2,35	0,010
ENSXETG00000010544	ENSG00000130227	XPO7	Exportin 7	2,03	0,028
ENSXETG00000027391	ENSG00000234545	FAM133B	Family With Sequence Similarity 133, Member B	2,69	0,003
ENSXETG00000031916	ENSG00000026103	FAS	Fas cell surface death receptor precursor	2,11	0,020
ENSXETG00000012204	ENSG00000180998	GPR137C	G Protein-Coupled Receptor 137C	2,13	0,045
ENSXETG00000014715	ENSG00000125388	GRK4	G Protein-Coupled Receptor Kinase 4	2,28	0,018
ENSXETG00000024588	ENSG00000131482	G6PC	Glucose-6-Phosphatase, Catalytic (Glycogen Storage Disease Type I, Von Gierke Disease)	6,80	0,003
ENSXETG00000032815	ENSG00000125772	GPCPD1	Glycerophosphocholine Phosphodiesterase Gde1 Homolog	2,16	0,014
ENSXETG00000025842	ENSG00000137106	GRHPR1	Glyoxylate Reductase/Hydroxypyruvate Reductase, Gene 1	2,59	0,018
ENSXETG00000013890	ENSG00000204120	GIGYF2	GRB10 interacting GYF protein 2	2,90	0,003
ENSXETG00000026537	ENSG00000130222	GADD45G	Growth Arrest And Dna-Damage-Inducible, Gamma	2,15	0,036

ANNEXE III (suite) – F0.B (50 ng.L⁻¹) – Gène sur-transcrits (2/3)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000006263	ENSG00000165702	GFI1B	Growth Factor Independent 1B Transcription Repressor	2,25	0,003
ENSXETG00000014678	ENSG00000164949	GEM	Gtp Binding Protein Overexpressed In Skeletal Muscle	2,89	0,010
ENSXETG00000027208	ENSG00000183347	GBP6	Guanylate Binding Protein Family, Member 6	2,95	0,008
ENSXETG00000003788	ENSG00000112599	GUCA1B	Guanylate Cyclase Activator 1B (Retina)	4,08	0,003
ENSXETG00000000342	ENSG00000138642	HERC6	HECT and RLD domain containing E3 ubiquitin protein ligase family member 6	2,39	0,044
ENSXETG00000025663	ENSG00000130656	HBA3	Hemoglobin Alpha 3 Subunit	3,57	0,003
ENSXETG00000024626	ENSG00000223609	HBD	Hemoglobin, Delta	6,18	0,003
ENSXETG00000024628	ENSG00000196565	HBG2	Hemoglobin, Gamma G	3,18	0,003
ENSXETG00000008860	ENSG00000156515	HK1	Hexokinase 1	2,49	0,010
ENSXETG00000016904	ENSG00000164120	HPGD	Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase 15-(Nad)	3,21	0,003
ENSXETG00000015656	ENSG00000146678	IGFBP1	insulin-like growth factor binding protein 1	3,52	0,003
ENSXETG00000022049	ENSG00000077009	NMRK2	Integrin Beta 1 Binding Protein 3	2,15	0,027
ENSXETG00000021822	ENSG00000152778	IFT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	3,97	0,015
ENSXETG00000013218	ENSG00000119650	IFT43	Intraflagellar Transport 43 Homolog (Chlamydomonas)	2,64	0,003
ENSXETG00000031238	ENSG00000158113	LRRC43	leucine rich repeat containing 43	11,14	0,003
ENSXETG00000022859	ENSG00000171017	LRRC8E	Leucine Rich Repeat Containing 8 Family, Member E	2,15	0,023
ENSXETG00000001714	ENSG00000198728	LDB1	Lim Domain Binding 1	2,21	0,045
ENSXETG00000014525	ENSG00000111052	LIN7A	Lin-7 Homolog A	4,91	0,048
ENSXETG00000015636	ENSG00000132510	KDM6B	Lysine (K)-Specific Demethylase 6B	4,15	0,003
ENSXETG00000018209	ENSG00000205639	MFSD2B	Major Facilitator Superfamily Domain-Containing Protein 2B	3,19	0,003
ENSXETG00000020165	ENSG00000075975	MKRN2	Makorin Ring Finger Protein 2	2,33	0,003
ENSXETG00000027594	ENSG00000188895	MSL1	Male-Specific Lethal 1 Homolog	2,71	0,003
ENSXETG00000020483	ENSG00000123933	MXD4	Max Dimerization Protein 4	4,82	0,003
ENSXETG00000021451	ENSG00000105085	MED26	Mediator Complex Subunit 26	2,52	0,010
ENSXETG00000014530	ENSG00000100427	MELC1	megalencephalic leukoencephalopathy with subcortical cysts 1	6,96	0,003
ENSXETG00000009113	ENSG00000065328	MCM10	Minichromosome Maintenance Complex Component 10	2,12	0,044
ENSXETG00000021439	ENSG00000125459	MSTO1	misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator	2,19	0,030
ENSXETG00000002978	ENSG00000057468	MSH4	Muts Homolog 4	3,22	0,023
ENSXETG00000018054	ENSG00000183833	MAATS1	MYCBP-associated, testis expressed 1	3,15	0,027
ENSXETG00000008910	ENSG00000143384	MCL1	myeloid cell leukemia 1	1,98	0,034
ENSXETG00000001136	ENSG00000103148	NPRL3	Nitrogen Permease Regulator-Like 3	2,16	0,036
ENSXETG000000031753	ENSG00000153234	NR4A2	Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2	13,99	0,018
ENSXETG00000000579	ENSG00000123358	NR4A1	Nuclear Receptor Subfamily 4, Group A, Member 1	6,67	0,003
ENSXETG00000012083	ENSG00000157881	PANK4	Pantothenate Kinase 4	2,15	0,028
ENSXETG00000004129	ENSG00000102221	JADE3	Phd Finger Protein 16	5,80	0,003
ENSXETG00000023046	ENSG00000129292	PHF20L1	PHD finger protein 20-like 1	2,19	0,046
ENSXETG00000020374	ENSG00000184588	PDE4B	Phosphodiesterase 4B, Camp-Specific	2,34	0,030
ENSXETG00000016792	ENSG00000104368	PLAT	Plasminogen Activator, Tissue	2,21	0,012
ENSXETG00000016850	ENSG00000171867	PRNP	prion protein	2,05	0,021
ENSXETG00000000658	ENSG00000170915	PAQR8	Progesterone And Adipoq Receptor Family Member Viii	2,45	0,003
ENSXETG00000001907	ENSG00000103490	XB-GENE-994847	Putative ortholog of apoptosis-associated speck-like protein, 1 of 1	9,34	0,035
ENSXETG00000001141	ENSG00000130656	HBA4	Putative Ortholog Of Hemoglobin Alpha Chain. , 2 Of 3	2,26	0,035
ENSXETG00000013833	ENSG00000185989	RASA3	Ras P21 Protein Activator 3	2,09	0,037
ENSXETG00000010445	ENSG00000048649	RSF1	Remodeling And Spacing Factor 1	2,70	0,008
ENSXETG00000024429	ENSG00000122257	RBBP6	Retinoblastoma Binding Protein 6	2,36	0,008
ENSXETG00000006227	ENSG00000240771	ARHGEF25	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 25	2,86	0,003
ENSXETG00000013365	ENSG00000175449	RFESD	Rieske (Fe-S) Domain Containing	2,20	0,037
ENSXETG00000023794	ENSG00000274529	SEBOX	sebox homeobox	5,52	0,003
ENSXETG00000004662	ENSG00000138378	STAT4	Signal Transducer And Activator Of Transcription 4	5,81	0,017
ENSXETG00000007767	ENSG00000147454	SLC25A37	Solute Carrier Family 25, Member 37	2,53	0,022
ENSXETG00000020572	ENSG00000174669	SLC29A2	Solute Carrier Family 29 (Nucleoside Transporters), Member 2	2,54	0,003
ENSXETG00000015401	ENSG00000157637	SLC38A10	Solute Carrier Family 38, Member 10	3,75	0,022
ENSXETG00000011392	ENSG0000021574	SPAST	Spatin	2,12	0,024
ENSXETG00000019540	ENSG00000176170	SPHK1	sphingosine kinase 1	2,27	0,012
ENSXETG00000000781	ENSG00000149136	SSRP1	Structure Specific Recognition Protein 1	2,23	0,018
ENSXETG00000002215	ENSG00000106868	SUSD1	sushi domain containing 1	3,33	0,003
ENSXETG00000008524	ENSG00000115353	TACR1	Tachykinin Receptor 1	4,87	0,003
ENSXETG00000032722	ENSG00000141384	TAF4B	Taf4B Rna Polymerase Ii, Tata Box Binding Protein (Tbp)-Associated Factor, 105Kda	3,59	0,012
ENSXETG00000031615	ENSG00000103168	TAF1C	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase I, C, 110kDa	3,42	0,003
ENSXETG00000016143	ENSG00000099992	TBC1D10A	Tbc1 Domain Family, Member 10A	2,21	0,029
ENSXETG00000032456	ENSG00000009790	TRAF3IP3	TRAF3 interacting protein 3	2,47	0,006
ENSXETG00000014750	ENSG00000114126	TFDP2	Transcription Factor Dp-2 (E2F Dimerization Partner 2)	3,13	0,003
ENSXETG00000008494	ENSG00000163810	TGM4	transglutaminase 4	60,71	0,020
ENSXETG00000022572	ENSG00000157514	TSC22D3	Tsc22 Domain Family, Member 3	2,16	0,037

ANNEXE III (suite) – F0.B (50 ng.L⁻¹) – Gène sur-transcrits (3/3)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000003267	ENSG00000100271	TLL1	Tubulin Tyrosine Ligase-Like Family, Member 1	3,14	0,046
ENSXETG00000022133	ENSG00000163714	U2SURP	U2 Snrp-Associated Surp Domain Containing	2,10	0,023
ENSXETG00000032120	ENSG00000243989		Uncharacterized Protein	2,23	0,021
ENSXETG00000025063	ENSG00000138068		Uncharacterized Protein	3,14	0,003
ENSXETG00000033201	ENSG00000004846		Uncharacterized Protein	4,40	0,003
ENSXETG00000031393	ENSG00000183778		Uncharacterized Protein	5,25	0,003
ENSXETG00000000392	ENSG00000085265		Uncharacterized Protein	9,55	0,006
ENSXETG00000027561	ENSG00000197838		Uncharacterized Protein Loc100145695	2,21	0,049
ENSXETG00000007440	ENSG00000125351	UPF3B	Upf3 Regulator Of Nonsense Transcripts Homolog B	2,66	0,003
ENSXETG00000002447	ENSG00000150630	VEGFC	Vascular Endothelial Growth Factor C	2,65	0,014
ENSXETG00000007462	ENSG00000026025	VIM	Vimentin	1,88	0,046
ENSXETG00000009814	ENSG00000196998	WDR45	Wd Repeat Domain 45	2,45	0,003
ENSXETG00000020237	ENSG00000105875	WDR91	Wd Repeat Domain 91	2,02	0,039
ENSXETG00000015186	ENSG00000147548	WHSC1L1	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1-like 1	2,71	0,006
ENSXETG00000014637	ENSG00000123200	ZC3H13	Zinc Finger Cch-Type Containing 13	2,42	0,017
ENSXETG00000030941	ENSG00000156599	ZDHC5	Zinc Finger, Dhhc-Type Containing 5	2,21	0,023
ENSXETG00000007561	ENSG00000121691	CAT.1	Catalase, Gene 1	2,06	0,045

Annexe IV : Genes hépatiques sous-transcrits chez les femelles F0 exposées au TCS (50 ng.L⁻¹) – F0.T

ANNEXE IV – F0.T (50 ng.L⁻¹) – Gène sous-transcrits (1/2)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000026269	ENSG00000122787	AKR1D1	Aldo-Keto Reductase Family 1, Member D1 (Delta 4-3-Ketosteroid-5-Beta-Reductase)	0,44	0,007
ENSXETG00000011972	ENSG00000119523	ALG2	Asparagine-Linked Glycosylation 2 Homolog	0,41	0,025
ENSXETG00000027380	ENSG00000105829	BET1	Blocked Early In Transport 1 Homolog	0,43	0,025
ENSXETG00000007937	ENSG00000179218	CALR	Calreticulin	0,44	0,031
ENSXETG00000014708	ENSG00000177150	FAM210A	Chromosome 18 Open Reading Frame 19	0,45	0,046
ENSXETG00000033623	ENSG00000215018	COL28A1	Collagen, Type Xviii, Alpha 1	0,46	0,031
ENSXETG00000027531	ENSG00000172115	CYCS	Cytochrome C, Somatic	0,34	0,007
ENSXETG00000008472	ENSG00000172115	CYCT	Cytochrome C, Testis	0,48	0,034
ENSXETG00000015752	ENSG00000128590	DNAJB9	Dnaj (Hsp40) Homolog, Subfamily B, Member 9	0,13	0,007
ENSXETG00000006458	ENSG00000102580	DNAJC3	Dnaj (Hsp40) Homolog, Subfamily C, Member 3	0,34	0,016
ENSXETG00000013114	ENSG00000122547	EEPD1	Endonuclease/Exonuclease/Phosphatase Family Domain Containing 1	0,45	0,043
ENSXETG00000031904	ENSG00000182585	EPGN	epithelial mitogen homolog precursor	0,39	0,019
ENSXETG00000020459	ENSG00000124802	EEF1E1	Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Epsilon 1	0,39	0,046
ENSXETG00000017895	ENSG00000178997	EXD1	exonuclease 3'-5' domain containing 1	0,12	0,012
ENSXETG00000022458	ENSG00000167699	GLOD4	Glyoxalase Domain Containing 4	0,31	0,007
ENSXETG00000012392	ENSG00000116717	GADD45A	Growth Arrest And Dna-Damage-Inducible, Alpha	0,25	0,007
ENSXETG00000016838	ENSG00000044574	HSPA5	Heat Shock 70Kda Protein 5 (Glucose-Regulated Protein, 78Kda)	0,10	0,007
ENSXETG00000005359	ENSG00000166598	HSP90B1	Heat Shock Protein 90Kda Beta (Grp94), Member 1	0,19	0,007
ENSXETG00000006171	ENSG00000181061	HIGD1A	Hig1 Hypoxia Inducible Domain Family, Member 1A	0,42	0,031
ENSXETG00000008798	ENSG00000197838	XB-GENE-5764740	Hypothetical Loc548374	0,43	0,007
ENSXETG00000007834	ENSG00000198937	XB-GENE-5947586	Hypothetical Protein Loc100125155	0,40	0,039
ENSXETG00000010075	ENSG00000149428	HYOU1	Hypoxia Up-Regulated 1	0,20	0,007
ENSXETG00000027589	ENSG00000136240	KDELRL1	Kdel (Lys-Asp-Glu-Leu) Endoplasmic Reticulum Protein Retention Receptor 1	0,45	0,036
ENSXETG00000002320	ENSG00000133706	LARS	Leucyl-Trna Synthetase	0,32	0,007
ENSXETG00000010902	ENSG00000118242	MREG	Melanoregulin	0,46	0,019
ENSXETG00000000073	ENSG00000145050	MANF	Mesencephalic Astrocyte-Derived Neurotrophic Factor	0,06	0,007
ENSXETG00000011683	ENSG00000111245	MYL2	Myosin, Light Chain 2, Regulatory, Cardiac, Slow	→ 0	0,007
ENSXETG00000014379	ENSG00000117691	NENF	Neudesin Neurotrophic Factor	0,16	0,016
ENSXETG00000034354	ENSG00000114670	NEK11	Nima-Related Kinase 11	0,34	0,007
ENSXETG00000008530	ENSG00000092621	PHGDH	Phosphoglycerate Dehydrogenase	0,29	0,028
ENSXETG00000002877	ENSG00000126457	PRMT1	Protein Arginine Methyltransferase 1	0,46	0,046
ENSXETG00000017929	ENSG00000155660	PDIA4	Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 4	0,30	0,007
ENSXETG00000003512	ENSG00000143870	PDIA6	Protein Disulfide Isomerase Family A, Member 6	0,32	0,007
ENSXETG00000010085	ENSG00000105398	XB-GENE-986082	Putative Ortholog Of Sulfotransferase Family Cytosolic 2B Member 1 (Ec 2.8.2.2) (Sulfotransferase 2B1) (Sulfotransferase 2B) (Alcohol Sulfotransferase) (Hydroxysteroid Sulfotransferase 2), 1 Of 1	0,35	0,046
ENSXETG00000002305	ENSG00000144566	RAB5A	Rab5A, Member Ras Oncogene Family	0,35	0,019
ENSXETG00000000559	ENSG00000136161	RCBTB2	Regulator Of Chromosome Condensation (Rcc1) And Btb (Poz) Domain Containing Protein 2	0,42	0,022
ENSXETG00000016175	ENSG00000163902	RPN1	Ribophorin I	0,42	0,016
ENSXETG000000021529	ENSG00000088827	SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	0,36	0,019
ENSXETG00000002966	ENSG00000163479	SSR2	Signal Sequence Receptor, Beta (Translocon-Associated Protein Beta)	0,43	0,047
ENSXETG00000025164	ENSG00000162695	SLC30A7	Solute Carrier Family 30 (Zinc Transporter), Member 7	0,46	0,036
ENSXETG00000007316	ENSG00000188338	SLC38A3	solute carrier family 38, member 3	0,32	0,019
ENSXETG00000016876	ENSG00000147804	SLC39A4	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4	0,45	0,034
ENSXETG00000018564	ENSG00000128228	SDF2L1	Stromal Cell-Derived Factor 2-Like 1	0,25	0,007
ENSXETG00000021566	ENSG00000172425	TTC36	Tetratricopeptide Repeat Domain 36	0,48	0,025
ENSXETG00000015756	ENSG00000177683	THAP5	THAP domain containing 5	0,40	0,019
ENSXETG00000016057	ENSG00000128311	TST	Thiosulfate Sulfurtransferase (Rhodanese)	0,47	0,045

ANNEXE IV (suite) – F0.T (50 ng.L⁻¹) – Gène sous-transcrits (2/2)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENXSXETG00000003757	ENSG00000149591	TAGLN	Transgelin	0,37	0,012
ENXSXETG00000014770	ENSG00000168955	TM4SF20	transmembrane 4 L six family member 20	0,34	0,043
ENXSXETG00000028048	ENSG00000166741		Uncharacterized Protein	0,24	0,007
ENXSXETG00000010908	ENSG00000243135		Uncharacterized Protein	0,35	0,022
ENXSXETG00000026447	ENSG00000175567	UCP2	Uncoupling Protein 2 (Mitochondrial, Proton Carrier)	0,30	0,031
ENXSXETG00000025372	ENSG00000136997	MYC	V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog	0,47	0,036

Annexe V : Genes hépatiques sur-transcrits chez les femelles F0 exposées au TCS (50 ng.L⁻¹) – F0.T

ANNEXE V – F0.T (50 ng.L⁻¹) – Gène sur-transcrits (1/2)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENXSXETG00000008945	ENSG00000172893	DHCR7	7-Dehydrocholesterol Reductase	2,75	0,007
ENXSXETG00000028764	ENSG00000201027	7SK	7Sk Rna	2,27	0,025
ENXSXETG00000006882	ENSG00000160323	ADAMTS13	Adam Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif, 13	2,19	0,019
ENXSXETG00000013187	ENSG00000134262	AP4B1	Adaptor-Related Protein Complex 4, Beta 1 Subunit	2,75	0,043
ENXSXETG00000003571	ENSG00000065457	ADAT1	Adenosine Deaminase, Trna-Specific 1	2,25	0,022
ENXSXETG00000020674	ENSG00000149925	ALDOA	Aldolase A, Fructose-Bisphosphate	2,34	0,016
ENXSXETG00000030564	ENSG00000130656	HBA-L5	Alpha Globin Larval-5	3,43	0,007
ENXSXETG00000022398	ENSG00000256394	ASIC5	Amiloride-Sensitive Cation Channel 5, Intestinal	10,51	0,007
ENXSXETG00000031604	ENSG00000138380	CARF	Amyotrophic Lateral Sclerosis 2 (Juvenile) Chromosome Region, Candidate 8	3,35	0,007
ENXSXETG00000021893	ENSG00000167772	ANGPTL4	angiopoietin-like 4	2,28	0,039
ENXSXETG00000016210	ENSG00000073734	ABCB11	Atp-Binding Cassette, Sub-Family B (Mdr/Tap), Member 11	2,27	0,047
ENXSXETG00000013316	ENSG00000101197	BIRC7	baculoviral IAP repeat containing 7	2,72	0,016
ENXSXETG00000018707	ENSG00000152611	CAPSL	Calcyphosine-Like	2,27	0,022
ENXSXETG00000008102	ENSG00000149260	CAPN5	Calpain 5	2,01	0,034
ENXSXETG00000012747	ENSG00000101220	C20ORF27	Chromosome 20 Open Reading Frame 27	2,42	0,016
ENXSXETG00000017927	ENSG00000219073	CELA3A	chymotrypsin-like elastase family, member 3A	96,89	0,007
ENXSXETG00000026982	ENSG00000219073	CELA3B	Chymotrypsin-Like Elastase Family, Member 3B	5,95	0,012
ENXSXETG00000031229	ENSG00000163359	COL6A3	Collagen, Type Vi, Alpha 3	3,22	0,007
ENXSXETG00000030070	ENSG00000138161	CUZD1	CUB and zona pellucida-like domains 1	3,30	0,016
ENXSXETG00000017431	ENSG00000051523	CYBA	Cytochrome B-245, Alpha Polypeptide	2,94	0,019
ENXSXETG00000033940	ENSG00000160868	CYP3A5	Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 5	2,64	0,007
ENXSXETG00000000021	ENSG00000112242	E2F3	E2F Transcription Factor 3	3,18	0,016
ENXSXETG00000007560	ENSG00000135374	ELF5	E74-like factor 5 (ets domain transcription factor)	5,36	0,007
ENXSXETG00000033121	ENSG00000072840	EVC	Ellis van Creveld syndrome protein	3,00	0,007
ENXSXETG00000019727	ENSG0000005381	EPX	Eosinophil Peroxidase	3,48	0,019
ENXSXETG00000009481	ENSG00000139641	ESYT1	Extended Synaptotagmin-Like Protein 1	2,97	0,007
ENXSXETG00000001938	ENSG00000163586	FABP1	Fatty Acid Binding Protein 1, Liver	4,17	0,007
ENXSXETG00000030649	ENSG00000085265	FCN1	Fcn1 Protein	2,75	0,047
ENXSXETG00000024910	ENSG00000085265	FCN3	Ficolin (Collagen/Fibrinogen Domain Containing) 3 (Hakata Antigen)	13,31	0,007
ENXSXETG00000013641	ENSG00000131482	G6PC	Glucose-6-Phosphatase, Catalytic Subunit	2,54	0,012
ENXSXETG00000003788	ENSG00000112599	GUCA1B	Guanylate Cyclase Activator 1B (Retina)	2,53	0,028
ENXSXETG000000024745	ENSG00000184897	H1FX	H1 histone family, member X	2,19	0,031
ENXSXETG00000004700	ENSG00000110169	HPX	hemopexin	4,13	0,007
ENXSXETG00000001865	ENSG00000123243	ITIH5	Inter-Alpha (Globulin) Inhibitor I15	2,45	0,047
ENXSXETG00000002669	ENSG0000006459	KDM7A	Jumonji C Domain Containing Histone Demethylase 1 Homolog D	3,16	0,007
ENXSXETG00000015433	ENSG00000080883	JARID2	Jumonji, At Rich Interactive Domain 2	2,29	0,007
ENXSXETG00000002075	ENSG00000127528	KLF2	Kruppel-Like Factor 2 (Lung)	2,52	0,045
ENXSXETG00000031238	ENSG00000158113	LRRC43	leucine rich repeat containing 43	15,46	0,007
ENXSXETG00000012042	ENSG00000079435	LIPE	Lipase, Hormone-Sensitive	3,24	0,016
ENXSXETG00000003945	ENSG00000177943	MAMDC4	MAM domain containing 4	3,40	0,007
ENXSXETG00000007583	ENSG00000136536	MARCH7	Membrane-Associated Ring Finger (C3Hc4) 7	2,09	0,019
ENXSXETG00000012094	ENSG00000065911	MTHFD2	Methylenetetrahydrofolate Dehydrogenase (Nadp+ Dependent) 2, Methylenetetrahydrofolate Cyclohydrolase	2,35	0,022
ENXSXETG00000018647	ENSG00000090382	MGC89221	MGC89221 protein	5,63	0,007
ENXSXETG00000026964	ENSG00000263639	MSMB.1	microseminoprotein, beta-, gene 1	3,45	0,007
ENXSXETG00000007482	ENSG00000263639	MSMB.3	microseminoprotein, beta-, gene 3	3,81	0,012
ENXSXETG00000011564	ENSG00000086504	MRPL28	Mitochondrial Ribosomal Protein L28	2,32	0,016
ENXSXETG00000007787	ENSG0000005381	MPO	Myeloperoxidase	2,67	0,022
ENXSXETG00000005177	ENSG00000157601	MX1	Myxovirus (Influenza Virus) Resistance 1, Interferon-Inducible Protein P78	2,73	0,012
ENXSXETG00000003053	ENSG00000093000	NUP50	Nucleoporin 50Kda	2,06	0,046
ENXSXETG000000031105	ENSG00000138964	PARVG	Parvin, Gamma	2,97	0,007

ANNEXE V (suite) – F0.T (50 ng.L⁻¹) – Gène sur-transcrits (2/2)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENXSXETG00000013441	ENSG00000117115	PADI2	Peptidyl Arginine Deiminase, Type II	4,38	0,046
ENXSXETG00000004129	ENSG00000102221	JADE3	Phd Finger Protein 16	5,06	0,007
ENXSXETG00000007889	ENSG0000010438	SULT6B1	protease, serine, 1	2,10	0,043
ENXSXETG00000007732	ENSG00000204983	PRSS1	protease, serine, 1	inf	0,007
ENXSXETG00000022959	ENSG00000185198	XB-GENE-5764783	protease 3	3,84	0,012
ENXSXETG00000024013	ENSG00000088320	REM1	Ras (Rad And Gem)-Like Gtp-Binding 1	2,33	0,022
ENXSXETG00000013023	ENSG00000105122	RASAL3	RAS protein activator like 3	2,75	0,007
ENXSXETG00000004629	ENSG00000128340	RAC2	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 2 (Rho Family, Small Gtp Binding Protein Rac2)	2,85	0,022
ENXSXETG00000011415	ENSG00000137275	RIPK1	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	2,56	0,007
ENXSXETG00000007604	ENSG00000171700	RGS19	Regulator Of G-Protein Signaling 19	3,32	0,007
ENXSXETG00000002987	ENSG00000137968	SLC44A5	Solute Carrier Family 44, Member 5	2,62	0,034
ENXSXETG00000013370	ENSG00000198677	TTC37	Tetratricopeptide Repeat Domain 37	2,09	0,043
ENXSXETG00000024202	ENSG00000111752		Uncharacterized Protein	2,14	0,043
ENXSXETG00000024640	ENSG00000121691		Uncharacterized Protein	2,30	0,036
ENXSXETG00000030677	ENSG00000065243		Uncharacterized Protein	2,39	0,025
ENXSXETG00000032819	ENSG00000125730		Uncharacterized Protein	2,65	0,007
ENXSXETG00000024469	ENSG00000166482		Uncharacterized Protein	7,02	0,007
ENXSXETG00000010379	ENSG0000007001	UPP2	Uridine Phosphorylase 2	2,94	0,007

Annexe VI : Genes hépatiques sous-transcrits chez les femelles F0 exposées au mélange BaP/TCS (50 ng.L⁻¹) – F0.M

ANNEXE VI – F0.M (50 ng.L⁻¹) – Gène sous-transcrits (1/1)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000024582	ENSG00000134864	GGACT	Aig2-Like Domain 1	0,23	0,035
ENSXETG00000001474	ENSG00000126878	AIF1L	Allograft Inflammatory Factor 1-Like	0,37	0,008
ENSXETG00000027478	ENSG00000135046	ANXA1	annexin A1	0,44	0,039
ENSXETG00000021114	ENSG00000164111	ANXA5	Annexin A5	0,47	0,049
ENSXETG00000026763	ENSG00000103502	CDIPT	Cdp-Diacylglycerol--Inositol 3-Phosphatidyltransferase	0,45	0,032
ENSXETG00000027547	ENSG00000189143	CLDN6.2	Claudin 6, Gene 2	0,41	0,032
ENSXETG00000003094	ENSG00000142871	CYR61	Cysteine-Rich, Angiogenic Inducer, 61	0,35	0,008
ENSXETG00000031904	ENSG00000182585	EPGN	epithelial mitogen homolog precursor	0,35	0,046
ENSXETG00000005062	ENSG00000006468	ETV1	Ets Variant 1	0,39	0,008
ENSXETG00000019760	ENSG00000022267	FHL1	Four And A Half Lim Domains 1	0,42	0,013
ENSXETG00000027257	ENSG00000167468	GPX4	Glutathione Peroxidase 4 (Phospholipid Hydroperoxidase)	0,40	0,024
ENSXETG00000022668	ENSG00000154016	GRAP	GRB2-related adaptor protein	0,42	0,046
ENSXETG00000008798	ENSG00000197838	XB-GENE-5764740	Hypothetical Loc548374	0,48	0,049
ENSXETG00000013957	ENSG00000134333	LDHA	Lactate Dehydrogenase A	0,46	0,041
ENSXETG00000016012	ENSG00000100079	LGALS2	Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 2	0,35	0,043
ENSXETG00000024734	ENSG00000124370	MCEE	Methylmalonyl Coa Epimerase	0,39	0,017
ENSXETG00000027751	ENSG00000155130	MARCKS	Myristoylated Alanine-Rich Protein Kinase C Substrate	0,36	0,008
ENSXETG00000026488	ENSG00000181631	P2RY13	Purinergic Receptor P2Y, G-Protein Coupled, 13	0,40	0,041
ENSXETG00000011319	ENSG00000139832	RAB20	Rab20, Member Ras Oncogene Family	0,46	0,035
ENSXETG00000021529	ENSG00000088827	SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	0,35	0,017
ENSXETG00000014014	ENSG00000115902	SLC1A4	Solute Carrier Family 1 (Glutamate/Neutral Amino Acid Transporter), Member 4	0,34	0,039
ENSXETG00000016876	ENSG00000147804	SLC39A4	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 4	0,43	0,017
ENSXETG00000011569	ENSG00000157703	SVOPL	Svop-Like	0,04	0,008
ENSXETG00000014770	ENSG00000168955	TM4SF20	transmembrane 4 L six family member 20	0,22	0,008
ENSXETG00000030371	ENSG00000171865		Uncharacterized Protein	0,28	0,045
ENSXETG00000026447	ENSG00000175567	UCP2	Uncoupling Protein 2 (Mitochondrial, Proton Carrier)	0,19	0,008
ENSXETG00000025372	ENSG00000136997	MYC	V-Myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog	0,46	0,038

Annexe VII : Genes hépatiques sur-transcrits chez les femelles F0 exposées au mélange BaP/TCS (50 ng.L⁻¹) – F0.M

ANNEXE VII – F0.M (50 ng.L⁻¹) – Gène sur-transcrits (1/2)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000008240	ENSG00000118507	AKAP7	A kinase (PRKA) anchor protein 7	2,03	0,046
ENSXETG00000006882	ENSG00000160323	ADAMTS13	Adam Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif, 13	2,11	0,045
ENSXETG00000003571	ENSG00000065457	ADAT1	Adenosine Deaminase, Trna-Specific 1	3,12	0,013
ENSXETG00000010847	ENSG00000243480	AMY2A	Amylase, Alpha 2A (Pancreatic)	2,48	0,017
ENSXETG00000008707	ENSG00000239388	ASB14	Ankyrin Repeat And Socs Box Containing 14	inf	0,008
ENSXETG00000002292	ENSG00000131473	ACLY	Atp Citrate Lyase	2,86	0,017
ENSXETG00000016210	ENSG00000073734	ABCB11	Atp-Binding Cassette, Sub-Family B (Mdr/Tap), Member 11	2,70	0,008
ENSXETG00000014295	ENSG00000114770	ABCC5	Atp-Binding Cassette, Sub-Family C (Cfr/Mrp), Member 5	2,46	0,008
ENSXETG00000013316	ENSG00000101197	BIRC7	baculoviral IAP repeat containing 7	4,21	0,008
ENSXETG00000019779	ENSG00000113916	BCL6	B-Cell Cll/Lymphoma 6	2,64	0,008
ENSXETG00000013844	ENSG00000074582	BCS1L	Bes1-Like (S. Cerevisiae)	2,55	0,038
ENSXETG00000001407	ENSG00000127325	BEST3	Bestrophin 3	2,28	0,045
ENSXETG00000018707	ENSG00000152611	CAPSL	Calcyphosine-Like	2,16	0,017
ENSXETG00000009722	ENSG00000074410	CA12	Carbonic Anhydrase Xii	8,24	0,043
ENSXETG00000000740	ENSG00000187796	CARD9	Caspase Recruitment Domain Family, Member 9	2,43	0,035
ENSXETG00000003362	ENSG00000101017	CD40	CD40 antigen precursor	4,02	0,020
ENSXETG00000013935	ENSG00000151849	CENPJ	Centromere Protein J	4,22	0,008
ENSXETG00000000522	ENSG00000016602	CLCA4	chlornide channel accessory 4	16,16	0,008
ENSXETG00000026982	ENSG00000219073	CELA3B	Chymotrypsin-Like Elastase Family, Member 3B	4,32	0,039
ENSXETG00000010071	ENSG00000186166	CCDC84	Coiled-Coil Domain Containing 84	2,22	0,027
ENSXETG000000030070	ENSG00000138161	CUZD1	CUB and zona pellucida-like domains 1	3,74	0,032
ENSXETG00000008796	ENSG00000197838	CYP2C8.1	Cytochrome P450, Family 2, Subfamily C, Polypeptide 8, Gene 1	3,47	0,032
ENSXETG000000033940	ENSG00000160868	CYP3A5	Cytochrome P450, Family 3, Subfamily A, Polypeptide 5	3,75	0,008
ENSXETG000000000840	ENSG00000074054	CLASP1	Cytoplasmic Linker Associated Protein 1	2,71	0,030
ENSXETG00000009409	ENSG00000082805	ERC1	Elks/Rab6-Interacting/Cast Family Member 1	2,77	0,020
ENSXETG000000022526	ENSG00000151491	EPS8	Epidermal Growth Factor Receptor Pathway Substrate 8	2,19	0,049
ENSXETG00000008919	ENSG00000139083	ETV6	Ets Variant 6	2,03	0,039
ENSXETG00000009483	ENSG00000075151	EIF4G3	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4 Gamma, 3	2,29	0,020
ENSXETG00000019377	ENSG00000158417	EIF5B	Eukaryotic Translation Initiation Factor 5B	2,12	0,041
ENSXETG00000016735	ENSG00000005189		Exonuclease Nef-Sp	3,19	0,008
ENSXETG00000009481	ENSG00000139641	ESYT1	Extended Synaptotagmin-Like Protein 1	2,63	0,030
ENSXETG000000027391	ENSG00000234545	FAM133B	Family With Sequence Similarity 133, Member B	2,27	0,046
ENSXETG00000001938	ENSG00000163586	FABP1	Fatty Acid Binding Protein 1, Liver	3,76	0,008
ENSXETG000000023558	ENSG00000141665	FBXO15	F-box protein 15	2,43	0,027
ENSXETG000000033310	ENSG00000078098	FAP	Fibroblast Activation Protein, Alpha	10,39	0,013
ENSXETG000000024910	ENSG00000085265	FCN3	Ficolin (Collagen/Fibrinogen Domain Containing) 3 (Hakata Antigen)	12,24	0,013
ENSXETG00000016228	ENSG00000155816	FMN2	Formin 2	3,10	0,049
ENSXETG000000020478	ENSG00000141560	FN3KRP	Fructosamine 3 Kinase Related Protein	2,55	0,024
ENSXETG00000016232	ENSG00000101216	GMEB2	Glucocorticoid Modulatory Element Binding Protein 2	2,18	0,035
ENSXETG000000024588	ENSG00000131482	G6PC	Glucose-6-Phosphatase, Catalytic (Glycogen Storage Disease Type I, Von Gierke Disease)	3,59	0,008
ENSXETG00000013641	ENSG00000131482	G6PC	Glucose-6-Phosphatase, Catalytic Subunit	2,94	0,008
ENSXETG00000012583	ENSG00000131482	G6PC2	Glucose-6-Phosphatase, Catalytic, 2	3,04	0,008
ENSXETG00000003788	ENSG00000112599	GUCA1B	Guanylate Cyclase Activator 1B (Retina)	3,28	0,008
ENSXETG00000002669	ENSG00000006459	KDM7A	Jumonji C Domain Containing Histone Demethylase 1 Homolog D	2,85	0,008
ENSXETG00000015433	ENSG00000008083	JARID2	Jumonji, At Rich Interactive Domain 2	2,09	0,027
ENSXETG000000023230	ENSG00000175946	KLHL38	Kelch-Like 38	2,50	0,046
ENSXETG00000012450	ENSG00000168806	LCMT2	leucine carboxyl methyltransferase 2	3,96	0,008
ENSXETG000000031238	ENSG00000158113	LRRC43	leucine rich repeat containing 43	7,41	0,020
ENSXETG00000003986	ENSG00000135363	LMO2	Lim Domain Only 2 (Rhototin-Like 1)	2,09	0,046

ANNEXE VII – F0.M (50 ng.L⁻¹) – Gène sur-transcrits (2/2)

Ensembl		Nom	Description	RT	q-val
<i>X. tropicalis</i>	<i>H. sapiens</i>				
ENSXETG00000012042	ENSG00000079435	LIPE	Lipase, Hormone-Sensitive	3,59	0,020
ENSXETG0000009352	ENSG00000130164	LDLR	Low Density Lipoprotein Receptor	2,41	0,020
ENSXETG00000003945	ENSG00000177943	MAMDC4	MAM domain containing 4	2,96	0,013
ENSXETG00000007583	ENSG00000136536	MARCH7	Membrane-Associated Ring Finger (C3Hc4) 7	2,50	0,008
ENSXETG00000033425	ENSG00000244392	METAZOA_SRP	Metazoan signal recognition particle RNA	3,00	0,013
ENSXETG00000007482	ENSG00000263639	MSMB.3	microseminoprotein, beta-, gene 3	5,89	0,008
ENSXETG00000021439	ENSG00000125459	MSTO1	misato 1, mitochondrial distribution and morphology regulator	2,78	0,008
ENSXETG00000034183	ENSG00000138834	MAPK8IP3	Mitogen-Activated Protein Kinase 8 Interacting Protein 3	10,48	0,008
ENSXETG00000002978	ENSG00000057468	MSH4	Muts Homolog 4	3,60	0,020
ENSXETG00000032514	ENSG00000144802	NFKBIZ	Nuclear Factor Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells Inhibitor, Zeta	2,12	0,049
ENSXETG00000006216	ENSG00000135506	OS9	Osteosarcoma Amplified 9, Endoplasmic Reticulum Lectin	2,09	0,039
ENSXETG00000004129	ENSG00000102221	JADE3	Phd Finger Protein 16	3,72	0,008
ENSXETG00000023140	ENSG00000052126	PLEKHA5	Pleckstrin Homology Domain Containing, Family A Member 5	3,63	0,008
ENSXETG00000010813	ENSG00000164087	POC1A	Poc1 Centriolar Protein Homolog A (Chlamydomonas)	3,86	0,039
ENSXETG00000031731	ENSG00000163346	PBXIP1	pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1	3,78	0,008
ENSXETG00000004450	ENSG00000146143	PRIM2	primase, DNA, polypeptide 2 (58kDa)	3,39	0,008
ENSXETG00000000658	ENSG00000170915	PAQR8	Progesterin And Adipoq Receptor Family Member Viii	2,12	0,030
ENSXETG00000013846	ENSG00000135929	XB-GENE-984298	Putative Ortholog Of Cytochrome P450 27, Mitochondrial Precursor (Ec 1.14.-.) (Cytochrome P-450C27/25) (Sterol 26-Hydroxylase) (Sterol 27-Hydroxylase) (Vitamin D(3) 25-Hydroxylase) (5-Beta-Cholestane-3-Alpha,7-Alpha,12-Alpha-Triol 27-Hydroxylase), 1 Of 2	2,11	0,038
ENSXETG00000012512	ENSG00000135821	XB-GENE-990053	Putative Ortholog Of Glutamine Synthetase (Ec 6.3.1.2) (Glutamate--Ammonia Ligase) (Gs), 1 Of 1	3,66	0,008
ENSXETG00000024013	ENSG00000088320	REM1	Ras (Rad And Gem)-Like Gtp-Binding 1	2,51	0,049
ENSXETG00000013023	ENSG00000105122	RASAL3	RAS protein activator like 3	3,28	0,008
ENSXETG00000013364	ENSG00000164292	RHOBTB3	Rho-Related Btb Domain Containing 3	4,44	0,013
ENSXETG00000034020	ENSG00000132972		ring finger protein 17	3,54	0,013
ENSXETG00000021857	ENSG00000119707	RBM25	Rna Binding Motif Protein 25	2,48	0,013
ENSXETG00000008755	ENSG00000160633	SAFB	Scaffold Attachment Factor B	2,61	0,008
ENSXETG00000018094	ENSG00000166922	SCG5	Secretogranin V (7B2 Protein)	5,31	0,043
ENSXETG00000014380	ENSG00000116350	SRSF4	serine/arginine-rich splicing factor 4	2,56	0,024
ENSXETG00000002211	ENSG00000100650	SRSF5	Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 5	2,25	0,024
ENSXETG00000025124	ENSG00000087087	SRRT	Serrate Rna Effector Molecule Homolog	2,69	0,008
ENSXETG00000022919	ENSG00000104852	SNRNP70	Small Nuclear Ribonucleoprotein 70Kda (U1)	2,75	0,013
ENSXETG00000014657	ENSG00000174032	SLC25A30	Solute Carrier Family 25, Member 30	2,72	0,045
ENSXETG00000007900	ENSG00000145832	SLC25A48	solute carrier family 25, member 48	2,46	0,039
ENSXETG00000014603	ENSG00000092068	SLC7A8	Solute Carrier Family 7 (Amino Acid Transporter Light Chain, L System), Member 8	2,14	0,049
ENSXETG00000020354	ENSG00000114650	SCAP	Srebf Chaperone	3,60	0,008
ENSXETG00000019804	ENSG00000198075	SULT1C3	Sulfotransferase Family, Cytosolic, 1C, Member 3	3,10	0,032
ENSXETG00000010588	ENSG00000137221	TJAP1	Tight Junction Associated Protein 1 (Peripheral)	2,64	0,008
ENSXETG00000015587	ENSG00000138162	TACC2	Transforming, Acidic Coiled-Coil Containing Protein 2	4,17	0,008
ENSXETG00000012271	ENSG00000139131	YARS2	Tyrosyl-Trna Synthetase 2, Mitochondrial	2,21	0,032
ENSXETG00000022133	ENSG00000163714	U2SURP	U2 Snmp-Associated Surp Domain Containing	2,25	0,039
ENSXETG00000010785	ENSG00000198075		Uncharacterized Protein	2,61	0,017
ENSXETG00000027944	ENSG00000198075		Uncharacterized Protein	2,64	0,049
ENSXETG00000005990	ENSG0000004846		Uncharacterized Protein	2,73	0,008
ENSXETG00000025063	ENSG00000138068		Uncharacterized Protein	3,15	0,008
ENSXETG00000024469	ENSG00000166482		Uncharacterized Protein	4,23	0,008
ENSXETG00000031862	ENSG00000078061	ARAF	V-Raf Murine Sarcoma 3611 Viral Oncogene Homolog	3,01	0,020
ENSXETG00000008630	ENSG00000162643	WDR63	Wd Repeat Domain 63	3,23	0,008
ENSXETG00000023189	ENSG00000156787	TBC1D31	Wd Repeat Domain 67	2,31	0,045

